

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

**CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE ESTIRPES DE RIZÓBIO
PARA INOCULAÇÃO DE CAUPI (*Vigna unguiculata* (L) Walp) EM
ÁREAS DE CERRADO**

JERRI ÉDSON ZILLI

Comitê de Orientação: Dra. Maria Cristina Prata Neves
Dra. Norma Gouvêa Rumjanek

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção
do grau de ***Magister Scientiae***
em **Agronomia-Ciência do Solo**

Seropédica, Rio de Janeiro
Fevereiro de 2001

**CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE ESTIRPES DE RIZÓBIO
PARA INOCULAÇÃO DE CAUPI (*Vigna unguiculata* (L) Walp) EM
ÁREAS DE CERRADO**

JERRI ÉDSON ZILLI

APROVADO EM 16 / 02 / 2001

Dr. Gilson Paulo Manfio
(Fundação André Tosello)

.....

Dr. Segundo Urquiaga
(Embrapa Agrobiologia)

.....

Dra. Maria Cristina Prata Neves
(Embrapa Agrobiologia)

.....

Dedico este trabalho aos meus pais *Nelcy e Terezinha Zilli*

AGRADECIMENTOS

Com muito carinho agradeço a todos os meus amigos e colegas de trabalho que direta ou indiretamente estiveram comigo durante este período.

Agradeço à Suzana Saori Yamashita pela compreensão da minha necessidade de trabalhar nas horas mais inesperadas.

Agradeço a Romano Valichski por ter cedido seus resultados para discussão deste trabalho.

Agradeço em especial a Dra. Maria Cristina Prata Neves e Norma Gouvêa Rumjanek pela orientação dos meus trabalhos e incentivo a minha profissão.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Jerri Édson Zilli, nascido em 09 de maio de 1974, na cidade de Xaxim, Santa Catarina, formou-se Técnico em Agropecuária pela Escola Agrotécnica Federal de Concórdia no ano de 1994 e graduou-se em Licenciatura em Ciências Agrícolas na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro no ano de 1998.

Durante sua graduação sempre esteve envolvido com estágios e projetos de pesquisa, sendo bolsista de Pré-Iniciação Científica na UFRRJ no ano de 1996 e bolsista de Iniciação Científica na Embrapa Agrobiologia em 1997 e 1998.

Iniciou o curso de Mestrado em Agronomia-Ciência do Solo, na UFRRJ em março de 1999.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1

CAPÍTULO I

ESTUDO DA POPULAÇÃO DE RIZÓBIO NODULANTE DE CAUPI EM SOLO DE CERRADO

1. INTRODUÇÃO.....	4
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
2.1. A População de Rizóbio	6
2.2. A Taxonomia de Rizóbios	12
2.3. O Grupo <i>Bradyrhizobium</i> Tropical ou Miscelânea Caupi.....	15
2.4. Análise Molecular Baseada no 16S rDNA.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1. Coletas de Amostras de Solo.....	21
3.2. Cultivo das Plantas Isca.....	21
3.3. Isolamento de Nódulos, Caracterização e Agrupamento Morfológico dos Isolados.....	22
3.4. Teste de Nodulação.....	23
3.5. Escolha dos Isolados a serem Analisados por ARDRA.....	23
3.6. Preparação das Amostras e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	24
3.7. Análise de Restrição do 16S rDNA Amplificado (ARDRA-16S rDNA).....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1. Isolamento de Nódulos, Caracterização Morfológica e Agrupamento dos Isolados de Rizóbio.....	27
4.2. Teste de nodulação.....	28
4.3. Diversidade Morfológica dos Isolados de Rizóbio.....	29
4.4. Amplificação do 16S rDNA.....	31
4.5. Análise dos Fragmentos de Restrição.....	32
4.6. Distribuição dos Diferentes Grupos de Rizóbio nas Áreas Estudadas.....	40
4.7. Influência da Cultivar de Caupi na Obtenção dos Grupos de Rizóbio.....	43
5. CONCLUSÕES.....	47

CAPÍTULO II

EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ESTIRPES DE RIZÓBIO PARA CAUPI ISOLADAS DE SOLO DE CERRADO NO ESTADO DO PIAUÍ

1. INTRODUÇÃO.....	49
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	51
2.1. A Cultura do Caupi.....	51
2.2. A Simbiose Caupi/Rizóbio.....	54
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	58
3.1. Teste de Eficiência Simbiótica em Casa de Vegetação.....	58
3.1.1. Escolha das Estirpes.....	58
3.1.2. Cultivo das Plantas.....	58
3.1.3. Preparo dos Inoculantes e Inoculação das Plantas.....	58
3.1.4. Irrigação e Nutrição das Plantas.....	59
3.1.5. Colheita do Experimento e Parâmetros Analisados.....	59
3.2. Teste de Competitividade e Eficiência Simbiótica no Campo.....	60
3.2.1. Seleção das Estirpes e Preparo do Inoculante.....	60
3.2.2. Estimativa do Número de Rizóbios no Solo Através do Método do NMP.....	60
3.2.2. Montagem do Experimento.....	61
3.2.3. Coleta de Nódulos e Colheita do Experimento.....	61
3.2.4. Produção dos Anti-soros e Testes de <i>ELISA</i> (Teste de Imunoabsorção com Enzima Acoplada).....	62
3.2.4.1. Preparo dos Antígenos, Inoculação dos Coelho e Coleta do Sangue.....	62
3.2.4.2. Purificação dos Anti-soros, Curvas de Titulação e Testes de <i>ELISA</i>	63
3.3. Relação Filogenética das Estirpes de Rizóbios utilizadas como Inoculantes.....	64
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
4.1. Eficiência Simbiótica.....	65
4.2. Avaliação da Ocupação Nodular através da Técnica de <i>ELISA</i>	72
4.3. Relação Filogenética das Estirpes de Rizóbios utilizadas como Inoculantes.....	73
5. CONCLUSÕES.....	75
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
Apêndice 1.....	95
Apêndice 2.....	103
Apêndice 3.....	109
Apêndice 4.....	110
Apêndice 5.....	111
Apêndice 6.....	112

ÍNDICE DE QUADROS E TABELAS

CAPÍTULO I

Página

Tabela 1 - Gêneros e espécies de rizóbios relacionados com seus principais hospedeiros.....	13
Tabela 2 - Descrição do histórico de manejo empregado em cada uma das áreas de Cerrado do Estado do Piauí utilizadas para o estudo.....	21
Tabela 3 - Reagentes da reação de PCR.....	24
Tabela 4 - Endonucleases de restrições utilizadas para a ARDRA 16S rDNA.....	25
Tabela 5 - Aparência e elasticidade do muco produzido em relação ao tempo de crescimento dos isolados de rizóbios obtidos do Cerrado do estado do Piauí.....	28
Tabela 6 - Diversidade, riqueza e abundância de rizóbios nas diferentes áreas localizadas no Cerrado do estado do Piauí.....	30
Tabela 7 - Perfis de restrição de 86 isolados de rizóbio obtidos de caupi cultivado com solo de Cerrado, 6 estirpes referência e 3 estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> sp., revelados por ARDRA com nove endonucleases.....	35
Tabela 8 - Grupos morfo-genotípicos de isolados de rizóbios obtidos das cultivares de caupi utilizadas com plantas isca.....	45

CAPÍTULO II

Quadro 1 - Área colhida (ha), produção (t) e produtividade ($\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$) de caupi, na região nordeste do país no período de 93-97.....	52
Quadro 2 - Valores nutricionais de grãos de caupi maduros.....	52
Quadro 3 - Teor médio de aminoácidos essenciais encontrados em grãos de caupi em relação ao conteúdo de nitrogênio ($\text{mg} \cdot 16\text{g}^{-1}$).....	53
Tabela 1 - Médias de matéria seca total (g), nitrogênio total acumulado na parte aérea das plantas (mg), massa de nódulos secos (g), eficiência nodular (N-total acumulado na parte aérea da planta / massa seca de nódulos; $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) e taxa de fixação ($\text{N-total da amostra} - \text{N-total do controle} \times 100 / \text{N-total da amostra}$) de plantas de caupi inoculadas com 15 diferentes estirpes de rizóbio.....	65
Quadro 4 - Teor de nitrogênio (%) nas folhas e produção de matéria seca (g) por plantas de caupi submetidas a um choque térmico. Experimento conduzido por Valicheski, (dados não publicados).....	71

ÍNDICE FIGURAS

CAPÍTULO I

	Página
Figura 1 - Correlações entre diversidade, riqueza e abundância de Simpsom com o número de cultivos de soja e/ou caupi.....	31
Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose (3%; P/V), mostrando o gene 16S rDNA amplificado de 8 isolados de rizóbio obtidos de nódulos de caupi: M (marcador - ϕ X174 DNA)1 (1B13), 2 (7A4), 3(3A8), 3 (2A9), 4 (2C5), 6 (6C1), 7 (6A1) e 8 (7C5).....	32
Figura 3 - Eletroforese em um gel de agarose (3%; P/V), mostrando perfis de restrições obtidos com a endonuclease <i>Hha</i> I: M (Marcador ϕ X174 DNA), 2 (1B13), 3 (5A17), 4 (BR3267), 5 (5A8), 6 (2C5), 7 (4A8), 8 (6A3), 9 (BR29), 10 (3A8), 11 (2A9), 12 (BR3262), 13 (BR2001), 14 (6C1), 15 (5C4), 16 (2C10) e 17 (BR10026).....	33
Figura 4 - Eletroforese em um gel de agarose (3%; P/V), mostrando perfis de restrições obtidos com a endonuclease <i>Hinf</i> I: M (Marcador ϕ X174 DNA), 2 (1B13), 3 (7A4), 4 (BR3267), 5 (5A8), 6 (2C5), 7 (4A8), 8 (6A3), 9 (BR29), 10 (3A8), 11 (2A9), 12 (BR3262), 13 (BR2001), 14 (6C1), 15 (5C4), 16 (2C10) e 17 (BR10026).....	33
Figura 5 - Eletroforese em um gel de agarose (3%; P/V), mostrando perfis de restrições obtidos com a endonuclease <i>Dde</i> I: M (Marcador ϕ X174 DNA), 1 (BR111), 2 (5A8), 3 (2C5), 4 (4A8), 5 (BR29), 6 (BR2001), 7 (5C4), 8 (2C10) e 9 (BR10026).....	34
Figura 6 - Eletroforese em um gel de agarose (3%; P/V), mostrando perfis de restrições obtidos com a endonuclease <i>Rsa</i> I: M (Marcador ϕ X174 DNA), 1 (BR111), 2 (5A8), 3 (2C5), 4 (4A8), 5 (BR29), 6 (BR2001), 7 (5C4), 8 (2C10) e 9 (BR10026).....	34
Figura 7 - Dendrograma de dados genotípicos elaborado pelo algoritmo <i>UPGMA</i> e matriz de similaridade <i>Jaccard</i> mostrando a similaridade entre 86 isolados de rizóbios obtidos de caupi cultivado com solo de Cerrado e as estirpes BR3267, BR3262 e BR2001.....	39
Figura 8 - Relação multivariada entre áreas do Cerrado e grupos morfo-genotípicos de rizóbios avaliada por análise de correspondência.....	43
Figura 9 - Relação multivariada de grupos morfo-genotípicos de rizóbios e cultivares de caupi avaliada por análise de correspondência.....	46

CAPÍTULO II

Figura 1 - Matéria seca produzida por plantas de caupi inoculadas com estirpes de rizóbio isoladas do solo de Cerrado.....	67
Figura 2 - N-total acumulado pela parte de plantas de caupi inoculadas com estirpes de rizóbio obtidas do cultivo de caupi com solo de Cerrado.....	68
Figura 3 - Correlações entre os parâmetro de eficiência simbiótica de 15 estirpes de rizóbio nodulante de caupi.....	69
Figura 4 - Análise de redução de acetileno, realizada por Valicheski (dados não publicados), mostrando o efeito do choque térmico aplicado em plantas de caupi inoculadas com as estirpes de rizóbio 1B13, BR3262, 7A4, BR2001 e BR3267.....	71
Figura 5 - Percentagem de nódulos soro-positivos avaliada por reação de <i>ELISA</i> , utilizando anti-soros policlonais específicos para cada estirpe inoculante.....	72
Figura 6 - Dendrograma elaborado pelo algoritmo <i>UPGMA</i> , seguindo uma matriz de distância genética <i>Jaccard</i> , mostrando a similaridade entre 15 estirpes de rizóbio nodulante de caupi e 6 estirpes padrões: BR29, BR111, BR112, BR10016, BR10026 e BR5410.....	74

RESUMO

O caupi (*V. unguiculata*) é uma importante leguminosa para muitos países da África, Ásia, assim como para o Brasil, onde é cultivado principalmente no nordeste do país. Historicamente, esta cultura apresenta baixa produtividade, devido às condições de cultivos sem adoção de tecnologias avançadas. Isto porque, em condições de experimentos e lavouras melhor tecnificadas, o caupi tem apresentado alto potencial produtivo, que em geral não tem sido explorado. A produtividade desta cultura poderia ser aumentada, além, é claro da melhoria das condições de cultivo, com o uso de inoculantes de rizóbios eficientes, que poderiam suprir as necessidades de N da planta.

A simbiose caupi/rizóbio, no entanto, é de baixa especificidade, o que se torna uma barreira à introdução de novos inoculantes, pois estirpes nativas ou naturalizadas estão adaptadas às condições edafoclimáticas do local e acabam competindo com as estirpes selecionadas, restringindo a contribuição das mesmas para a FBN. Frente a esta situação, sobressaem-se estratégias que avaliam a composição e a contribuição para a FBN de estirpes de rizóbio do local onde se pretende introduzir o novo inoculante.

Com vista a selecionar inoculantes para a cultura do caupi em áreas de Cerrado dos estados do Piauí e Maranhão obteve-se uma coleção de rizóbio a partir de diversas áreas do Cerrado, manejadas diferentemente. Esta coleção foi estudada tanto em nível morfológico, como genotípico, através da técnica de ARDRA¹. Representantes desta coleção, assim como também outras estirpes pertencentes a coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia, foram avaliados quanto a contribuição na FBN em caupi.

Os resultados da caracterização morfológica e ARDRA revelaram que a população de rizóbio do solo foi grandemente influenciada pelos cultivos de soja e/ou caupi, sendo a diversidade de grupos morfológicos de rizóbio inversamente proporcional ao número de cultivos de leguminosas. Na área de Cerrado Clímax, provavelmente pelo baixo requerimento de N do sistema, há um baixo número de rizóbios capazes de nodular caupi, sendo esta população composta somente por *Bradyrhizobium elkanii*. À medida que o solo foi manejado e cultivado com arroz, observou-se aumento da diversidade de grupos morfológicos de rizóbio, provavelmente pelas alterações físicas e químicas do solo. Os

¹ Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis

resultados revelaram também que 90% dos isolados recuperados de uma área sabidamente inoculada com *B. japonicum* apresentaram características morfológicas e genotípicas semelhante a *B. japonicum*, mostrando o estabelecimento desta espécie. A análise de correspondência realizada demonstrou que áreas onde houve o cultivo de soja e não de caupi, o perfil morfo-genotípico da população de rizóbio foi semelhante. Ao passo que áreas onde havia ocorrido o cultivo de caupi, este perfil apresentou uma distribuição aleatória, demonstrando, desta forma, que esta leguminosa foi capaz de nodular com uma população de rizóbio geneticamente diversa.

A eficiência simbiótica de 12 estirpes de rizóbio provenientes do Cerrado e as estirpes BR2001, BR3262 e BR3267 inoculadas na cultivar de caupi BR17, em casa de vegetação, mostrou não haver diferenças na contribuição da FBN entre estirpes de *B. japonicum* e *B. elkanii*. Oito das estirpes testadas contribuíram significativamente igual à estirpe BR2001, tanto na produção de matéria seca, como na acumulação de N nas plantas de caupi. No entanto, como observado anteriormente, a estirpe BR2001 não foi capaz de estabelecer nodulação no experimento de campo. Enquanto as estirpes BR3262 e 1B13 ocuparam pelo menos 60% dos nódulos formados por plantas de caupi no campo, em área onde a população de rizóbio estabelecida era da ordem de 6×10^3 células.g⁻¹ de solo e apresentam excelente capacidade de recuperação da atividade da nitrogenase após um choque térmico. Estes resultados abrem a possibilidade de implementação de experimentos de campo para testar a contribuição destas estirpes na FBN e produtividade do caupi.

Palavras-chave: Rizóbio, Caupi, Cerrado, Diversidade, Eficiência Simbiótica e Ocupação Nodular.

ABSTRACT

Cowpea (*V. unguiculata*) is an important grain legume for many countries of Africa, Asia, as well as in Brazil, where it is cultivated mainly in the northeast. Usually, this crop presents low yield, due to the lack of appropriate technologies at farmer's field. In contrast, high crop yields are often obtained in experimental conditions, indicating that the genetic crops potential, has not been explored. Cowpea yield could be increased, by use improved management conditions, and efficient rhizobium inoculants, that would be supply the major part of N requirement.

The promiscuity of the cowpea/rhizobium symbiosis, however, becomes a barrier to a introduction of new inoculant, as native or naturalized rhizobium adapted to the edaphoclimatic conditions compete with the selected strains, compromising their potential BNF contribution. Therefore, an evaluation of the composition and the contribution of local rhizobium populations to the BNF of cowpea plants is important prior to the introduction of novel inoculant strains.

In this work, we have studied a rhizobium collection obtained from several Cerrado areas subjected to different soil management, to select efficient inoculants for the cowpea into Cerrado areas of Piauí and Maranhão states. This collection was studied regarding their morphological, as well genotypic characteristics by ARDRA technique. Some isolates of this collection, as well as other strains belonging to Embrapa Agrobiologia collection cultures were analyzed to the BNF efficiency in cowpea plants.

The morphological and ARDRA characterization results revealed that soil rizhobium populations were largely influenced by soybean and cowpea cultivation. In the local Cerrado climax area, low number of rizhobium were capable of nodulating cowpea, probably, because of the low N requirement in this stable system. The rhizobium populations in this area was comprised only of *B. elkanii*. In area 2, where rice was previously cultivated, an increase in rhizobium diversity groups was observed, probably because of the physical and chemical disturbance of soil by management. In the other hand, the results also revealed that 90% of the isolates recovered from an area where *B. japonicum* strains were used as inoculant presented morphological and genotypics characteristics similar to *B. japonicum*, showing establishment of this species in the soil.

The correspondence analysis also demonstrated that areas where soybean has been cultivated, but not cowpea, showed similar rhizobium populations profiles. However, the opposite occurred in areas where cowpea was introduced. In these areas, populations profiles distributed randomly, demonstrating that this legume is capable of being nodulated by a heterogeneous rhizobium population.

The symbiotic efficiency of the 12 rhizobium strains from the Cerrado soils and strains BR2001, BR3262 and BR3267 showed that no differences in BNF contribution to the BR17 cowpea cultivar between strains of *B. japonicum* and *B. elkanii* exist. Eight of the strains tested were similar to BR2001 in relation to dry matter production and N accumulation in cowpea plants. BR2001 is currently recommended to inoculation of cowpea and, as observed previously, it was not capable of nodulating cowpea under field conditions. However, strains BR3262 and 1B13 formed at least 60% of the nodules in cowpea plants in the field, with an estimated overall rhizobium population of $6 \times 10^3 \text{ cells}^{-1} \cdot \text{g}$ of soil. These strains also presented excellent capacity to recover nitrogenase activity after a thermal shock. These results open the possibility of field experiments to test the contribution of these strains as inoculants for cowpea.

Key-words: Rhizobium, Cowpea, Cerrado, Diversity, Symbiotic Efficiency and Nodules Occupancy.

INTRODUÇÃO GERAL

O início dos estudos de fixação biológica de nitrogênio (FBN) remota do século XIX, quando Beijerinck observou que algumas bactérias formavam nódulos nas raízes de ervilha, onde supostamente ocorria a redução do N_2 que era utilizado pela planta. Na época, estas bactérias receberam o nome de *Bacillus radicola*, sendo posteriormente agrupadas no gênero *Rhizobium* até o início da década de 80. Atualmente, este grupo de bactérias, genericamente chamadas de rizóbios, distribui-se em 29 espécies, pertencentes a 6 gêneros: *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* e *Rhizobium*.

Desde o início dos estudos até os dias de hoje, a simbiose entre leguminosas e rizóbios tem sido grandemente explorada, principalmente, devido a carência de nitrogênio em algumas áreas do planeta, especialmente em regiões de clima tropical. No Brasil, os estudos de fixação biológica de nitrogênio (FBN) em leguminosas iniciaram-se ainda nos anos 50 e se pronunciaram intensamente nas décadas posteriores. Estes estudos, decorreram principalmente para a cultura da soja, cujas lavouras passaram a ser inoculadas com estirpes de *Bradyrhizobium* eficientes, sendo dispensada completamente a adubação nitrogenada mineral. Segundo Döbereiner (1997), a utilização de inoculantes para a cultura da soja proporcionou nos últimos anos para o Brasil uma economia de US\$ 1,6 bilhões anuais em fertilizantes nitrogenados, que seriam necessários para manter a atual produtividade da cultura da soja. Segundo esta autora, se fossem consideradas as perdas de N quando aplicado na forma mineral, esta economia poderia chegar a US\$ 3,2 bilhões anuais.

No caso da FBN em caupi, embora não se saiba a real contribuição para a economia nacional, sabe-se que é muito importante para a produção desta cultura em áreas de subsistência no nordeste do país, onde o grau de tecnificação e adoção de tecnologias por parte dos agricultores é muito baixo. De fato, a baixa tecnificação é extremamente relevante na produtividade do caupi, pois diversos trabalhos tem demonstrado alto potencial produtivo das cultivares desta cultura, que não tem sido explorado no campo (Freire et al., 1998).

Pesquisas conduzidas no Brasil e também na África mostram que a simbiose caupi/rizóbio é capaz de acumular de 50 a 120kg.ha⁻¹ de N (Neves et al. 1987, Wani et al.,

1995), o que representa de 35 a 70% do total de N assimilado pela cultura (Boddey et al., 1990). Porém, nem sempre são verificadas diferenças na acumulação de N entre plantas inoculadas com estirpes selecionadas ou nativas. Isto tem sido atribuído à baixa tecnificação das lavouras e principalmente à promiscuidade da simbiose caupi/rizóbio.

A promiscuidade, compreendida como a capacidade da leguminosa associar-se com diversas espécies e estirpes de rizóbio, é extremamente relevante no caso das leguminosas tropicais (Thies et al., 1991a) e, embora tenham sido desenvolvidos intensos trabalhos para compreender este fenômeno, sobressaem-se as estratégias de pesquisas que visam melhorar a FBN.

Atualmente, tem-se observado que uma estratégia útil para a obtenção de estirpes de rizóbio mais competitivas pode ser o isolamento de estirpes de áreas onde ocorreram inoculações no passado. Isto porque tem-se verificado que bactérias introduzidas por inoculantes são capazes de adaptar-se às condições do solo, tornando-se mais competitivas na formação nodular, sem perder a eficiência de FBN (Neves et al., 1992, 1996; Scotti et al., 1993; Coutinho et al., 1999). No caso da soja, por exemplo, esta estratégia contribuiu grandemente e hoje os atuais inoculantes de *B. japonicum* recomendados pela RELARE¹, para a inoculação da soja foram isolados de áreas inoculadas no passado com estirpes de *B. japonicum* (Vargas et al., 1994a; Scotti et al., 1997).

O presente trabalho de tese objetivou avaliar a composição da população de rizóbio nativa ou naturalizada nodulante de caupi em áreas de Cerrado do estado do Piauí e testar a eficiência destes isolados, com o fim de obter inoculantes eficientes para estas áreas, vista a crescente demanda de lavouras de caupi junto a grandes produtores do Cerrado do estado do Piauí e Maranhão.

¹ Reunião da Rede de Laboratórios para Recomendação de Estirpes de Rizóbio

CAPÍTULO I

ESTUDO DA POPULAÇÃO DE RIZÓBIO NODULANTE DE CAUPI EM SOLO DE CERRADO

1. INTRODUÇÃO

A simbiose entre caupi e rizóbio é relatada freqüentemente como sendo de baixa especificidade, pois, reconhecidamente, o caupi é capaz de nodular com pelo menos 5 espécies de rizóbio: *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii*, *Sinorhizobium fredii*, *S. xinjiangensis* e *R. hainanense*, além de um grupo designado como *Bradyrhizobium* tropical ou miscelânea caupi, composto de diversas estirpes de crescimento rápido e lento ainda não identificadas em nível de espécies (Martins, 1996; Mpeperekí et al., 1996). Tem sido observado, também, que apesar do caupi não ser originário do Brasil, é capaz de nodular efetivamente com rizóbios nativos (Martins, 1996; Silva, 1999; Zilli et al. 1999).

De fato, a ocorrência de determinada espécie de rizóbio no solo é determinada pela capacidade da bactéria sobreviver e adaptar-se às condições adversas que ocorrem no solo, assim como à presença da planta hospedeira. Parece consenso, hoje, que os principais fatores ligados à sobrevivência da bactéria no solo sejam a cobertura vegetal, precipitação pluviométrica, teores de nutrientes, temperatura e pH do solo (Singleton et al., 1986).

A estrutura e comportamento da população de rizóbio presente no solo são critérios que precisam ser considerados no momento da seleção de inoculantes (Thies et al., 1991b), pois a densidade, efetividade e habilidade competitiva são características da população de rizóbio nativo que afetam grandemente as respostas de inoculação (Chatel et al. 1968).

Quanto à taxonomia, durante muito tempo, as bactérias denominadas coletivamente de rizóbios, recebeu pouca importância devido a dificuldade de se encontrar parâmetros taxonômicos que pudessem ser empregados para comparar grande número de isolados. Até o início dos anos 80, a caracterização dos rizóbios esteve sempre associada à planta hospedeira com a qual o rizóbio estava associado. A partir daí, no entanto, passaram a ser empregados dados de taxonomia polifásica que abordam uma análise conjunta de dados de morfologia, fisiologia, sorologia e diferentes ferramentas baseadas nos ácidos nucléicos, utilizando métodos estatísticos de avaliação das diferenças e similaridades entre os indivíduos, fornecendo medidas quantitativas de similaridade entre microrganismos. Os resultados desta nova abordagem possibilitaram a descrição de pelo menos 20 novas espécies de rizóbios em pouco mais de uma década. Das ferramentas moleculares que vêm

sendo comumente empregadas na caracterização de rizóbios, destacam-se as baseadas no estudo das seqüências dos RNAs ribossômicos, especialmente o 16S, que possui características importantes para um rápido e confiável estudo de filogenia de microrganismos (Young et al. 1991; Fox et al., 1992; Barrera et al. 1997).

Estudos da população de rizóbio do solo possuem papel fundamental, pois o entendimento da composição, das características simbióticas e adaptativas, bem como da taxonomia da população de rizóbio do solo, podem possibilitar a seleção e introdução de novos inoculantes de rizóbio com maior eficiência simbiótica e capacidade competitiva.

O presente capítulo teve como objetivo avaliar a população de rizóbio nodulante de caupi, cultivado com solo de oito áreas com manejo de solo diferenciado dentro do Cerrado do estado Piauí, de forma a obter subsídios à seleção e utilização de inoculantes para a cultura do caupi nestas áreas. O estudo se baseou na caracterização morfológica de 245 isolados de rizóbio, sendo que 86 destes foram estudados por ARDRA-16S.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – A População de Rizóbio

A população de rizóbio presente em um solo normalmente é pequena, comparada à complexa comunidade microbiana que co-habita com os rizóbios (Akkermans et al. 1994) e, embora tenha existido várias tentativas de quantificar o tamanho e a diversidade desta população em cada ecossistema, é difícil prever a quantidade de células de rizóbios que representam grande população. Isto ocorre, em parte, porque as metodologias existentes são limitadas na maioria dos casos ao uso de plantas hospedeiras para capturar os rizóbios do solo, o que somente avalia a população capaz de nodular o hospedeiro em questão (de Oliveira, 1999).

Em geral, quanto maior a população nativa de rizóbio no solo, mais difícil é a introdução com sucesso da estirpe inoculante (Thies et al., 1991b). Oliveira & Vidor (1984) observaram que em solo com população de *Bradyrhizobium japonicum* superior a 1700 células por grama de solo, a ocorrência da estirpe introduzida nos nódulos era de apenas 8 a 12 %, enquanto, que em solo com população de rizóbio nativo mais baixa, a ocorrência chegou até 96%. Thies et al. (1991b) observou maior influência ainda da população de rizóbio nativa frente a estirpe inoculante. Em experimentos conduzidos no Havaí, com 9 leguminosas diferentes, eles observaram que uma população de rizóbio maior que 50 células por grama de solo inibiu completamente a ocupação nodular pela estirpe inoculante em todas as hospedeiras testadas e abaixo de 10 células rizobianas por grama de solo todas as leguminosas apresentaram rendimentos da produção de grãos significativos.

O rizóbio no solo existe como saprófita, sendo capaz de usar uma grande diversidade de fontes energéticas, de açúcares a compostos fenólicos e, segundo Sprent (1990), a capacidade dos rizóbios ocuparem sítios de infecção nas plantas é o resultado de interações específicas entre as bactérias e entre elas e a planta hospedeira.

O entendimento das características que garantem o estabelecimento da população de rizóbio no solo e a capacidade de competir para a nodulação das plantas é essencial para a otimização da FBN em leguminosas. Tem sido frequentemente observado que inoculantes reconhecidos como eficientes quanto à atividade de FBN não conseguem garantir uma boa nodulação, pois são incapazes de se estabelecer no solo e competir com a microbiota nativa

(Thies et al., 1991b; Ferreira et al., 1999). Desta forma, a introdução de estirpes mais eficientes em um solo contendo população de rizóbio nativa ou naturalizada estabelecida pode ser prejudicada, devido à baixa competitividade e falta de adaptação das estirpes inoculantes às condições ambientais locais (Neves & Rumjanek, 1997). No caso do caupi, esta questão é ainda mais importante, devido à pouca especificidade encontrada em relação ao microssimbionte (Martins, 1996; Mpeperekí et al., 1996).

Existem inúmeros trabalhos de ecologia de rizóbio que tratam da interferência de fatores bióticos (presença de leguminosas, por exemplo) e abióticos (pH, umidade, temperatura, toxicidade e/ou carência de elementos químicos no solo e etc.) sobre a população de rizóbio (Ham et al., 1980; Hirsch, 1996) do solo. Porém, ainda não há uma clareza da correlação entre os diversos fatores que afetam a população de rizóbio e a efetivação da nodulação das plantas. Por exemplo, em sistemas florestais estáveis, devido ao baixo requerimento de nitrogênio no sistema, normalmente observa-se baixa ou até ausente nodulação das leguminosas, o que reduz a números muito baixos a população de rizóbio no solo (de Faria et al., 1984) e, embora haja condições de uma alta diversidade de rizóbio, está, nem sempre é detectada pelos métodos atuais, em função do baixo número de rizóbios presentes.

Em sistemas agrícolas, de um modo geral parece, consenso que a cobertura vegetal com leguminosas, umidade, pH, temperatura e teores de fósforo no solo sejam os fatores que mais influenciam a sobrevivência de rizóbios no solo (Singleton et al., 1986; Yourself et al., 1987; Woomer et al., 1988; Wani et al. 1995; Hirsch, 1996). Contudo outros fatores não menos importantes, mas de menor ocorrência, como por exemplo alta salinidade, carência de micronutrientes e contaminações com metais pesados e resíduos orgânicos também afetam significativamente a população de rizóbio presente no solo.

A presença da planta hospedeira influencia a população de rizóbio na medida em que uma abundante nodulação aumenta o número de rizóbios no solo após a senescência nodular, favorecendo, desta forma, o aumento de uma pequena fração da população de rizóbio clonais. Em consequência, isto reduz a diversidade relativa de rizóbio neste solo, em função da abundância do grupo de rizóbios que nodulou a planta hospedeira presente (Vlassak et al., 1996). Há ainda que se considerar que o ambiente rizosférico pode alterar a

população de microrganismos do solo pela presença de exudados, utilizados no metabolismo microbiano. Contudo, estas alterações são complexas e não-específicas para o grupo dos rizóbios (Miethling et al., 2000).

A dinâmica da água no solo, constituiu-se um fator difícil de ser interpretado isoladamente frente a população de rizóbios, pois ela influencia desde de a temperatura, disponibilidade e mobilidade de elementos químicos no solo, até o próprio sistema como um todo (Hirsch, 1996). A umidade do solo interfere diretamente no metabolismo celular da bactéria e da planta, bem como no processo de FBN, sendo a sua carência ou excesso fator determinante da permanência e multiplicação da bactéria no solo (Harris, 1981; Sanginga et al., 1992). Para Amara (1981) *apud* Martins, (1996) o excesso de água influencia mais o metabolismo da planta e a FBN, devido a falta de oxigênio, do que a sobrevivência da bactéria no solo.

Quanto ao efeito da acidez do solo sobre a população de rizóbio, os estudos são limitados pela dificuldade em se isolar os efeitos nocivos à própria população de rizóbio, desenvolvimento das plantas e ainda estabelecimento e funcionamento da simbiose (Martins et al., 1996). Sabidamente, o pH neutro à levemente alcalino favorece a exudação de carbono pelas raízes das plantas, o que interfere na sobrevivência e competição do rizóbio no solo, pois compostos de carbono são substratos para os microorganismos que vivem na rizosfera (Toro, 1996)

Em solos ácidos, há um aumento na solubilidade de Al^{+3} e Mn^{+2} e diminuição da concentração de fosfatos, Ca^{+2} e molibdatos. Em especial o alumínio, é um dos elementos que tem demonstrado grande interferência na FBN, isto porque é capaz de influir negativamente sobre o rizóbio, planta e simbiose. Segundo Munns & Keyser (1981), o alumínio reduz a atividade das células de rizóbio próximas a divisão celular, aumentando o tempo de geração de células. Com isto há uma queda na população de rizóbio, uma vez que a taxa de mortalidade se torna mais alta que a multiplicação celular. Isto sob o ponto de vista de Wani et al. (1995), representa um fator limitante à sobrevivência e ao estabelecimento do rizóbio no solo.

A faixa de pH para a sobrevivência do rizóbio e a efetivação da nodulação parece não ser uma regra, pois observa-se que a população de *Bradyrhizobium* nodulante de siratro

(*Macropitilium atropurpureum*) sobrevive no solo em uma faixa de pH entre 4.9 a 7.9 (Woomer et al., 1988), enquanto que para o amendoim, também nodulado por *Bradyrhizobium*, a faixa de pH onde a população de rizóbio se manteve capaz de nodular foi mais elevada e estreita, entre 7.6 a 8.1, (Yorself et al., 1987). Para a cultura do caupi, Mpepereki et al. (1996) não observaram diferenças na tolerância ao pH do meio de cultura entre estirpes de crescimento rápido e lento, supostamente *Bradyrhizobium*, que cresceram bem até em pH 4.0. Quanto ao gênero *Rhizobium* Wolff et al. (1991) demonstraram que a taxa de ocupação dos nódulos pela estirpe *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, quando introduzida em solo ácido foi mais baixa do que observada em solos férteis e neutros.

Trabalhos desenvolvidos no Quênia, em dois solos com diferentes níveis de acidez, mostraram que os solos abrigavam uma população de rizóbio capaz de nodular feijão, semelhantes quanto a número, efetividade de FBN e diversidade genética. A composição desta população era, no entanto, diferente: estirpes semelhantes a *R. tropici* predominavam no solo de maior acidez, enquanto que estirpes semelhantes a *R. leguminosarum* e *R. etli* predominavam no solo menos ácido (Anyango et al. 1995). A melhor tolerância à acidez pelo *Rhizobium tropici* foi observada também em outras regiões (Amarger et al., 1994).

A temperatura do solo é uma variável ambiental que afeta geralmente a atividade biológica dos rizóbios e seus hospedeiros. Segundo Toro, (1996) a faixa de temperatura do ambiente considerada ótima para a maioria das leguminosas nodularem abundantemente varia entre 20⁰ a 30⁰C. Para as leguminosas temperadas, a alta temperatura, além de afetar a FBN, afeta a própria planta, enquanto que em leguminosas tropicais o que é principalmente afetado é a eficiência da FBN. Baixas temperaturas reduzem a formação de nódulos e a fixação de nitrogênio em leguminosas de clima tropical (Padmanabhan, 1990).

O fósforo limita o crescimento dos rizóbios. Níveis baixos desse elemento constituíram-se em limitações ao crescimento do rizóbio em meio de cultura (Cassman et al., 1981), assim como também no número, massa e funcionamento de nódulos em plantas de caupi em experimento de casa de vegetação (Othman et al., 1991). Okeleye & Okelana (1997) observaram o efeito da aplicação de fósforo (0, 30 e 60kg.ha⁻¹), em um experimento conduzido no campo, onde mostraram resultados significativamente maiores para nodulação, acúmulo de matéria seca e produção de grãos em 6 cultivares de caupi.

Resultados concordantes a estes também foram obtidos por Ankomah et al. (1996), utilizando dois níveis de P (0 e 50mg.kg⁻¹ de solo). Eles observaram que a cultivar de caupi Soronko, quando recebeu P e foi inoculado, acumulou cerca de 76% do N via fixação biológica, avaliada através da diluição isotópica de ¹⁵N, e que o rendimento de matéria seca foi cerca de 47% maior do que o tratamento sem P. Segundo os autores, estes resultados indicam que certas cultivares de caupi são capazes de suprirem suas necessidades de N, via FBN em solos com média fertilidade, onde ocorre moderados teores de P.

O excesso de N reduz a nodulação de plantas e o processo de FBN (Sanginga et al., 1995; Stanford et al., 1995). A planta apresenta uma economia de energia quando obtém N do solo em comparação a obtenção via FBN e desta forma, preferencialmente, a planta utiliza N disponível no solo em detrimento da formação do processo de FBN. Contudo, a existência de estirpes de rizóbio capazes de fixar N, mesmo em condições de alto teor de N no solo, mostra que o efeito se dá também sobre a bactéria (Fernandez et al., 1986). Estes autores avaliaram a interação entre a inoculação e doses crescentes de N (0, 14, 28 e 84kg. ha⁻¹) em 5 cultivares de caupi no Texas. Sem a aplicação de N, a inoculação aumentou significativamente a nodulação, a atividade da nitrogenase, e a matéria seca da planta. A nodulação e a atividade da nitrogenase apresentaram uma correlação linear negativa com o aumento dos níveis de N em plantas inoculadas. Plantas inoculadas produziram mais matéria seca do que o controle nas doses de 0 e 14kg.ha⁻¹ de N. Nenhuma diferença entre às cultivares foi observada para produtividade de grãos, exceto para uma cultivar que apresentou menor produtividade, e além disso, a adição de doses crescentes de nitrogênio não acarretou em aumento de produtividade. Awonaike et al. (1990) observaram larga variação genotípica das plantas hospedeiras nos parâmetros ligados a fixação de N₂, quando cultivares de caupi inoculadas e não-inoculadas foram expostas a doses de N inorgânico (20 e 100kg.ha⁻¹ de N). A cultivar IT84E124 apresentou uma maior fixação em ambas as doses de N, ao passo que a cultivar AFB 1757 somente no nível mais alto. A cultivar TVx3236 não apresentou efeito na fixação. Em média, a fixação de N₂ nestas associações caupi/*Bradyrhizobium* não foram inibidas pelas altas doses de N, sendo 54,5 e 65,4kg.ha⁻¹ de N fixado à 20 e 100kg.ha⁻¹ de N respectivamente aplicado.

O efeito da salinidade foi recente revisto por Swaraj & Bishnoi, (1999) e tem grande importância em ecossistemas áridos, pois as leguminosas presentes nestes ecossistemas, como por exemplo o caupi, podem se adaptar e fixar N eficientemente. O efeito inibitório da salinidade na nodulação tem sido atribuída ao decréscimo na colonização do rizóbio e à baixa deformação dos pelos radiculares. O estresse salino induz também a senescência precoce de nódulos e da atividade da nitrogenase (Swaraj & Bishnoi, (1999).

A contaminação do solo tem sido citada como um problema para a manutenção da biodiversidade de rizóbio no solo. Hirsch et al. (1993) encontraram grande alteração na população de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* após uma longa exposição a metais pesados provocada pela aplicação de lodo de esgoto. Eles observaram que estirpes agronomicamente importantes, capazes de se associar eficientemente com trevo vermelho e branco foram substituídas por estirpes ineficientes na simbiose com trevo branco. Os perfis de plasmídeos das estirpes ineficientes eram idênticos entre si e diferentes dos perfis das estirpes eficientes, o que aponta para uma alteração da diversidade genética de rizóbio.

A aplicação de dejetos animais também pode influenciar a população de rizóbio no solo. Labes et al. (1996) analisaram a qualidade do solo através da população de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*, utilizando para isto uma área coberta com gramíneas, à qual foi aplicado dejetos bovinos durante 5 anos. Para identificar os diversos grupos genotípicos, eles utilizaram a técnica de PCR-ERIC¹ em estirpes que formaram nódulos em ervilha, cultivada em amostras de solo coletadas de áreas enriquecidas, ou não, com dejetos. Depois da comparação dos dados de “fingerprint”, 24 grupos de estirpes de rizóbios foram distinguidos, onde os autores observaram que os grupos obtidos na área não poluída tiveram seu crescimento suprimido na área poluída, tendo ocorrido, desta forma, uma alteração na estrutura da população de rizóbio nas áreas que receberam os dejetos.

¹ Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus

2.2 - A Taxonomia de Rizóbios

Durante muito tempo a taxonomia de microrganismos recebeu pouca importância, em vista das dificuldades de classificação impostas pelos métodos tradicionais, baseados essencialmente em características morfológicas e fisiológicas. As primeiras modificações nestes estudos começaram a se constituir quando da adoção dos métodos de taxonomia polifásica. Esta abordagem permite a análise conjunta de dados de fisiologia, morfologia, sorologia e pode utilizar diferentes ferramentas baseadas nos ácidos nucleicos, utilizando métodos estatísticos de avaliação das diferenças e similaridades entre os diferentes táxons, de forma mais rigorosa e fornecendo medidas quantitativas de similaridade entre microrganismos. Segundo Bull et al. (1992), este tipo de estudo, além de contribuir para avaliação da biodiversidade no ambiente, fornecem informações a cerca da expressão de características fisiológicas que podem ser correlacionadas com fatores ambientais.

Nos últimos anos a taxonomia das bactérias fixadoras de nitrogênio tem sofrido substanciais revisões, devido ao advento dos métodos moleculares de análises filogenéticas (Young et al. 1994). Estes métodos têm se revelado ferramentas poderosas nos estudos filogenéticos e são capazes de distinguir organismos de forma rápida e confiável. (Laguerre et al., 1996).

Atualmente, para a definição de novas espécies, recomenda-se o uso da taxonomia polifásica, a qual integra diferentes tipos de informação fenotípicas, genotípicas e filogenéticas dos microrganismos (Graham et al. 1991). Estes autores recomendam para a definição de uma nova espécie, a avaliação do desempenho simbiótico das estirpes, caracterização morfológica e fisiológica, estudo da homologia DNA:DNA, análise do 16S rRNA, RFLP¹ e MLEE².

Como resultados destes estudos tem-se definido até o presente momento seis gêneros de bactérias que estabelecem nodulação com leguminosas, (Tabela 01): *Allorhizobium* (de Lajudie et al. 1998a), *Azorhizobium* (Dreyfus et al. 1988), *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982; 1984), *Sinorhizobium* (Chen et al., 1988; de Lajudie et al., 1994) e *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1997).

¹ Restriction Fragment Length Polymorphism

² Multilocus Enzyme Electrophoresis

Tabela 1 - Gêneros e espécies de rizóbios relacionados com seus principais hospedeiros.

Gênero	Espécie	Hospedeiro*	Referência**
<i>Allorhizobium</i>	<i>A. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>	de Lajudie et al., 1998a
<i>Azorhizobium</i>	<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Dreyfus et al., 1988
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine</i> spp., <i>Vigna unguiculata</i>	Kuykendall et al., 1992
	<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine</i> spp., <i>V. unguiculata</i> , <i>Macroptilium atropurpureum</i>	Jordam, 1982 e 1984
	<i>B. liaoningense</i>	<i>Glycine</i> spp.	Xu et al., 1995
<i>Mesorhizobium</i>	<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>	Wang et al., 1999
	<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Nour et al., 1994
	<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>	Chen et al., 1991 e 1997
	<i>M. loti</i>	<i>Lotus</i> spp.	Jarvis et al., 1982 e 1997
	<i>M. mediteraneum</i>	<i>C. arietinum</i>	Nour et al., 1995
	<i>M. plurifarium</i>	<i>Acacia</i> spp., <i>Leucaena</i> spp.	de Lajudie et al., 1998b
	<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza</i> spp., <i>Halimodendron. holodendron</i> , <i>Sophora</i> spp. <i>G. max</i>	Chen et al., 1995
<i>Rhizobium</i>	<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Segovia et al., 1993
	<i>R. gallicum</i>	<i>P. vulgaris</i>	Amarger et al., 1997
	<i>R. galegae</i>	<i>Galega</i> spp.	Lindström et al., 1989
	<i>R. giardini</i>	<i>P. vulgaris</i>	Amarger et al., 1997
	<i>R. hainanense</i>	<i>Stylosantes</i> sp., <i>Cetrosema</i> sp. <i>Tephrosia</i> sp., <i>Desmodium</i> <i>sinuatum</i> , <i>V. unguiculata</i>	Chen et al., 1997
	<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbaceae</i>	Wang et al., 1998
	<i>R. leguminosarum</i>	<i>P. vulgaris</i>	Jordam et al., 1984***
	<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica</i>	van Berkum et al., 1998
	<i>R. tropici</i>	<i>P. vulgaris</i> , <i>Leucaena</i> sp.	Martinez-Romero et al., 1991
<i>Sinorhizobium</i>	<i>S. arboris</i>	<i>Acacia senegal</i> , <i>Prosopis</i> <i>chislensis</i>	Nick et al., 1999
	<i>S. fredii</i>	<i>P. vulgaris</i> , <i>Glycine</i> spp. <i>V. unguiculata</i> , <i>Cajanus cajan</i>	Scholla, 1984 e de Lajudie et al., 1994
	<i>S. kostiense</i>	<i>Acacia senegal</i> , <i>Prosopis</i> <i>chislensis</i>	Nick et al., 1999
	<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago sativa</i>	Jarvis et al., 1992 e de Lajudie et al., 1994
	<i>S. medicae</i>	<i>Medicago</i> spp.	Rome et al., 1996
	<i>S. saheli</i>	<i>Sesbania</i> spp., <i>Acacia</i> spp., <i>L. leucocephala</i> , <i>N. oleracea</i>	de Lajudie et al., 1994
	<i>S. teranga</i>	<i>Sesbania</i> spp., <i>Acacia</i> spp., <i>L. leucocephala</i> , <i>N. oleracea</i>	de Lajudie et al., 1994
	<i>S. xinjiangensis</i>	<i>Glycine</i> spp., <i>V. unguiculata</i> , <i>C. cajan</i>	Chen et al., 1988

* Os hospedeiros apresentados foram citados pelos descritores das espécie de rizóbio;

** As referências citadas são dos descritores de cada espécie de rizóbio;

*** De acordo com Young (1999) a primeira caracterização foi realizada por Frank (1879).

Allorhizobium – inclui apenas uma espécie reconhecida formalmente, *A. undicola*, descrita recentemente para um grupo de isolados que nodulam caule de *Neptunia natans* (de Lajudie et al. 1998a).

Azorhizobium – Segundo Young et al. (1996), este gênero possui muitas características distintas dos outros gêneros, inclusive o 16S rDNA e até o presente momento tem-se apenas uma espécie descrita, *Azorhizobium caulinodans*, que é capaz de formar nódulos no caule e raízes de *Sesbania rostrata* (Dreyfus et al., 1988).

Bradyrhizobium – Este gênero sempre foi objeto de muitas controvérsias. Todas as estirpes de *Bradyrhizobium* que nodulam soja efetivamente eram até pouco tempo atrás reconhecidas como *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982). Porém Kuykendall et al. (1992) definiram uma nova espécie, a *B. elkanii* para o grupo II das estirpes de *B. japonicum*, um subgrupo também capaz de nodular soja, que se distingue de *B. japonicum* em análises de homologia do DNA, RFLP, perfil de ácidos graxos, resistência a antibióticos, composição de exopolissacarídeos e sequência do 16S rRNA. No entanto um grande grupo de estirpes de *B. japonicum* apresentavam-se ainda muito diversas, o que levou Xu et al. (1995), a proporem a espécie *B. liaoningense*, distinta das demais, por critérios de hibridação DNA-DNA, além de possuir uma taxa de crescimento excepcionalmente lenta. Segundo Young et al. (1996), existem ainda muitas estirpes de rizóbio que se assemelham ao gênero *Bradyrhizobium* e que não nodulam soja. De fato, estirpes com semelhança a *Bradyrhizobium* e com grande diversidade genotípica e fenotípicas, tem sido freqüentemente relatadas dentro dos diversos gênero de leguminosas (Barrera et al., 1997).

Mesorhizobium – Durante muito tempo observou-se que *R. loti* (Jarvis et al. 1982) era distinto dos demais rizóbios de crescimento rápido. Esta evidência foi constatada pela análise da sequência do 16S rDNA (Jarvis et al. 1997). Este gênero atualmente engloba as espécies *M. ciceri*, *M. loti*, *M. huakuii*, *M. mediterraneum* e *M. tianshanense* transferidas do gênero *Rhizobium* (Young et al., 1996) e, *M. plurifarium* (de Lajudie et al. 1998b) e *M. amorphae* (Wang et al., 1999).

Rhizobium – Este gênero tem sofrido diversas alterações, especialmente porque até pouco tempo atrás, englobava todas as estirpes de crescimento rápido não pertencentes ao

gênero *Bradyrhizobium*. Nos últimos anos, este gênero foi intensamente estudado e foram definidos dois novos gêneros: *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium*. Reconhecidamente, este gênero engloba nove espécies: *R. etli*, *R. galegae*, *R. gallicum*, *R. giardini*, *R. hainanense*, *R. huautlense*, *R. leguminosarum* (vários biovars), *R. mongolense* e *R. tropici* (tipo I e II). Segundo Young (1996), as espécies *R. etli*, *R. leguminosarum* e *R. tropici* são muito semelhantes entre si, enquanto a *R. galegae* possivelmente deva originar um novo gênero devido suas distinções genotípicas.

Sinorhizobium – de Lajudie et al. (1994) propuseram a transferência de *R. meliloti* e *R. fredii* para um novo gênero, que já havia sido proposto por Chen et al. (1988), destacando as diferenças entre *R. fredii* e as demais espécies de rizóbio. Jarvis et al. (1992) mostraram esta semelhança entre *R. fredii* e *R. loti* e ainda reconheceram a inclusão de duas novas espécies neste gênero, a *S. saheli* e *S. teranga*. Este gênero engloba atualmente oito espécies: *S. arboris*, *S. fredii*, *S. kostiense*, *S. medicae*, *S. meliloti*, *S. saheli*, *S. teranga* e *S. xinjiangensis*.

2.3 - O Grupo *Bradyrhizobium* Tropical ou Miscelânea Caupi

Até o início da década de 80, a classificação dos rizóbios era baseada no grupo de leguminosas hospedeiras com o qual as bactérias estabeleciam nodulação. Apenas o gênero *Rhizobium* estava descrito, sendo a espécie definida pela leguminosa a qual a bactéria nodulava. No entanto, inúmeras inconsistências taxonômicas, dentre elas a taxa de crescimento das bactérias, levaram Jordam et al. (1982) a proporem a divisão dos rizóbios em dois gêneros: o *Rhizobium*, compreendendo as bactérias de crescimento rápido e o *Bradyrhizobium* para as bactérias de crescimento lento. Dentro do gênero *Bradyrhizobium*, foi classificada a espécie *B. japonicum*, antiga *R. japonicum*, que nodula eficientemente soja e, *Bradyrhizobium* spp. ou *Bradyrhizobium* tropical, anteriormente classificado como *Rhizobium* tropical, englobando um grupo de bactérias geneticamente heterogêneas entre si e, sem uma leguminosa hospedeira específica conhecida.

Segundo Thies et al. (1991a), a adoção da concepção errônea de que leguminosas tropicais não apresentam especificidade simbiótica com rizóbios levou durante muitos anos a recomendações equivocadas de inoculantes. Este fato também foi reportado por Burton

(1979), que desenvolveu um estudo com *Vigna unguiculata*, *Macroptilium atropurpureum*, *Arachis hypogaea* e *Phaseolus lunatus*, observando que *V. unguiculata* e *M. atropurpureum* eram nodulados por estirpes com alta homologia, o que também foi observado entre as outras duas espécies leguminosas. Porém, isto não ocorria entre estirpes de *V. unguiculata* e *M. atropurpureum* com *A. hypogaea* e *P. lunatus* e vice-versa. Desta forma, este autor definiu grupos de leguminosas com nodulação efetiva, sendo um compreendido por *V. unguiculata* e *M. atropurpureum* e outro por *A. hypogaea* e *P. lunatus*. Este autor também sugeriu o termo “Miscelânea Caupi”, para as inúmeras estirpes de rizóbio isoladas de leguminosas tropicais. Estes resultados foram posteriormente confirmados também por Thies et al. (1991a).

Reconhecidamente, o caupi é capaz de nodular com as espécies *Rhizobium hainanensis* (Chen et al. 1997), *R. etli*, *Sinorhizobium fredii*, *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii* (Neves & Rumjanek, 1997). Isto, por si só, já caracteriza uma baixa especificidade de nodulação do caupi, uma vez que a associação engloba 3 diferentes gêneros de rizóbio. Alta diversidade entre as estirpes nodulantes de caupi tem sido observada com frequência (Martins et al., 1996). Estes autores realizaram um massivo isolamento de rizóbios nodulantes de caupi no nordeste brasileiro e observaram alta diversidade entre os isolados, sendo que pelo menos 25% eram de crescimento rápido.

Mpeperekí et al. (1996), estudaram a simbiose entre 59 estirpes de rizóbio obtidas de nódulos de caupi e 9 estirpes-referência de rizóbios inoculadas em 12 leguminosas tropicais. Em todos os grupos de bactérias haviam estirpes de crescimento lento e rápido. Os resultados indicaram que estirpes de rizóbio nativas apresentaram uma estreita faixa de hospedeiros (em média 2,4 hospedeiros para as estirpes de crescimento rápido e 2,3 hospedeiros para estirpes de crescimento lento). As principais conclusões foram de que o caupi é capaz de nodular com uma grande diversidade de rizóbios, uma vez que nodulou com todas as estirpes testadas, inclusive a estirpe MAR1380 isolada do gênero *Phaseolus*. Porém, ao contrário do que se esperava, as estirpes de rizóbio nativas isoladas de caupi apresentaram estreita faixa de hospedeiros, sugerindo que possa ter ocorrido uma evolução convergente entre caupi e as estirpes de rizóbio nativas (Lie et al., 1987).

De uma maneira geral, o grupo de rizóbios “miscelânea caupi” é bastante heterogêneo, caracterizado por um alto nível de promiscuidade simbiótica, apresentando como principais características, crescimento lento e reação de pH alcalina em meio de cultura (Martins et al., 1996). Porém, inúmeras inconsistências tem sido encontradas. Zablotowich (1981) reportou o isolamento de estirpes com crescimento rápido capazes de nodular caupi e soja. Martins (1996), em seu trabalho de tese com estirpes isoladas de várias regiões do nordeste brasileiro, utilizando o caupi como planta isca, observou que os isolados obtidos da região semi-árida mostraram uma proporção maior de estirpes de crescimento rápido do que os isolados da Zona da Mata. Provavelmente, estes resultados são decorrentes do fato de rizóbios de crescimento rápido sobreviverem melhor as condições adversas do ambiente (Sprent, 1994), o que pode ser uma importante alternativa para inocular leguminosas, como o caupi, em regiões tropicais.

A perspectiva é de que alterações na taxonomia dos rizóbios ainda devam ocorrer, principalmente, no grupo dos rizóbios que nodulam as leguminosas tropicais, seja através da aplicação de técnicas moleculares ou através da combinação de características morfológicas e genotípicas que ofereçam maior discriminação no estudo de diversidade (Silva, 1999).

À medida em que aumenta o uso de técnicas de biologia molecular e imunologia, mais dados sobre a heterogeneidade e divergências entre os diferentes grupos de rizóbio são revelados, principalmente em relação aos rizóbios associados a leguminosas tropicais. Silva (1999), com base na técnica de ARDRA, encontrou uma diferença de 2% entre a sequência de bases nucleotídicas do DNA de *Bradyrhizobium japonicum* e os isolados de rizóbio com crescimento lento obtidos de nódulos de caupi na região amazônica, o que sugere que este grupo represente uma nova espécie dentro deste gênero.

De maneira geral, quando introduz-se uma leguminosa exótica em um solo, nem sempre é verificado uma efetiva nodulação com estirpes de rizóbios nativas. No caso da soja, Vargas et al. (1982) reportaram a ausência de formação de nódulos por estirpes nativas em solos brasileiros. Entretanto, resultados mais recentes mostraram a existência de isolados de rizóbio nodulantes de soja em áreas jamais cultivadas com soja (Martins, 1996; Ferreira & Hungria, 2000). No caso do caupi, trabalhos realizados na Amazônia (Silva,

1999), Mata Atlântica, RJ (Zilli et al. 1999) e nos Cerrados (Vargas & Hungria, 2000) citam a ocorrência de nodulação com estirpes isoladas de áreas onde não havia histórico de cultivo desta cultura, condizendo com a ampla faixa de nodulação deste hospedeiro.

Mercante (1997) realizou um trabalho de levantamento da diversidade genética de rizóbio nodulante de feijão em solos de Cerrado, utilizando como planta isca o feijão e a leucena. Os resultados mostraram a existência de ampla diversidade de rizóbios, que foi confirmada com uso de sondas para genes específicos, as quais detectaram a presença de 3 diferentes espécies de rizóbio: *Rhizobium etli*, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e *R. tropici* e também mostraram que 10% dos isolados de leucena e 49% de feijão não se agruparam com nenhuma espécie de rizóbio descrita até o momento.

2.4 - Análise Molecular Baseada no 16S rDNA

Os ribossomos são organelas compostas de proteínas e três diferentes tipos de rRNA, onde ocorre a tradução do mRNA durante a síntese de proteínas. Nos Procariotos, os ribossomos possuem um coeficiente de sedimentação 70S e divide-se em duas subunidades, uma menor 30S, composta de 20 proteínas e o 16S rRNA e uma maior 50S, que é composta por 30 proteínas e 2 rRNAs, o 23S e o 5S (Jinks–Robertson & Nomura, 1987, *apud* Haukka, 1997).

O número de operons dos genes ribossomais em cada organismo é variável. Bactérias possuem entre 1 e 15 operons por genoma, enquanto que em Eucariotos podem ser encontrados centenas ou até milhares por genoma (Codon et al. 1992). Particularmente, a maioria das espécies de rizóbios possuem apenas um operon contendo os genes ribossomais, porém em *S. meliloti*, *R. leguminosarum* e *R. galegae* já foram encontrados até três (Haukka, 1997).

Cópias de um mesmo gene, contido em diferentes operons, tendem a apresentar seqüências de nucleotídeos idênticas, porém estudos de seqüenciamento do 16S rDNA tem demonstrado a presença de pequenas variações entre os diferentes operons em um mesmo organismo (Haukka, 1997). Cilia et al. (1996) encontraram 4 seqüências distintas quando analisaram 7 cópias do gene 16S rDNA da estirpe PK3 de *Escherichia coli*. Segundo Haukka (1997), estas mutações ocorrem somente em domínios variáveis, dispersos ao

longo do gene e diferentes seqüências para um mesmo gene podem limitar o uso desta molécula em estudos taxonômicos. Contudo, o baixo número de operons do 16S rDNA em rizóbios constituiu-se em uma característica favorável para o estudo do polimorfismo da população de rizóbio, pois a interferência de um operon em outro, durante um estudo é reduzida.

A estrutura primária da molécula do 16S rRNA é altamente conservada e espécies que possuem 70% ou mais de homologia DNA:DNA, normalmente possuem mais de 97% de identidade em suas seqüências (Straliotto & Rumjanek, 1999). Esta diferença de 3% dos nucleotídeos não está distribuída ao longo da estrutura primária da molécula, mas sim concentrada em regiões hipervariáveis (Stackebrandt & Goebel, 1994 *apud* Straliotto & Rumjanek, 1999). Alguns autores defendem o estudo das diferenças na similaridade apenas nestas regiões, como medida da distância filogenética entre estirpes. No entanto, há argumentos contrários a esta escolha, uma vez que a quantidade de nucleotídeos diferentes, concentrados em outras regiões é substancial e por omissão se poderia perder informações, que em termos estatísticos, já são bastante escassas (Stackebrandt et al., 1992). Além disso, as regiões hipervariáveis são específicas de cada táxon e precisam ser determinadas para cada novo organismo pelo seqüenciamento completo da molécula (Stackebrandt et al., 1992).

Nos últimos anos, as técnicas baseadas no gene 16S rDNA têm ganho vasta importância na detecção, identificação, classificação e filogenia de bactérias, tanto as associativas, como as de vida livre (Woese, 1987). As principais vantagens deste gene, é o fato de ocorrer em todos os organismos Procariotos, possuir 1500 bases; tamanho conveniente para o seqüenciamento de nucleotídeos e, também pela existência de grande número de trabalhos de seqüenciamento de DNA, que têm depositado diversas seqüências do gene 16S rDNA de rizóbios em base de dados internacionais, que podem ser acessados pela comunidade científica para a comparação e análise de dados.

A caracterização da seqüência do 16S rDNA tem sido amplamente utilizada em estudos evolucionários, taxonômicos e ecológicos, não apenas para definir táxons, mas também para detectar a presença de determinados táxons (Fox et al., 1992; Olsen et al., 1994). Comparações entre as seqüências completas ou parciais de nucleotídeos do 16S

rDNA têm sido também amplamente utilizadas para avaliar relações filogenéticas entre muitas espécies de rizóbio (Lagurre et al. 1993; van Berkum et al., 1996; Barrera et al., 1997).

Para avaliações filogenéticas de uma forma mais rápida, tem sido utilizada com sucesso, a análise de fragmentos de restrição do 16S rDNA (ARDRA – 16S rDNA) (Ralph et al., 1993; Laguerre et al., 1994, 1996; Haukka, 1997; Silva, 1999). Lageurre et al. (1994) realizaram um estudo com bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Agrobacterium* e observaram que a análise dos fragmentos de restrição forneceu informações filogenéticas muito próximas às obtidas pela classificação baseada na homologia DNA:DNA e sequenciamento completo do 16S rDNA. Estes autores recomendam a amplificação do 16S rDNA, seguido de restrições com endonucleases específicas, como um método que permite a identificação de espécies bacterianas do grupo dos rizóbios, de forma rápida e econômica, podendo ser empregado para analisar um grande número de estirpes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Coletas de Amostras de Solo

As amostras de solo foram coletadas no mês de maio de 1999 pelo Dr. Francisco Rodrigues Freire Filho (Embrapa Meio - Norte), em oito áreas de Cerrado com histórico de manejo distinto (Tabela 2), nos municípios de São Domingos do Azeitão e Bom Jesus, ambos no estado Piauí. As coletas foram realizadas de 0-20cm de profundidade e cada amostra composta foi constituída de pelo menos 10 sub-amostras. Após a coleta as amostras foram armazenadas em geladeira e enviadas para o laboratório de Ecologia Molecular Microbiana (Embrapa Agrobiologia), onde imediatamente procedeu-se o cultivo das plantas isca.

Tabela 2 – Descrição do histórico de manejo empregado em cada uma das áreas de Cerrado do Estado do Piauí utilizadas para o estudo.

Áreas	Município	Histórico de manejo das áreas
01	Bom Jesus	3 anos de cultivos: 97 – arroz, 98 – soja e 99 - soja
02	S. D. Azeitão	2 anos de cultivos: 98 e 99 com cultivo de arroz
03	S. D. Azeitão	5 anos de cultivos: 95 a 97 – arroz, 98 – soja e 99 – caupi
04	Bom Jesus	3 anos de cultivo: 97 – arroz, 98 – soja e 99 - arroz
05	S. D. Azeitão	1 ano de cultivo: até 98 – capim e 99 – soja
06	Bom Jesus	Cerrado Clímax
07	S. D. Azeitão	7 anos de cultivos: 93 a 96 – arroz, 97 e 98 – soja e 99 – caupi
08	Bom Jesus	3 anos de cultivo: 97 - arroz, 98 – soja e 99 - caupi

3.2 - Cultivo das Plantas Isca

Para capturar os rizóbios presentes nas amostras de solo foi realizado um experimento em casa de vegetação, usando-se uma proporção de areia esterilizada e solo (2:1; 200g:100g). Foram utilizadas três cultivares de caupi (BR14, CE315 e BR17), com duas repetições para cada amostra de solo, representativa de cada uma das área utilizadas para o estudo. As sementes do caupi foram previamente lavadas com etanol (100%; 30 segundos) para reduzir a tensão superficial das sementes, seguido de uma desinfestação superficial com peróxido de hidrogênio (5%; 3 minutos) e 10 lavagens sucessivas com água esterilizada. As sementes livres de contaminantes foram semeadas nos vasos (300 ml)

previamente preparados. A irrigação foi realizada com água esterilizada, quando necessário e os nutrientes foram fornecidos semanalmente através de 250 ml.vaso⁻¹ da solução nutritiva Norris e Döbereiner: KCl (2mM); K₂HPO₄ (0,3mM); KH₂PO₄ (0,7mM); CaSO₄.5H₂O (0,3μM); ZnSO₄.7H₂O (0,7μM); MnSO₄ (1μM); (NH₄)₆ Mo₇O₂₄.4H₂O (0,002μM); H₃BO₃ (11,5μM); FeSO₄.7H₂O (17,9μM); ácido cítrico (26μM). Os nódulos foram coletados 40 dias após a semeadura e estocados em sílica gel na temperatura ambiente.

3.3 - Isolamento de Nódulos, Caracterização e Agrupamento Morfológico dos isolados

Foi realizado o isolamento de cerca de 5% dos nódulos (pelo menos 10 nódulos) de cada tratamento. Inicialmente, os nódulos foram reidratados por algumas horas, sendo em seguida realizado uma lavagem com etanol (100%; 30 segundos) para reduzir a tensão superficial, seguido de uma desinfestação superficial com hipoclorito de sódio (5%; 4 minutos) e 10 lavagens com água esterilizada. Em seguida, os nódulos foram pressionados com uma pinça sobre o meio YMA (Fred & Waksman, 1928), com azul de bromotimol (0,5%), contido em placa de Petri. Após o isolamento, as placas foram incubadas a 28⁰C até o apareciemnto de colônias, quando então as mesmas foram repicadas para novas placas contendo o mesmo meio e novamente inocubadas a 28⁰C. Nesta etapa, o aparecimento das colônias nas placas foi observado do primeiro ao sexto dia após a repicagem.

A caracterização morfológoca dos isolados foi realizada segundo Vincent (1970), avaliando-se o tempo de crescimento de cada um dos isolados, sendo considerado: crescimento lento (4 dias ou mais) ou rápido (até três dias); pH do meio após o crescimento das bactérias, observado pela coloração do meio de cultura contendo azul de bromotimol (alcalino, ácido e neutro); tamanho (mm), forma (circular ou irregular), borda (inteira ou irregular), transparência e cor das colônias. Quanto ao muco produzido pelas células, foram avaliados os aspectos: quantidade (muito ou pouco), aderência à alça de platina, observada pela remoção do muco da superfície do meio de cultura (sim ou não) e elasticidade, observada a formação ou não de fio, no momento da remoção do muco do meio de cultura (sim ou não).

A partir da classificação morfológica, calculou-se uma matriz de similaridade com o coeficiente *Simple Matching* (Rohlf, 1994) e agrupou-se os isolados em um dendrograma utilizando-se o algoritmo *UPGMA* (Unweighted pair-group method) (Rohlf, 1994).

3.4 – Teste de Nodulação

Os testes de nodulação foram conduzidos em casa de vegetação, onde as sementes do caupi foram previamente lavadas com etanol (100%), desinfestadas superficialmente com peróxido de hidrogênio (5%; 3min), lavadas com água esterilizada por 10 vezes e posteriormente plantadas em vasos de Leonard, contendo areia e vermiculita (2:1; areia: vermiculita). Cada tratamento foi conduzido com três repetições inteiramente casualizadas.

Isolados oriundos de cada um dos grupos morfológicos foram escolhidos para a avaliação da capacidade de nodulação, sendo que todos os isolados de crescimento rápido foram testados, assim como as estirpes referência *Bradyrhizobium elkanii* (BR29), *B. japonicum* (BR111; LMG6131^T), *Sinorhizobium fredii* (BR112; LMG6217^T), *Rhizobium tropici* IIA (BR10016; CFN299^T), *R. etli* (BR10026; CFN42^T) e *Azorhizobium caulinodans* (BR5410; CFN299^T).

Os inoculantes foram cultivados em 75ml do meio de cultura YMA líquido (Fred & Waksman, 1928), contido em erlenmeyers e incubados por três dias a 28⁰C com agitação (120 rpm).

Três dias após a germinação, as plântulas foram inoculadas com 1 ml do inoculante e semanalmente adicionou-se 250 ml da solução nutritiva de Norris e Döbereiner. Após quarenta dias, o experimento foi coletado, onde registro-se a formação de nódulos.

3.5 - Escolha dos Isolados a Estudados por ARDRA

A escolha foi realizada levando-se em consideração o grupo morfológico, obtido pelo agrupamento UPGMA, de cada isolado, a cultivar de caupi da qual ele foi obtido e a área amostrada, de modo que dentro de um mesmo grupo morfológico, todos os isolados procedentes de áreas e/ou cultivares de caupi diferentes fossem analisados.

3.6 – Preparação das Amostras e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Foram utilizados cerca de 86 isolados de rizóbio provindos do Cerrado, escolhidos a partir das características morfológicas e seis estirpes referência *Bradyrhizobium elkanii* (BR29), *B. japonicum* (BR111; LMG6131^T), *Sinorhizobium fredii* (BR112; LMG6217^T), *Rhizobium tropici* IIA (BR10016; CFN299^T), *R. etli* (BR10026; CFN42^T) e *Azorhizobium caulinodans* (BR5410; CFN299^T).

A preparação das amostras foi realizada de acordo com Haukka (1997). Inicialmente, as bactérias foram cultivadas em meio YMA (Fred & Waksman, 1928) sólido (28^oC; 3 a 4 dias). Em seguida, uma pequena fração das colônias (1 ou 2 alçadas), foi suspensa em 1 ml de água deionizada esterilizada em vortex até a suspensão tornar-se homogênea, quando então, transferiu-se 20 a 50µl da suspensão para um outro tubo, contendo 50 a 80µl de água deionizada esterilizada. Subseqüentemente, as amostras foram aquecidas em banho-maria (10 minutos; 100 ^oC) para lise das células e incubadas em gelo (20 - 30 minutos). Como DNA-alvo, utilizou-se 25µl da suspensão de células lisadas em volume final da reação de 50µl.

A reação de PCR foi realizada adaptando-se o protocolo descrito por Haukka (1997) (Tabela 3).

Tabela 3 – Reagentes da reação de PCR

Reagentes	Concentração final	Concentração estoque
Tampão	1mM Tris-HCl (pH 9.0; 25 ^o C), 5mM KCl, 0.01% Triton [®] X-100	10mM Tris-HCl (pH 9.0; 25 ^o C), 50mM KCl, 0.1% Triton [®] X-100
MgCl₂	1,5mM	25mM
Tween 20	0,05%	1%
dNTPs	0,2mM cada	10mM cada
Primer Y1	12,5pmol	5pmol/µL
Primer B3	12,5pmol	5pmol/µL
Taq DNA polimerase	1U	5U/µL
Água	-	-

Os *primers* utilizados foram o Y1 e B3, que são *primers* universais e flanqueiam cerca de 1500 nucleotídeos do rDNA. O *primer* Y1 (5'-TGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC-3'), anela entre o nucleotídeo 20 e 43 em *Echerichia coli* na sequência do 16S rDNA (Young, 1991) e o *primer* reverso B3 (5'-ACCTTGTTACGACTTCACCCCAGTC-3') corresponde a posição 1507-1482 em *E. coli*,

(Brosius et al. 1991, *apud* Haukka, 1996). Ambos os primers foram sintetizados no laboratório de Bioquímica da UFPR. A *Taq*-polimerase utilizada foi adquirida na forma de kits da Promega (*Taq* DNA polimerase; MgCl₂; Tris-HCL, pH 9.0, KCL e Triton X-100). Os dioxiribonucleotídeos (dNTPs) também foram provenientes da Promega.

Os ciclos da reação da PCR foram realizadas em um termo-ciclador *Pekin-Elmer*, modelo 9600, sendo um ciclo inicial de 95°C por 2 minutos e 35 ciclos com temperatura de desnaturação de 93°C por 45 segundos, anelamento 62°C por 45 segundos e extensão de 72°C por dois minutos e um ciclo final a 72°C por 5 minutos.

3.7 – Análise de Restrição do 16S rDNA Amplificado (ARDRA-16S rDNA)

A restrição foi realizada com 9 endonucleases de corte freqüente, citadas por Laguerre et al. (1994) (Tabela 4).

Tabela 4 – Endonucleases de restrições utilizadas para a ARDRA 16S rDNA

Endonuclease	Sítio de restrição (5'-3')	Procedência
<i>Alu I</i>	AG↓CT	<i>Amershan Pharmacia</i>
<i>Dde I</i>	C↓TNAG	<i>Amershan Pharmacia</i>
<i>Hae III</i>	GG↓CC	<i>Amershan Pharmacia</i>
<i>Hha I</i>	GCG↓C	<i>PROMEGA</i>
<i>Hinf I</i>	G↓ANTC	<i>Amershan Pharmacia</i>
<i>Msp I</i>	C↓CGG	<i>Amershan Pharmacia</i>
<i>Nde II</i>	↓GATC	<i>PROMEGA</i>
<i>Rsa I</i>	GT↓AC	<i>Amershan Pharmacia</i>
<i>Taq I</i>	T↓CGA	<i>Amershan Pharmacia</i>

As reações foram realizadas em um volume final de 15µL, contendo: 6µL do produto de amplificação, tampão específico (1X), 4U da enzima e água para completar o volume de reação, sendo as amostras incubadas em banho-maria (37°C; 1,5 horas). Os fragmentos das restrições foram observados através de eletroforese em gel de agarose (Ultra Pure – Life Technologies) (3% P/V), o qual foi corado com brometo de etídio (5 minutos; 5mg.ml⁻¹) e fotografado em fluorescência de luz ultra violeta.

Após a obtenção das fotografias com os perfis de restrições, elaborou-se matrizes de presença ou ausência das bandas, a partir das quais calculou-se uma matriz de similaridade, com o coeficiente *Jaccard* ($J=a/(n-d)$) (Jaccard, 1908 *apud* Rohlf, 1994), onde *a* é número de combinações com a presença dos fragmentos menos as combinações de ausência dos

fragmentos, d o número de combinações de ausência dos fragmentos e n o número de combinações possíveis) e então construiu-se o dendrograma baseado no algoritmo *UPGMA*. Também elaborou-se uma matriz de valores cofenéticos baseada no método *UPGMA*, a qual foi correlacionada com a matriz de similaridade. Todas estas análises foram realizadas no programa *Ntsys* Versão 1,80 (Rohlf, 1994).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Isolamento de Nódulos, Caracterização Morfológica e Agrupamento dos Isolados de Rizóbios

Cerca de 5% dos nódulos de cada tratamento (pelo menos 10 nódulos) foram isolados, totalizando, no final, 245 isolados. Com exceção da área de Cerrado Clímax (área 6, Tabela 2), em todas as áreas amostradas, obteve-se pelo menos 30 isolados. Na área 6, observou-se uma baixa nodulação, onde os nódulos eram aparentemente ineficientes pois as plantas apresentaram sintomas visuais de deficiência de N e o interior dos nódulos possuía coloração branca, indicando deficiência de leghemoglobina, e também houve um reduzido crescimento de bactérias a partir do extrato dos nódulos. Desta forma, estes dados sugerem que na área de Cerrado Clímax local existe um reduzido número de células de rizóbios viáveis capazes de nodular caupi.

A baixa nodulação das plantas isca cultivadas com solo do Cerrado clímax local pode estar associada ao baixo requerimento de N deste sistema, o que inibe a nodulação das plantas (de Faria et al., 1984), ou pelas limitantes condições de fertilidade do solo (Apêndice 3), onde detectou-se pH 4,4 e não detectou-se a presença de $\text{Ca}^{+2} + \text{Mg}^{+2}$ e P disponível utilizando solução extratora HCL 0,05N e H_2SO_4 0,025N.

A Tabela 5 mostra que 25 dos 245 isolados apresentaram crescimento rápido em meio de cultura (até 3 dias). A maioria destes isolados acidificarem o meio de cultura e apresentaram muco tipo I (Xavier et al., 1998), que é viscoso e capaz de espalhar-se pelo meio de cultura sólido. Entretanto os isolados de crescimento lento apresentaram em sua maioria reação de pH alcalina e dois tipos de muco (tipo I e II), sendo que isolados que apresentam muco do tipo II possuíam colônias individualizadas e elevadas (Xavier et al., 1998).

De maneira geral, os isolados de crescimento lento apresentaram maior diversidade das características morfológicas, quando comparados aos isolados de crescimento rápido (Tabela 5; Apêndice 1).

Tabela 5: Aparência e elasticidade do muco produzido em relação ao tempo de crescimento dos isolados de rizóbios obtidos do Cerrado do estado do Piauí.

Crescimento	Tipo de muco*	Aparência do muco				Total
		Homogênea		Heterogênea		
		Elasticidade		Elasticidade		
		+	-	+	-	
Rápido	I	9	1	5	9	24
	II	0	1	0	0	1
Lento	I	3	86	4	18	111
	II	0	105	0	4	109
Total		12	193	9	31	245

* Xavier et al. (1998)

O agrupamento morfológico foi realizado utilizando o índice de similaridade *SM*, que atribuí pesos iguais tanto a presença quanto a ausência de determinada característica e um dendrograma baseado no método de agrupamento *UPGMA* (Apêndice 2). Trinta e nove grupos morfológicos foram definidos em nível de 100% de similaridade, sendo 14 com isolados de crescimento rápido e 25 com crescimento lento (Apêndice 1). Os dois grupos mais abundantes dos isolados de crescimento lento (grupos 25 e 34; Apêndice 1) reuniram cerca de 70% dos isolados. O grupo 34, com 40% dos isolados, cujas características foram semelhantes a *B. japonicum*, apresentaram muco tipo II e colônias elevadas, enquanto o grupo 25 com cerca de 30% dos isolados foi semelhante a *B. elkanii*, apresentando muco tipo I e colônias sem elevação.

4.2 - Teste de Nodulação

O experimento de nodulação foi conduzido para avaliar a capacidade de nodulação dos isolados de rizóbios obtidos, sendo que verificou-se nodulação em caupi com todos os 27 isolados representantes dos grupos de crescimento lento e com as estirpes referência *B. japonicum* (BR111), *B. elkanii* (BR29), *R. tropici* IIA (BR10016) e *S. fredii* (BR112). Porém, com todos os 25 isolados de crescimento rápido testados e para as estirpes BR10026 (*R. etli*) e BR5410 (*A. caulinodans*), não observou-se nodulação.

A ausência de nodulação dos rizóbios de crescimento rápido foi uma surpresa, pois, sabidamente, o caupi, além de nodular com *B. japonicum* (Jordam et al., 1982) e *B. elkanii*

(Kuykendall et al., 1992), que possuem crescimento lento, nodula com *S. fredii* (Scholla, 1984; de Lajudie et al., 1994), *S. xinjiangensis* (Chen et al., 1988) e *R. hainanense* (Chen et al., 1997), que são de crescimento rápido. Também foi surpresa, pois, neste experimento, o caupi nodulou com a estirpe BR10016 (*R. tropici* IIA), largamente encontrado nos solos de Cerrado (Mercante, 1997), no entanto, não nodulou com os isolados de crescimento rápido obtidos do Cerrado. Outros autores também reportaram a capacidade do caupi nodular com diversas estirpes de crescimento rápido ainda não identificadas em nível de espécie (Mpeperekki et al., 1996; Martins, 1996; Zilli et al., 1999).

Os isolados de crescimento rápido que não estabeleceram nodulação com caupi eventualmente podem ter perdido material genético envolvido no processo de nodulação, durante o processo de isolamento (García-de los Santos et al., 1996). Isto é possível, segundo Sprent (1994), pois, rizóbios de crescimento rápido normalmente contém os genes da nodulação (*nod*) em plasmídeos simbióticos e, na literatura existem exemplos de perda destes plasmídeos pelos rizóbios, resultando na perda de sua capacidade de nodular. É possível também que estes isolados possam ser contaminantes do meio de cultura, não sendo os rizóbios presentes nos nódulos.

4.3 - Diversidade Morfológica dos Isolados de Rizóbio

Os dados do agrupamento morfológico foram utilizados para calcular os índices de diversidade de Shannon-Weaver, abundância de Simpsom e riqueza de Margalef e Menhinik. Para isto, cada grupo morfológico, o qual havia sido confirmada a capacidade de nodulação foi considerado como sendo um *táxon*.

Estes índices foram utilizados em função de serem relativamente simples e permitirem comparações de amostras com diferentes tamanhos de populações (Odum, 1988; Maguran, 1988).

Tabela 6 – Diversidade, riqueza e abundância de rizóbios nas diferentes áreas localizadas no Cerrado do estado do Piauí.

Índices	Áreas estudadas							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Shannon-Weaver	0,39	3,61	1,32	2,29	2,23	1,98	0,35	1,03
Simpson	0,88	0,10	0,53	0,31	0,30	0,32	0,88	0,59
Margalef	2,00	4,00	1,14	2,29	1,72	1,11	0,29	0,86
Menhinick	0,57	2,94	0,91	1,74	1,37	1,34	0,37	0,72

Índice de diversidade de Shannon-Weaver ($H = -\sum p_i \log_2 p_i$), riqueza de Margalef, ($DMG = S - 1/\ln N$), Menhinick ($DMN = S/\sqrt{N}$) e abundância de Simpson ($c = \sum (p_i)^2$). N é o número total de indivíduos, S o número total de grupos e p_i a frequência realativa dos grupos (Odum, 1988; Maguran, 1988). Os índices foram calculados a partir do agrupamento *UPGMA*, seguindo uma matriz de similaridade *SM*.

Obs.: Não foram considerados os isolados de crescimento rápidos.

A tabela 6 mostra maiores valores para os índices de diversidade e riqueza na área 2, onde havia sido realizado o cultivo de arroz em 1998 e 1999, logo após a derrubada do Cerrado clímax. Nas demais áreas, estes mesmos parâmetros apresentaram valores pelo menos 40% inferiores em relação a área 2. Já para o índice de abundância de Simpson, observou-se o contrário, a área 2 apresentou a menor abundância de rizóbios, enquanto as outras áreas apresentaram valores para este parâmetro pelo menos 100% maiores. Em especial na área 7, observou-se que cerca de 90% dos isolados eram morfologicamente idênticos, mostrando uma menor diversidade. Nesta área, assim como nas áreas 1, 3, 4, 5, 7 e 8, havia ocorrido o cultivo de soja por pelo menos um ciclo, o que torna aparente a influência da leguminosa na abundância de rizóbios (Woomer et al., 1988; Vlassak et al., 1996; Miethling et al. 2000).

A figura 1 expressa a correlação entre os índices de diversidade, riqueza e abundância de rizóbios com o número de cultivo de leguminosas (soja e/ou caupi) em cada uma das áreas. Como se observa, houve alta correlação entre a composição da população rizobiana e o número de cultivos de soja e caupi. À medida que aumenta o número de cultivos de leguminosas, reduzem-se os índices de diversidade e riqueza, enquanto a abundância de rizóbios se eleva, sugerindo a ocorrência de seleção de populações rizobianas específicas em consequência da presença da leguminosa. A influência da leguminosa na população de rizóbio é um fato comum e tem sido reportada como o fator

mais importante para a presença do rizóbio no solo (Yourself et al. 1987; Woomer et al., 1988). Há ainda que se observar que a soja tem sido normalmente inoculada nestas áreas, o que favorece ainda mais o aumento da população de rizóbio, especialmente se a estirpe inoculante for adaptada às condições do solo (Vargas et al., 1994a, b).

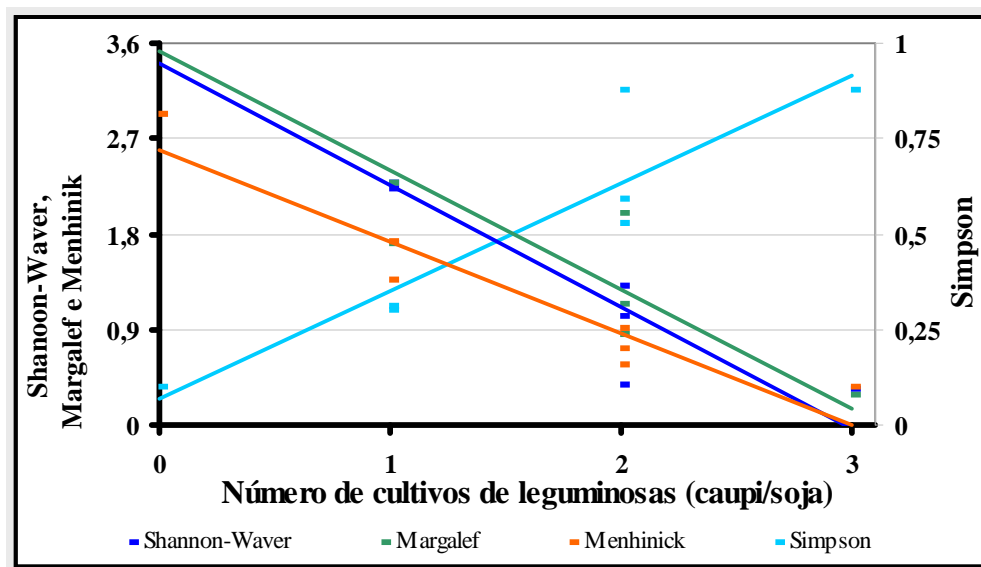


Figura 1 - Correlações entre a diversidade, riqueza e abundância de Simpson com o número de cultivos de soja e/ou caupi. Os coeficientes de correlações foram: Diversidade de Shannon-Weaver ($r=0,95$), riqueza de Margalef ($r=0,91$) e Menhinick ($r=0,95$) e abundância de Simpson ($r=0,92$).

Obs. 1: os dados da área de Cerrado Clímax (área 6 – tabela 2) não foram considerados em virtude do baixo número de isolados obtidos.

Obs. 2: Não foram considerados os isolados de crescimento rápidos.

4.4 - Amplificação do 16S rDNA

Amplificou-se por PCR o 16S rDNA de 86 isolados representantes dos diferentes grupos morfológicos e áreas de amostragem, assim como as estirpes referência *Bradyrhizobium elkanii* (BR29), *B. japonicum* (BR111; LMG6131^T), *Sinorhizobium fredii* (BR112; LMG6217^T), *Rhizobium tropici* IIA (BR10016; CFN299^T), *R. etli* (BR10026; CFN42^T) e *Azorhizobium caulinodans* (BR5410; CFN299^T).

Todos os produtos de amplificações apresentaram uma única banda com tamanho de aproximadamente 1500pb (Figura 2). Este tamanho do fragmento amplificado corresponde

ao esperado, pois o tamanho do gene 16S rDNA é de aproximadamente 1500pb e os primers utilizados flanqueiam todo este gene (Haukka, 1997).

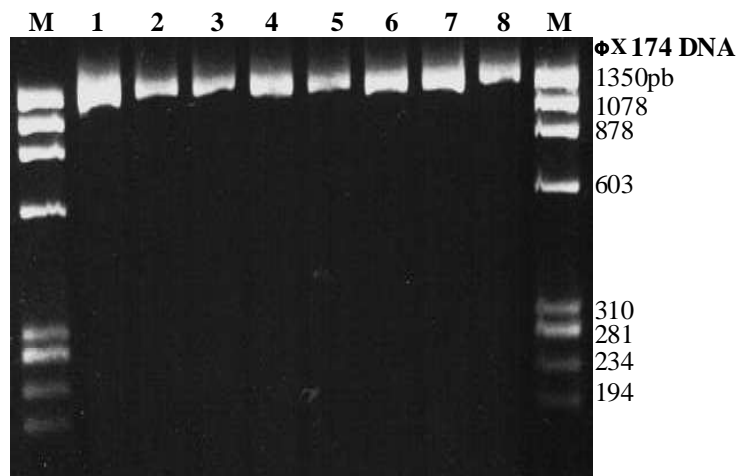


Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose (3%; P/V), mostrando os fragmentos de 16S rDNA amplificado de 8 isolados de rizóbio obtidos de nódulos de caupi: M (marcador - ϕ X174 DNA) 1 (1B13), 2 (7A4), 3(3A8), 3 (2A9), 4 (2C5), 6 (6C1), 7 (6A1) e 8 (7C5).

4.5 - Análise dos Fragmentos de Restrição

Das nove endonucleases utilizadas, todas apresentaram pelo menos 6 padrões polimórficos distintos (Tabela 7).

Como a eletroforese se procedeu em um gel de agarose, fragmentos menores que 100pb não apresentaram boa resolução, dificultando a identificação dos mesmos e desta forma não foram considerados. Esta observação também já havia sido feita por Laguerre et al. (1994).

As figuras 3, 4, 5 e 6 ilustram alguns padrões polimórficos dos isolados de rizóbio obtidos do Cerrado, incluindo também isolados de crescimento rápido.

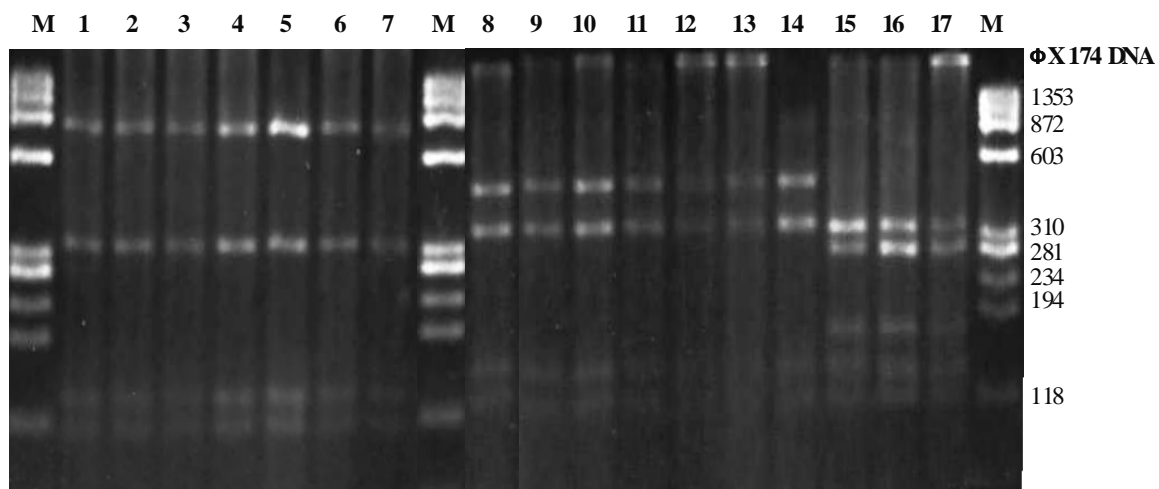


Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose (3%; P/V), mostrando perfis de restrições obtidos com a endonuclease *Hha* I: M (Marcador ϕ X174 DNA), 2 (1B13), 3 (5A17), 4 (BR3267), 5 (5A8), 6 (2C5), 7 (4A8), 8 (6A3), 9 (BR29), 10 (3A8), 11 (2A9), 12 (BR3262), 13 (BR2001), 14 (6C1), 15 (5C4), 16 (2C10) e 17 (BR10026). As amostras 15 e 16 são isolados de crescimento rápido

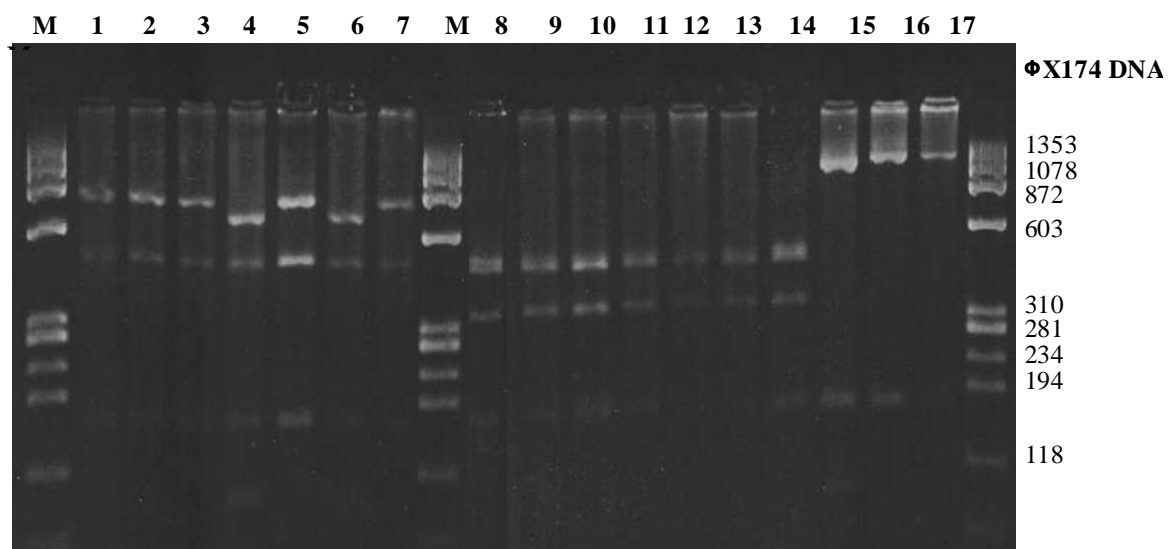


Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose (3%; P/V), mostrando perfis de restrições obtidos com a endonuclease *Hinf* I: M (Marcador ϕ X174 DNA), 2 (1B13), 3 (7A4), 4 (BR3267), 5 (5A8), 6 (2C5), 7 (4A8), 8 (6A3), 9 (BR29), 10 (3A8), 11 (2A9), 12 (BR3262), 13 (BR2001), 14 (6C1), 15 (5C4), 16 (2C10) e 17 (BR10026). As amostras 15 e 16 são isolados de crescimento rápido

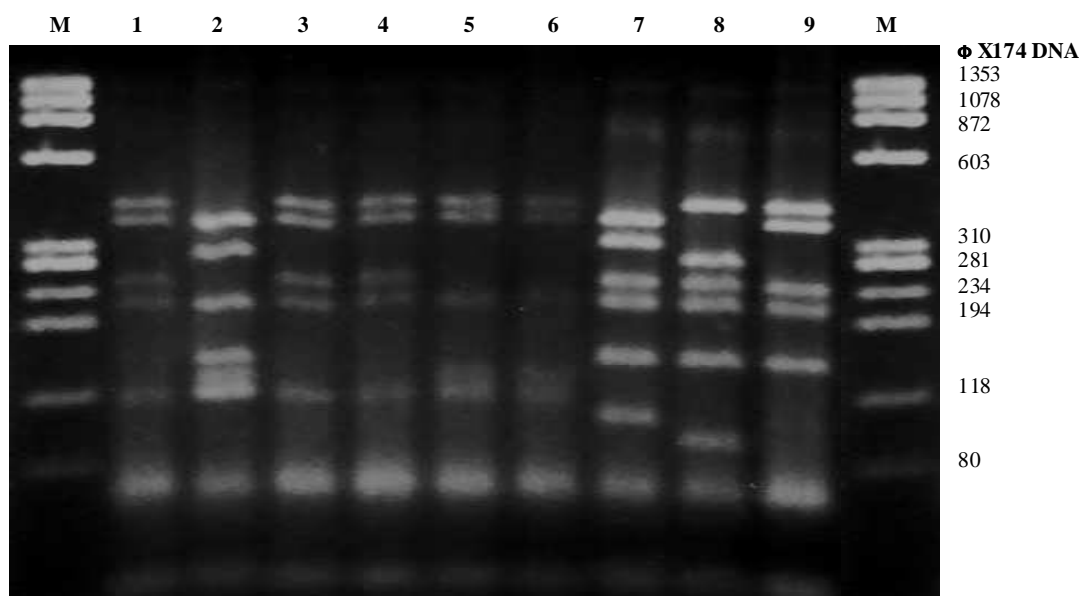


Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose (3%; P/V), mostrando perfis de restrições obtidos com a endonuclease *Dde* I: M (Marcador ϕ X174 DNA), 1 (BR111), 2 (5A8), 3 (2C5), 4 (4A8), 5 (BR29), 6 (BR2001), 7 (5C4), 8 (2C10) e 9 (BR10026). As amostras 7 e 8 são isolados de crescimento rápido

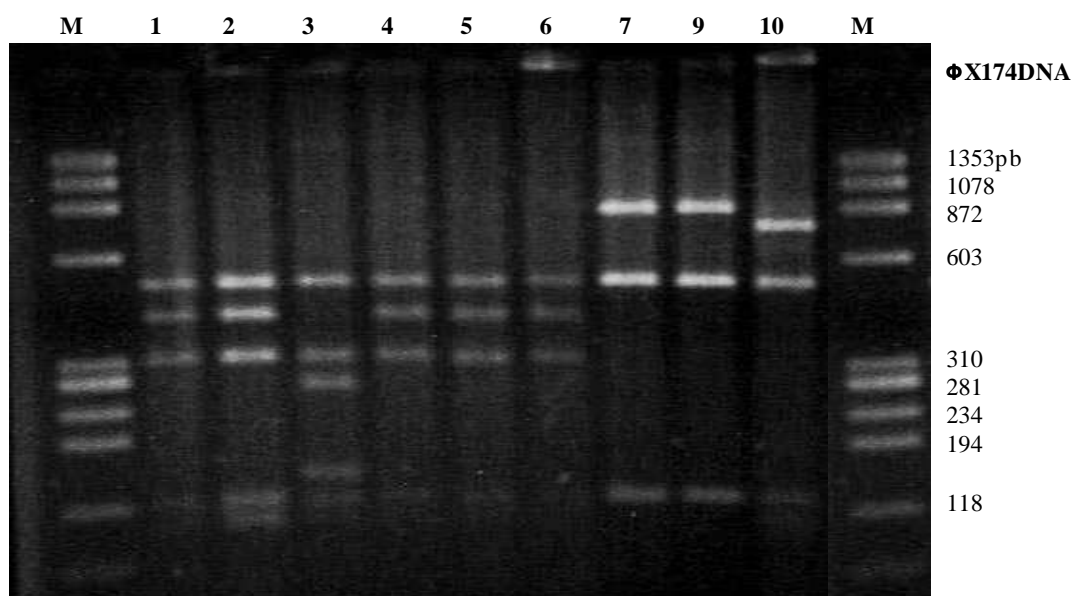


Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose (3%; P/V), mostrando perfis de restrições obtidos com a endonuclease *Rsa* I: M (Marcador ϕ X174 DNA), 1 (BR111), 2 (5A8), 3 (2C5), 4 (4A8), 5 (BR29), 6 (BR2001), 7 (5C4), 8 (2C10) e 9 (BR10026). As amostras 7 e 8 são isolados de crescimento rápido.

3A2	1	a	a	a	a	a	a	a	a	a
3A5	1	a	a	a	a	a	a	a	a	a
3A6	1	a	a	a	a	a	a	a	a	a
3A8	1	a	a	a	a	a	a	a	a	a
3A9	1	a	a	a	a	a	a	a	a	a
3B3	1	a	a	a	a	a	a	a	a	a
5A2	1	a	a	a	a	a	a	a	a	a
5C2	1	a	a	a	a	a	a	a	a	a
6A4	1	a	a	a	a	a	a	a	a	a
6C1	1	a	a	a	a	a	a	a	a	a
6C3	1	a	a	a	a	a	a	a	a	a
7B1	1	a	a	a	a	a	a	a	a	a
8A1	1	a	a	a	a	a	a	a	a	a
8A2	1	a	a	a	a	a	a	a	a	a
8A5	1	a	a	a	a	a	a	a	a	a
8C7	1	a	a	a	a	a	a	a	a	a
8C8	1	a	a	a	a	a	a	a	a	a
BR3262	1	a	a	a	a	a	a	a	a	a
BR2001	2	a	a	a	a	a	a	a	a	b
3B1	3	a	a	a	a	a	a	a	a	e
2C3	4	a	a	a	a	a	a	a	e	a
1C5	5	a	a	a	a	a	a	c	e	d
2B12	6	a	a	d	a	a	a	a	a	a
3C6	6	a	a	d	a	a	a	a	a	a
4A6	6	a	a	d	a	a	a	a	a	a
5A11	6	a	a	d	a	a	a	a	a	a
8B1	6	a	a	d	a	a	a	a	a	a
4A5	6	a	a	f	a	a	a	a	a	a
4B2	7	a	a	f	a	c	a	a	a	a
2B9	7	a	b	a	a	a	a	a	a	a
3C1	7	a	b	d	a	a	a	a	a	a
4A7	8	a	b	f	a	a	a	a	a	a
2C1	9	a	c	h	e	b	a	b	e	a
6A1	10	b	a	a	a	a	a	a	a	a
6A3	11	b	a	a	a	a	a	a	a	a
5B1	12	b	a	d	a	a	a	a	a	a
4C4	13	b	b	a	a	a	a	a	a	a
5A1	13	b	b	a	a	a	a	a	a	a
2B1	14	b	b	a	a	a	a	a	e	a
BR111 (<i>B. japonicum</i>)	15	b	b	d	a	a	a	a	a	a
1B12	15	b	b	d	a	a	a	a	a	a
1B13	15	b	b	d	a	a	a	a	a	a
1C6	15	b	b	d	a	a	a	a	a	a
4A10	15	b	b	d	a	a	a	a	a	a
4B5	15	b	b	d	a	a	a	a	a	a
4C6	15	b	b	d	a	a	a	a	a	a
5A13	15	b	b	d	a	a	a	a	a	a
5B2	15	b	b	d	a	a	a	a	a	a
5B4	15	b	b	d	a	a	a	a	a	a
5B5	15	b	b	d	a	a	a	a	a	a
7A4	15	b	b	d	a	a	a	a	a	a
7B9	15	b	b	d	a	a	a	a	a	a
7C5	16	b	b	d	a	a	a	a	f	a
4A8	17	b	b	d	a	a	c	a	e	a
2B4	18	b	b	d	e	a	a	a	f	a
1A9	19	b	b	f	a	a	a	a	a	a
1C4	19	b	b	f	a	a	a	a	a	a
4A4	19	b	b	f	a	a	a	a	a	a
5A8	19	b	b	f	a	a	a	a	a	a
8C2	19	b	b	f	a	a	a	a	a	a

2C5	20	b	g	a	e	c	a	a	f	a
BR3267	20	b	i	d	a	a	a	a	f	a
7A1	20	b	o	m	c	c	a	e	e	f
1B4	21	c	a	d	c	b	b	b	b	a
1B14	22	c	c	g	c	a	a	b	b	c
1C3	23	c	f	h	d	b	a	b	b	c
5C3	24	c	h	a	h	b	a	b	c	i
2A10	25	c	h	e	g	c	a	b	b	e
4C2	26	c	h	h	d	b	a	b	b	i
2A8	27	c	h	h	g	b	a	b	b	a
2A1	28	c	h	i	g	b	a	b	c	a
2B8	29	c	l	l	a	e	b	d	b	h
2B6	30	c	l	l	c	b	b	b	g	g
2C10	31	c	m	j	g	b	a	b	c	a
5C4	32	c	n	l	h	b	a	b	c	i
2A6	42	a	e	a	a	a	a	b	e	a
2A11	37	d	c	h	e	c	a	a	e	f
3B2	38	d	d	m	a	c	a	a	e	f
2A2	39	d	j	m	e	d	a	b	e	a
7B6	40	e	b	d	a	a	a	a	a	a
BR5410 (<i>A. caulinodans</i>)	33	c	p	n	f	d	d	e	h	j
BR7801 (<i>M. loti</i>)	34	c	q	b	b	f	e	f	d	c
BR10026 (<i>R. etli</i>)	35	c	r	b	c	b	f	b	c	l
BR112 (<i>S. fredii</i>)	36	c	u	c	d	g	h	h	j	n
BR10016 9R. <i>tropici</i> IIA)	41	f	t	e	e	c	g	g	i	m

Com os fragmentos obtidos pelas endonucleases elaborou-se uma matriz com presença e ausência de bandas, calculando-se a partir daí uma matriz de similaridade com o coeficiente *J*, que considera somente a presença da característica um evento de similaridade. Esta matriz foi utilizada então, para a construção de um dendrograma pelo algoritmo *UPGMA* (Figura 7).

De acordo com esta figura, os isolados provenientes de grupos morfológicos que estabeleceram nodulação com caupi no teste de nodulação, se distribuíram em 3 grandes grupos, sendo que nos grupos I e II os isolados apresentaram pelo menos 75% de similaridade entre si. O grupo I englobou 38 isolados provenientes do Cerrado, sendo que 34 apresentaram perfis de restrições idênticos à estirpe BR29 (*B. elkanii*), e 4 se distanciaram em no máximo 15% de similaridade. O perfil da estirpe BR3262 (*Bradyrhizobium* sp.), foi idêntico ao da estirpe BR29, podendo, assim, ser classificada como *B. elkanii*, enquanto que a estirpe BR2001 se distanciou em aproximadamente 10% desta estirpe referência. O grupo II foi formado por 24 isolados, dos quais 12 apresentaram perfis idênticos à BR111 (*B. japonicum*). Outros 12 isolados e a estirpe BR3267, também distribuíram-se dentro deste grupo, variando entre 3 a 15% a similaridade com a referência da estirpe BR111.

De maneira geral, observou-se alta diversidade genotípica de rizóbio (Tabela 7; Figura 7), especialmente considerando os isolados de crescimento rápido. Quanto os isolados de crescimento lento, isolados do grupo II (grupo da estirpe referência de *B. japonicum*) apresentaram maior diversidade de genótipos comparados aos isolados pertencentes ao grupo I (*B. elkanii*). Alta diversidade genotípica de rizóbio em solo de Cerrado também foi encontrada por Mercante (1997). Neste caso, o autor observou através de hibridação com sondas espécie-específicas que 90% dos isolados capturados a partir de *Leucena* pertenciam a *R. tropici* e 10% não se agruparam com nenhuma espécie descrita, enquanto para o feijoeiro 35% pertenceram a *R. tropici*, 16% para *R. leguminosarum* e/ou *R. etli* e 49% não se agruparam com nenhuma espécie conhecida.

Cinco dos isolados de crescimento lento e 5 de crescimento rápido agruparam-se dispersamente entre as estirpes referência de *Bradyrhizobium* e as demais estirpes referência, variando sua similaridade de 30 a 75% com *Bradyrhizobium*. Os demais isolados de crescimento rápido também formaram vários grupos dispersos, porém mais próximos de *Rhizobium* que os anteriores (Figura 7). Os perfis de restrição dos isolados de crescimento rápido indicam a possibilidade destes isolados serem rizóbio e desta forma terem perdido a capacidade de nodulação. Contudo, a atual taxonomia de rizóbio tem sido questionada, principalmente devido a algumas inconsistências que ocorrem quando se compara a taxonomia tradicional de bactérias, baseada principalmente em dados fenotípicos com a filogenia dos genes ribossomais. Exemplos destas inconsistências é o fato de maior similaridade de espécies do gênero *Rhizobium* com *Agrobacterium* do que com as demais espécies do grupo dos rizóbios e também a proximidade do gênero *Rhodopseudomonas* com o grupo dos rizóbios, mesmo pertencendo a outra família. Estas inconsistências têm levado alguns autores a sugerirem a divisão da família Rhizobiaceae em duas famílias. (Young & Haukka, 1996; van Berkum et al., 2000; Tighe et al., 2000).

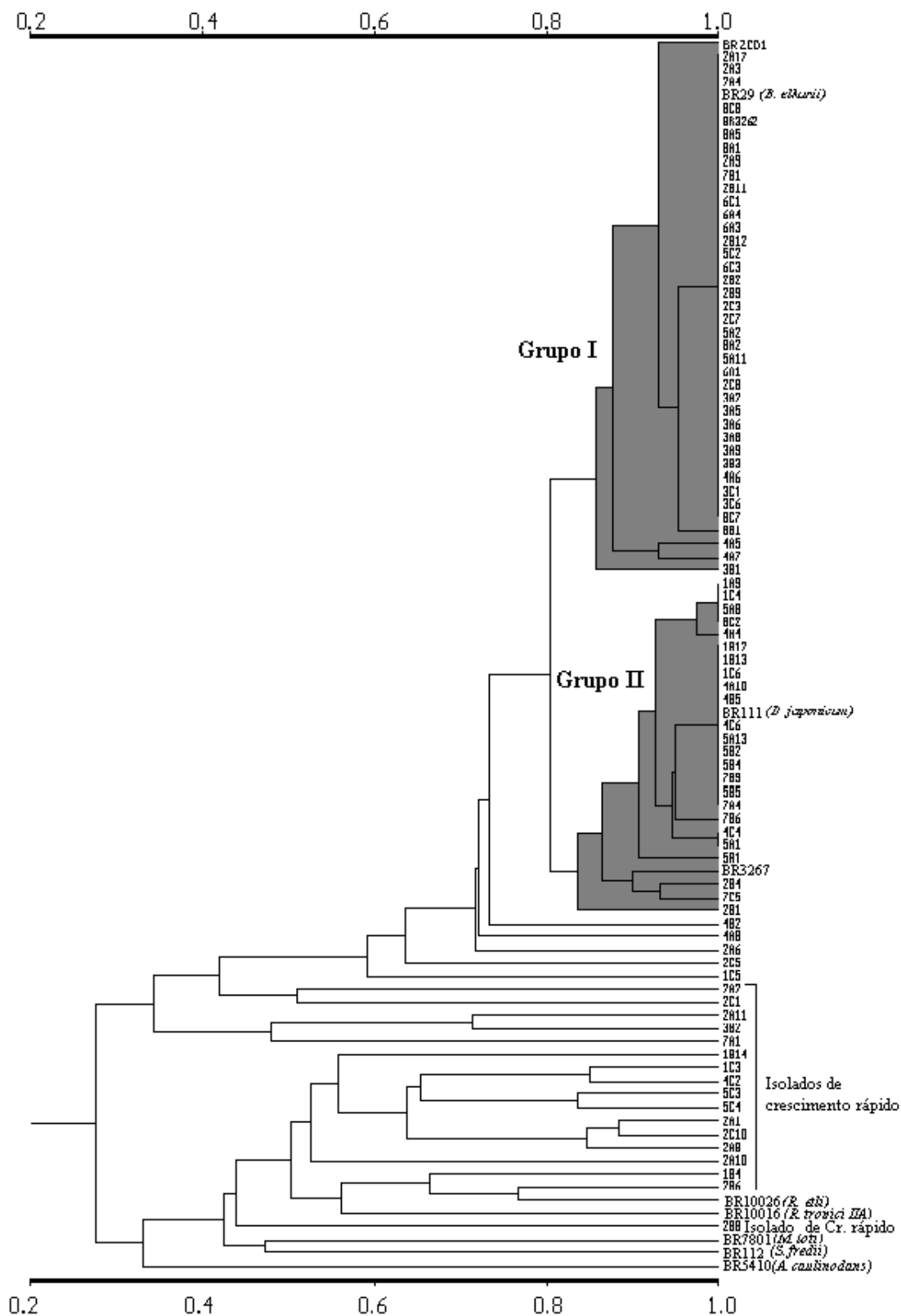


Figura 7 – Dendrograma de dados genotípicos elaborado pelo algoritmo *UPGMA* e matriz de similaridade *Jaccard* mostrando a similaridade entre 86 isolados de rizóbios obtidos de caupi cultivado com solo de Cerrado e as estirpes BR3267, BR3262 e BR2001.

O coeficiente cofenético teve valor igual a 0,98. Os isolados que possuem a letra “A” na nomenclatura foram isolados da cultivar de caupi CE315, as que possuem a letra “B” e “C”, das cultivares BR14 e BR17, respectivamente.

4.6 - Distribuição dos Diferentes Grupos de Rizóbio nas Áreas Estudadas

A análise de restrição foi realizada com intuito de confirmar a avaliação morfológica, além de revelar a relação filogenética entre os isolados obtidos de caupi cultivado com solo do Cerrado com diferentes estirpes referência. Morfologicamente, observou-se que 40% dos isolados apresentaram características semelhantes a *B. japonicum*. Por ARDRA, analisou-se 13 isolados deste grupo, sendo que 12 apresentaram padrões polimórficos idênticos a *B. japonicum*. Observou-se também que isolados deste grupo foram provenientes de todas as áreas estudadas, com exceção da área de Cerrado clímax, na qual todos os isolados estudados tiveram padrões semelhantes a *B. elkanii*. No outro grande grupo morfológico, composto por 35% dos isolados, cujas características eram semelhantes a *B. elkanii*, foram estudadas por ARDRA 14 isolados, dos quais 10 apresentaram padrões polimórficos iguais a *B. elkanii*. Isolados deste grupo foram encontrados em todas as áreas, com exceção das áreas 1 e 7.

Analisando comparativamente a população de rizóbios de cada uma das áreas, observa-se que nas áreas 1 e 7 pelo menos 90% dos isolados apresentaram as mesmas características morfológicas da estirpe referência *B. japonicum* e de fato os representantes estudados por ARDRA revelaram perfis polimórficos semelhantes à *B. japonicum*, indicando que há predominantemente uma população de *B. japonicum* nestas áreas. Especificamente na área 7, sabe-se que os cultivos de soja foram inoculados com as estirpes de *B. japonicum* SEMIA5079 e SEMIA5080. Segundo Vargas et al. (1994b), estas estirpes seriam variantes das ancestrais SEMIA566 e SEMIA586 respectivamente, que foram utilizadas como inoculante para a soja cultivada em solo de Cerrado durante muitos anos. As estirpes SEMIA5079 e SEMIA5080 além de serem muito eficientes quanto à FBN, competem muito bem no campo para a formação de nódulos (Vargas et al., 1994a, b;

Nishi et al. 1996). Desta forma, a grande quantidade de isolados de *B. japonicum* encontrada nas áreas estudadas provavelmente sejam decorrentes das estirpes inoculantes, cuja sua abundância se elevou com os consecutivos cultivos de soja.

Ao contrário da observação anterior, nas áreas 3 e 8 observa-se que pelo menos 70% dos isolados apresentaram características morfológicas semelhantes a *B. elkanii*, o que também foi confirmado por ARDRA. Isto indica que provavelmente estas áreas tenham sido inoculadas com estirpes de *B. elkanii*, supostamente as estirpes SEMIA587 e SEMIA5019 (BR29; 29W), que da mesma forma que as estirpes anteriores, são recomendadas pela RELARE para a inoculação da soja no Brasil. Contudo, não existe para estas áreas uma confirmação do tipo de inoculante utilizado.

Na área de Cerrado clímax foram obtidos 14 isolados, dos quais 5 foram estudadas por ARDRA e apresentaram padrões polimórficos iguais a *B. elkanii*, corroborando com dados anteriormente citados, de que nos solos brasileiros há naturalmente dispersa e estabelecida uma população de *B. elkanii* (Rumjanek et al. 1993; Nishi et al., 1996).

Na área 2, onde não havia ocorrido o cultivo de leguminosa, não se observou predomínio de um determinado grupo de isolados. Estes isolados se apresentaram morfológicamente muito diversos (Tabela 6) e por ARDRA detectou-se a presença de *B. japonicum*, *B. elkanii*, assim como outros padrões polimórficos diversos.

Portanto, em condições de Cerrado clímax local, há uma população de *B. elkanii* estabelecida, o que já havia sido observado anteriormente, embora o número de bactérias capazes de nodular caupi seja baixo. A medida que o solo é manejado e, como consequência ocorrem alterações nas condições físicas e químicas do solo, fatores que costumam ser limitantes à presença de rizóbios no solo (Woomer et al., 1988; Youself et al., 1997), há um aumento da população de rizóbio e da própria diversidade de grupos de rizóbios. Provavelmente, isto acontece porque determinados grupos, embora presentes, estão representados por números de rizóbios muito baixos nas condições de Cerrado clímax. A partir desta condição, quando iniciam-se os cultivos de leguminosas, a diversidade de rizóbios diminuí, ocorrendo seleção e aumento da abundância de rizóbios específicos na comunidade, que também podem ser influenciados pela inoculação da soja com inoculante específico.

A distribuição dos isolados foi avaliada também através de uma análise de correspondência, utilizando-se o programa ADE-4 (NetMul “online”; Thioulouse et al., 1997). A aplicação desta análise foi realizada utilizando-se a distribuição dos grupos morfo-genotípicos, obtidos pela comparação dos dados de ARDRA com a caracterização morfológica dos isolados. Para isto, os isolados dentro de um mesmo grupo morfológico foram considerados idênticos ao isolado estudado por ARDRA, quando possuíam a mesma procedência de área e cultivar de caupi.

Os resultados da análise de correspondência estão apresentados na Figura 8, sendo que o gráfico foi elaborado com os fatores 1 e 2, cujos valores foram 65% e 12%, respectivamente. Pelo primeiro componente observa-se que as áreas distribuíram-se em dois grupos distintos: um grupo formado pelas áreas 1, 4 e 5, cultivadas com soja, e a área 8, cultivada com caupi, além de soja. O outro grupo foi formado pelas áreas 2 e 6, não cultivadas com leguminosas e 3 e 8, onde também introduziu-se o caupi, além da soja. Pelo segundo componente observa-se que a área 7 separou-se das áreas 1, 4 e 5.

Estes resultados revelaram algo que não havia sido interpretado nos dados morfológicos, onde observou-se que o simples cultivo de leguminosas, independente de ser caupi ou soja, elevava poucos grupos de rizóbios no solo, diminuindo, em contrapartida, a sua diversidade. Na análise de correspondência, observou-se que a espécie de leguminosa, caupi ou soja, comportaram-se diferentemente. As áreas 1, 4 e 5, onde a única leguminosa introduzida foi soja, tenderam a agrupar-se. Assim também para as áreas onde leguminosas não foram introduzidas (área 2 e 6). Ao passo que, as áreas 3 e 8, onde o caupi foi cultivado, tenderam a agrupar-se com as áreas, onde ocorreu a introdução de leguminosas. A área 7, ao contrário, agrupou-se mais proximamente com áreas onde somente soja foi introduzida. Isto provavelmente, ocorreu, pois, a área 7 foi cultivada com soja por mais de um ciclo, o que deve ter favorecido o aumento de apenas alguns grupos de rizóbios geneticamente próximos. Desta forma, apenas 1 cultivo de soja e posterior cultivo de caupi, que ocorreram nas áreas 3 e 8, não foram suficientes para alterar intensamente a população de rizóbio semelhante a população nativa presente no solo. Estes resultados corroboram com os dados encontrados por outros autores, que indicam que o caupi é capaz

de nodular com uma população de rizóbio genoticamente heterogênea (Thies et al., 1991a; Mpepereki et al., 1996; Martins, 1996).

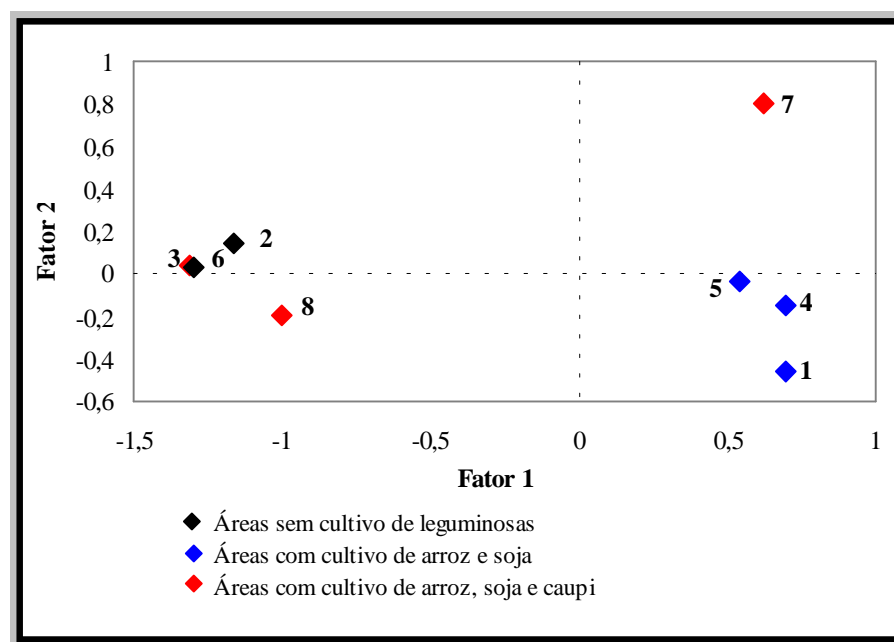


Figura 8: Relação multivariada entre áreas do Cerrado e grupos morfo-genotípicos de rizóbios avaliada por análise de correspondência.

Obs.: Não foram considerados os isolados de crescimento rápido

4.7 – Influência da Cultivar de Caupi na Obtenção dos Grupos de Rizóbio

O perfil simbiótico de caupi é considerado de baixa especificidade (Mpepereki et al., 1996), o que é revelado pela capacidade do caupi estabelecer simbiose com pelo menos 5 espécies de rizóbio, englobando 4 gêneros. Porém, há observações de especificidade entre determinadas estirpes de rizóbio e cultivares de caupi (Ankomah et al., 1996; Xavier, 2000). Segundo Danso & Owiredun (1998), esta especificidade é decorrente da capacidade da bactéria competir pelo sítio de nodulação, mais do que pela restrição simbiótica ocasionada pelos sinais moleculares durante a associação rizóbio/planta. Diferenças na performance nodular foram encontradas por Xavier (2000), que observou que 97% dos nódulos coletados na cultivar de caupi Galanjão eram ocupados pela estirpe inoculante 5s13, que quando inoculada em outras duas cultivares, não ocupou mais que 5% dos

nódulos analisados. Desta forma, o autor sugere que a cultivar de caupi Galanção apresenta algum nível de especificidade em relação à estirpe 5s13.

Neste trabalho, para capturar os rizóbios do solo foram utilizadas 3 cultivares de caupi CE315, BR14 e BR17, sendo que isolou-se cerca de 80 nódulos de cada cultivar plantada com solo das 8 áreas do Cerrado estudadas. Esta estratégia possibilitou, desta forma, avaliar a faixa de nodulação de cada uma das cultivares.

Como se observa na Tabela 8, pelo menos 45% dos isolados de rizóbio reuniram-se em apenas dois grupos morfo-genotípicos (grupos 3 e 10; Tabela 8), o que demonstra que a performance simbiótica das três cultivares utilizadas para o estudo foi semelhante, embora a Figura 9 mostre dispersão das mesmas, quanto aos seus grupos morfo-genotípicos de rizóbios. A Figura 9 mostra que às cultivares BR14 e BR17, embora distantes uma da outra, tenderam a agrupar-se no mesmo componente, enquanto a cultivar CE315 posicionou-se no outro. Isto, aparentemente, indica uma tendência das cultivares BR14 e BR17 nodularem com uma população de rizóbio distinta das da cultivar CE315. Porém, é importante observar que a dispersão das cultivares foi influenciada pelo elevado número de grupos morfo-genotípicos com 5 ou menos isolados de rizóbio (14 dos 19 grupos) (Tabela 8).

Desta forma, embora a Tabela 8 mostre que as cultivares estudadas, além de terem nodulado com os grupos de rizóbio comuns às três cultivares, nodularam com grupos de rizóbios exclusivos para cada cultivar, porém não enfatizando a existência de um perfil simbiótico característico, devido ao baixo número de isolados de rizóbios obtidos na maioria dos grupos morfo-genotípicos de rizóbios exclusivos de cada cultivar de caupi.

Tabela 8 - Grupos morfo-genotípicos de isolados de rizóbios obtidos das cultivares de caupi utilizadas com plantas isca.

Grupos Morfo-genotípicos	Cultivares de caupi		
	CE315	BR14	BR17
1	11	0	10
2	4	0	0
3	15	31	7
4	0	4	0
5	5	0	9
6	0	2	0
7	0	1	2
8	0	0	10
9	0	1	0
10	35	12	37
11	0	10	0
12	1	0	0
13	1	0	0
14	0	5	0
15	0	1	0
16	2	0	0
17	2	0	0
18	0	0	1
19	0	0	1
Total	76	67	77

Obs.: Não foram considerados os isolados de crescimento rápidos.

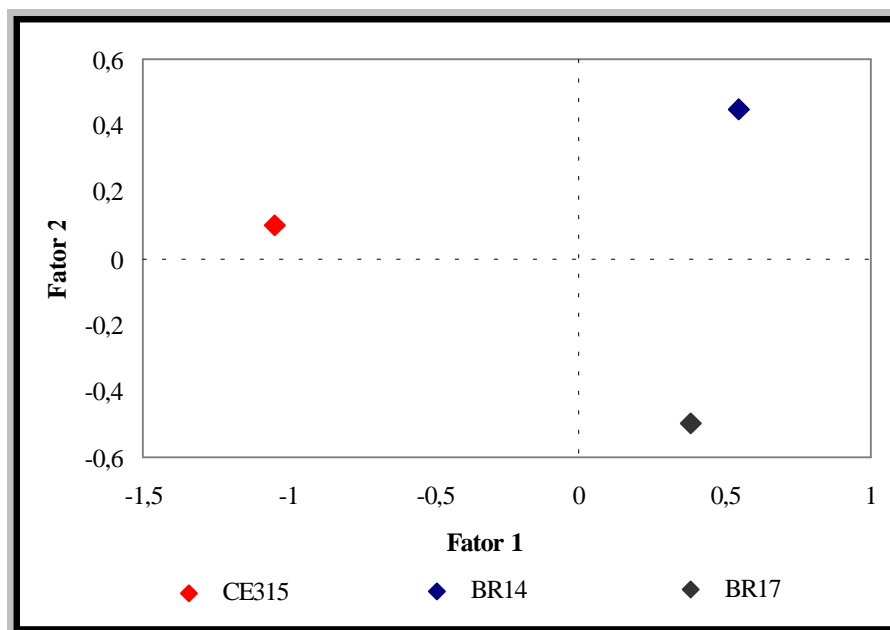


Figura 9: Relação multivariada de grupos morfo-genotípicos de rizóbios e cultivares de caupi avaliada por análise de correspondência. O gráfico foi elaborado com os fatores 1 e 2 que apresentaram valores 70% e 25%, respectivamente.

Obs.: Não foram considerados os isolados de crescimento rápidos.

5. CONCLUSÕES

- O isolamento dos nódulos mostrou que na área de Cerrado clímax local há baixa quantidade de rizóbios capazes de nodular caupi;
- A correlção do número de cultivos de leguminosas (soja e/ou caupi) com os índices de diversidade de Shanon-Weaver, riqueza de Margalef e Menhinick e abundância de Simpsons indicou que o aumento no número de cultivos de leguminosas diminuiu a diversidade e riqueza morfológica da população de rizóbio, elevando, no entanto, a abundância;
- Tanto a análise morfológica como a ARDRA revelou que na área de Cerrado clímax local há predominantemente estabelecida uma população de rizóbio semelhante a *B. elkanii*;
- Na área 7, localizada no município de São Domingo do Azeitão, onde a lavoura de soja foi inoculada com as estirpes SEMIA5078 e SEMIA5080, 90% da população de rizóbios recuperadas com uso de plantas isca apresentaram características morfológicas e genotípicas semelhantes a *B. japonicum*;
- De acordo com o histórico de cultivo das áreas, o preparo do solo e cultivo de arroz favoreceu o aumento da diversidade morfológica e genotípica de rizóbios;
- A análise de correspondência mostrou que o caupi é capaz de nodular com uma população de rizóbio genotipicamente heterogênea.
- A estirpe BR3262 apresentou perfil de ARDRA idêntico à *B. elkanii* (estirpe BR29) indicando ser pertencente a esta espécie.

CAPÍTULO II

EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ESTIRPES DE RIZÓBIO PARA CAUPI ISOLADAS DE SOLO DE CERRADO NO ESTADO DO PIAUÍ

1. INTRODUÇÃO

O caupi, originário do continente africano, é uma importante fonte nutricional, naquele continente, onde a disponibilidade de outras fontes protéicas é limitada, devido às condições de clima adverso e de subdesenvolvimento econômico e social da população. No Brasil, esta cultura é basicamente cultivada nas regiões norte e nordeste, principalmente, devido, às suas características adaptativas e culturais. Nestas condições, o caupi desempenha um papel muito importante tanto na alimentação como na geração de empregos para a população, especialmente a de baixa renda. Segundo Freire Filho et al., (1998), pelo menos 27,5 milhões de nordestinos são alimentados com a atual produção de caupi, que também gera cerca de 2,4 milhões de empregos diretos para o Brasil.

A produtividade desta cultura é variável, devido principalmente à alta variabilidade genética que a cultura possui e também ao cultivo em áreas consideradas agronomicamente marginais, o que dificulta a exploração do potencial da FBN nesta cultura (Xavier, 2000). A média atual da produtividade brasileira não ultrapassa 400kg.ha^{-1} , porém de pesquisas estimam produtividades potenciais superiores a 5000kg.ha^{-1} (Sanden, 1993, *apud* Ehlers & Hall, 1997; Freire Filho et al., 1998). No entanto, no Brasil, não se tem explorado este potencial, principalmente por que o cultivo é realizado em regimes de subsistência por pequenos agricultores, onde a tecnificação das lavouras é baixa.

Apesar da baixa produtividade, esta planta possui um elevado potencial genético, dado em parte pela sua evolução em áreas inóspitas do clima tropical e em parte pela ampla diversidade genética que ela detém. Segundo Martinazzo (1989), plantas de caupi são altamente tolerantes a temperatura elevada, baixa pluviosidade, baixa fertilidade e pH e alta salinidade dos solos. Estas características tem despertado o interesse de pesquisadores, que vêem no caupi um recurso genético estratégico, seja para melhoramento de plantas às condições de clima semi-árido, seja como uma reserva de genes que podem ser utilizados futuramente em biotecnologia.

A adaptabilidade, somada à efetiva contribuição da FBN quando o caupi está associado com rizóbio, tem ganho destaque entre grandes produtores agrícolas nos Cerrados dos estados do Piauí e Maranhão. Nestas áreas, os agricultores, estrategicamente, tem introduzido o caupi na “safrinha”, após a colheita do arroz no final da estação das

águas, tanto em lavouras recém desbravadas, como também em rotações de cultivos bianuais com soja. Desta forma, o caupi utiliza nutrientes residuais da cultura do arroz e pode desenvolver-se bem com regime pluviométrico decrescente, garantindo uma renda extra aos agricultores e uma melhor utilização dos fertilizantes aplicados no sistema. Neste tipo de rotação tem-se observado uma produtividade média de 1500kg.ha^{-1} .

O nitrogênio, que é exigido em grandes quantidades pelos vegetais é um dos nutrientes mais limitantes à produção de caupi e outros cereais. No entanto, o caupi, por ser uma leguminosa, pode obter da simbiose com rizóbio grande parte do nitrogênio requerido para o seu desenvolvimento. Existem referências que indicam contribuições de FBN superiores a 100kg.ha^{-1} (Wani et al., 1995), embora estes valores sejam variáveis, especialmente quando as avaliações são feitas no campo. Este fato tem sido relacionado principalmente com a promiscuidade da simbiose entre plantas de caupi e estirpes de rizóbio nativas dos solos tropicais.

Embora não seja plenamente entendido o “porquê” de algumas plantas formarem simbiose com uma gama maior de espécies de rizóbios que outras, a inoculação de leguminosas com estirpes de rizóbio selecionadas para uma maior eficiência de FBN (Kishinevsky et al., 1984) e habilidade em tolerar estresses ambientais (Lowendorf, 1980) é uma prática comum quando se pretende aumentar o nível de nitrogênio fixado para uma cultura.

A inoculação do caupi em áreas de Cerrados pode agregar resultados expressivos, a medida que estiagens de até seis meses, durante os meses de inverno podem reduzir a quantidade de rizóbios no solo e, desta forma, a estirpe inoculante poderá ter condições de induzir uma boa nodulação na cultura do caupi, pois a sua competitividade será favorecida.

Esta etapa do trabalho objetivou avaliar a eficiência simbiótica, a ocupação nodular e a relação filogenética baseada na restrição do 16S rDNA de estirpes de rizóbio provenientes do Cerrado do estado do Piauí e as estirpes BR3267, BR3262 e BR2001 reportadas como eficientes para a cultura do caupi.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - A Cultura do Caupi

O caupi é uma planta dicotiledônea, pertencente à ordem Rosales, família Leguminosae, subfamília Papilionoideae, tribo Phaseoleae e gênero *Vigna*. Este gênero ocorre nas regiões tropicais e subtropicais, com ampla distribuição mundial. Steele & Mehra (1980) (*apud* Araújo & Vatt, 1988) citam como centro de origem desta espécie a Etiópia e Índia, mas Ng & Maréchal (1985) (*apud* Araújo & Vatt, 1988), citam a Nigéria como sendo o país de origem. Contudo, parece consenso ser no oeste e centro da África e Noroeste da Índia os centros de diversidade deste gênero.

Segundo Araújo & Vatt (1988), inúmeras evidências levam a crer que o caupi tenha sido introduzido no continente americano ainda no século XVI, simultaneamente por espanhóis e portugueses. Primeiro, possivelmente nas colônias espanholas e, em seguida, no Brasil, provavelmente no estado da Bahia. A partir da Bahia, acredita-se que o caupi tenha sido disseminado para todas as regiões do país. Porém, com o decorrer do tempo e diante do cultivo de outros feijões mais adaptados a cada região, o cultivo do caupi foi sendo restringido. Deste modo, o cultivo intensificado somente ocorreu nas regiões norte e nordeste, principalmente por esta cultura ter se adaptado muito bem ao clima tropical, semelhante ao do seu centro de origem.

Constatou-se, nos últimos anos, que a área de caupi corresponde a aproximadamente 60% da área total de feijão do nordeste e a 30 % da área total de feijão do Brasil, (IBGE, 93 a 97 *apud* Freire Filho et al., 1998). Verifica-se, também, neste mesmo período que a produção de caupi esteve em torno de 50% da produção total de feijão do nordeste e de 18% da produção nacional de feijão, enquanto a produtividade esteve em torno de 84% da produtividade média de feijão do país. Segundo dados do IBGE (93 a 97) *apud* Freire Filho et al. (1998), a área total cultivada com caupi é da ordem de 1 6000 ha.ano⁻¹, com produção de grãos da ordem de 550 000t.ano⁻¹ e produtividade de 300 a 400kg.ha⁻¹, sob condições de sequeiro.

Atualmente, os estados do Ceará e Piauí apresentam as melhores produtividades do país, chegando à média de 600kg.ha^{-1} no Ceará, em 1996, muito inferior ainda à produtividade potencial da cultura (Freire Filho et al., 1998).

Quadro 1 – Área colhida (ha), produção (t) e produtividade (kg.ha^{-1}) de caupi, na região nordeste do país no período de 93-97.

	1993	1994	1995	1996	1997
Área (ha)	923 517	1 650 507	121 1874	1 819 676	1 578 636
Produção (t)	201 169	544 994	593 120	633 338	554 459
Produtividade (kg.ha^{-1})	252,25	298,125	356,125	372,125	395,625

Fonte: IBGE - Levantamento sistemático da produção agrícola 1993 a 1997, *apud* Freire Filho et al. (1998).

De acordo com dados da Embrapa 1983 (*apud* Araújo & Vatt, 1998) o caupi é uma importante fonte de proteínas para muitos países, principalmente os da África, América do Sul e Ásia. No Brasil, esta leguminosa é cultivada principalmente no norte e nordeste, onde representa a principal fonte de proteínas para as populações de baixa renda. Segundo Freire Filho et al., (1998), o cultivo do caupi gera anualmente cerca de $1,5 \text{ empregos.ha}^{-1}$, sendo um total de 2,4 milhões de empregos diretos por ano. Considerando-se um consumo *per capita* médio de 20kg (Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira, 1998), tem-se que o caupi, abastece a mesa de 27,5 milhões de nordestinos.

Além desses dados, o estudo desta cultura justifica-se pelo alto nível nutricional (Quadro 2) e de proteínas ricas em aminoácidos essenciais (Quadro 3) presentes nas sementes.

Quadro 2 - Valores nutricionais de grãos de caupi maduros.

Nutrientes	Composição
Proteínas	20,4 a 26,18%
Lipídeos	0,93 a 1,65%
Açúcares totais	2,37 a 5,35 %
Cálcio	51 a 141 mg/100g de sementes
Ferro	3,04 a 7,83 mg/100 de sementes
P ₂ O ₅	788,9 a 1244,4 mg/100g de sementes

Fonte: Moura et al. (1981), *apud* Araújo & Vatt (1988).

Quadro 3 – Teor médio de aminoácidos essenciais encontrados em grãos de caupi em relação ao conteúdo de nitrogênio (mg.16g⁻¹).

Aminoácidos	Teor de aminoácido (mg.16g⁻¹)
Isoleucina	4,2 – 4,8
Leucina	7,6 – 8,5
Lisina	6,6 – 8,1
Fenilalanina	5,5 – 6,2
Tirosina	2,2 – 3,6
Meteonina	1,5 – 2,3
Argenina	5,4 -8
Treonina	3,6 – 4,5
Histidina	2,9 – 4,7
Valina	4,9 – 5,7

Fonte: Kocchar et al. (1988), *apud* Ugozara & Ofuya (1992).

Cultivado tipicamente em lavouras de subsistência, intercalado com outras culturas, o caupi apresenta historicamente uma baixa produtividade no Brasil, cerca de 100 a 300kg.ha⁻¹, enquanto que em lavouras irrigadas e melhor tecnificadas obtém-se até 1500kg.ha⁻¹. Segundo Lopes & Farias (1995), em experimentos conduzidos com produtores foi possível obter uma produtividade de até 1800kg.ha⁻¹ usando a cultivar IPA206, em condições de precipitação média de 400 mm em três meses.

De acordo com Bezerra (1997), não tem sido explorado todo o potencial genético do caupi, visto que existem cultivares de caupi melhoradas que freqüentemente apresentam produtividade de até 3t.ha⁻¹. Freire Filho et al. (1998) salientaram, sob ponto de vista de melhoramento vegetal, expectativas de produtividade da cultura do caupi ainda mais promissoras, da ordem de 6t.ha⁻¹, enquanto Sanden (1993) *apud* Ehlers & Hall (1997) cita a obtenção de uma produtividade de 7 000kg.ha⁻¹ em experimento de campo.

Apesar de existirem variedades de caupi agressivas e de fácil adaptação às condições adversas, vários fatores interferem na produtividade desta cultura. São de destaque a quase totalidade de cultivo consorciado com outras culturas, sem a utilização de variedades adaptadas a este sistema de plantio, pouco conhecimento do produtor quanto ao espaçamento, época de plantio e cultivares adaptadas às condições locais e são de grande destaque a baixa fertilidade natural dos solos onde ocorre o cultivo do caupi, o que culmina na maioria das vezes com um baixo pH do solo associado a altos níveis de Al (Martinazzo,

1989). Parte dos problemas relativos à fertilidade do solo, para esta cultura, podem ser amenizados com o uso de inoculantes com estirpes de rizóbio eficientes, o que não tem sido adotado no Brasil, sendo a FBN decorrente meramente por estirpes nativas de eficiência variável. A não adoção de inoculação para o caupi no Brasil, ocorre em parte, pois pesquisas têm mostrado a dificuldade do estabelecimento das estirpes inoculantes no solo (Wani et al. 1995).

O caupi, por ser possuidor de ampla variabilidade genética, ampla capacidade de adaptação, alto potencial produtivo, grande capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, através da simbiose com *Bradyrhizobium* spp., e excelente valor nutritivo, é uma espécie de grande valor genético estratégico, que tem despertado o interesse de pesquisadores que vem no caupi um recurso passível de utilização, seja para melhoramento de plantas às condições de clima semi-árido ou como uma reserva de genes. (Ehlers & Foster, 1993; Ehlers & Hall, 1997; Bezerra, 1997; Xavier, 2000) . A melhor prova de sua importância é que foi uma das poucas espécies vegetais escolhidas pela National Aeronautical and Space Administration (NASA) para ser cultivada e estudada nas estações espaciais (Ehlers & Hall, 1997).

2.2 - A Simbiose Caupi/Rizóbio

O caupi por ser uma leguminosa, pode se associar com bactérias da família *Rhizobiaceae* que possuem a enzima nitrogenase, responsável pela redução do N_2 atmosférico à formas de nitrogênio amoniacais no interior dos nódulos, formados nas raízes das plantas. Assim como a maioria das leguminosas tropicais, o caupi associa-se mais frequentemente com o gênero *Bradyrhizobium*, (Neves & Rumjanek, 1997). Embora as estirpes nativas de *Bradyrhizobium* estejam frequentemente presentes na maioria dos solos tropicais (Singleton et al., 1992), existe ainda uma controvérsia sobre a contribuição da nodulação promovida por estas estirpes na fixação biológica de nitrogênio nesta cultura, bem como sobre o grau de especificidade da associação.

A formação do nódulo é um processo decorrente de uma intensa troca de sinais químico-moleculares entre a raiz da leguminosa e o rizóbio. Raízes de plantas leguminosas exsudam compostos do tipo flavonóides, que interagem com uma proteína estrutural de membrana do rizóbio, a proteína NodD, promovendo nela, uma alteração conformacional.

A proteína NodD induz a região promotora dos genes de nodulação (genes *nod*, *noe* e *nol*) (Hirsch, 1996; Hirsch, 2000; Bono, 2000). Estes genes codificam proteínas envolvidas com a síntese dos lipoquitoligossacarídeos (fatores de nodulação), que apresentam modificações nos radicais dependendo da espécie de rizóbio. Os genes da nodulação presentes no rizóbio são divididos em 2 principais grupos: os responsáveis pelo esqueleto da molécula do lipoquitoligossacarídeo e os que adicionam diferentes radicais ao lipoquitoligossacarídeo, conferindo especificidade em relação ao hospedeiro (Schlman et al. 1992). Após sua síntese, os fatores de nodulação são exsudados ao meio extra-celular onde eventualmente reconhecidos pelas células da superfície da raiz, promovem modificações nos tecidos radiculares, dando início ao desenvolvimento do nódulo (Schlman et al. 1992 *apud* Sanjuan et al., 2000).

Além da comunicação entre o rizóbio e a leguminosa desencadeada pelo reconhecimento dos flavonóides e lipoquitoligossacarídeos, a produção de lecitina pela leguminosa atua como um estímulo biológico importante que influencia o microssimbionte na ligação aos pêlos radiculares, através de um aumento da síntese de exopolissacarídeos (Mody et al., 1990). O efeito da lecitina, no entanto, ainda não é bem compreendido, mas a presença deste composto não parece estar relacionada diretamente com a resposta específica da simbiose, mas sim no seu processo inicial (Hirsch, 1999).

O estudo da simbiose em nível molecular tem recebido atenção especial, uma vez que uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na indução e estabelecimento da simbiose, pode representar um avanço na obtenção de estirpes de rizóbio mais específicas e/ou mais competitivas (Stacey, 2000).

Sob este ponto de vista, há de se destacar também a necessidade do entendimento da transferência de informações genéticas entre bactérias no solo, o que talvez possa ser o ponto chave do entendimento da especificidade simbiótica. Ao contrário do que anteriormente se pensava, estudos tem mostrado que a transferência lateral de genes simbióticos, também ocorre com regiões móveis do genoma (Sanjuan et al., 2000), e não somente mediante a transconjugação de plasmídeos (Sullivan et al., 1995).

Segundo este mesmo autor, bactérias nativas, adaptadas as condições do solo local, tornam-se os principais competidores com o inoculante introduzido, assim que

adquirirem informações genéticas que lhes possibilitem estabelecer uma simbiose com a planta hospedeira. Dois exemplos têm sido comentados a cerca da transferência lateral de informações simbióticas. Um é o caso da introdução do feijão comum na Europa, por volta do século XI, onde evidências levam a crer que espécies de rizóbio nodulantes de feijão tenham sido introduzidas via contaminação de sementes e que o plasmídeo simbiótico de *R. etli* bv. *phaseoli* (*R. leguminosarum* bv. *phaseoli*) tenha sido transferido para espécies de rizóbios já presentes nos solos europeus. Como resultado, tem sido verificado em solos europeus três grupos de estirpes de rizóbio nodulantes de feijão, de acordo com o plasmídeos siombióticos (Sanjuan et al., 1999): estirpes exclusivamente pertencentes a *R. etli* com plasmídeos simbióticos de bv. *phaseoli* (Sessitch et al., 1997 *apud* Sanjuan et al., 2000), estirpes com plasmídeos simbióticos de bv. *phaseoli* pertencentes a *R. etli*, coexistindo com outras espécies de rizóbio (Herrera-Cervera et al., 1998 *apud* Sanjuan et al., 2000) e estirpes, também com plasmídeos simbióticos de bv. *phaseoli*, porém pertencentes a outras espécies de rizóbio (Amarger et al. 1997; *apud* Sanjuan et al., 2000). O outro exemplo, que segundo Sanjuan et al., (2000) demonstra na prática, a implicação ecológica da transferência lateral de informações genéticas envolvidas na nodulação, foi observada por Sullivan et al., (1995, 1998) *apud* (Sanjuan et al., 2000), onde *Lotus corniculatus* foi inoculado e cultivado durante sete anos. Após este período verificou-se que somente 19% dos nódulos foram formados pela estirpe inoculante e o restante por rizóbios nativos, em área, onde, antes do início dos cultivos não havia ocorrido nodulação desta leguminosa. A consequência direta deste fenômeno é a perda da especificidade e eficiência simbiótica da estirpe utilizada como inoculante por estirpes emergentes, que normalmente apresentam baixos níveis de FBN.

O caupi é capaz de nodular com 6 diferentes espécies de rizóbio, *B. japonicum* (Jordam et al. 1982), *B. elkanii* (Kuykendall et al., 1992), *S. fredii* (Scholla et al., 1984; de Lajudie et al., 1994), *S. xinjiangensis* (Chen et al., 1988), *R. hainanense* (Chen et al., 1997), *R. tropici* IIA observada a nodulação neste trabalho (capítulo I) e várias outras estirpes ainda não identificadas em nível de espécie que são agrupadas como *Bradyrhizobium* spp. Por este motivo, segundo Martins et al. (1996), o caupi se presta como planta isca para a obtenção de nódulos e determinação da diversidade de rizóbio, haja vista a sua amplitude

de nodulação com diferentes estirpes de rizóbio. Por outro lado, a promiscuidade das plantas de caupi dificulta a introdução de estirpes selecionadas, restringindo desta forma a contribuição potencial da FBN.

O termo promiscuidade simbiótica parece reunir uma série de fatores ligados à falta de estudos da melhoria do processo de cultivo do caupi com respeito, ao melhoramento de cultivares que se adaptem a cada sistema de cultivo, aos estudos de seleção de inoculantes e dos fatores que interferem a simbiose caupi/rizóbio.

A falta de resultados satisfatórios em condições de campo com respeito a FBN, não podem ser atribuídos somente a nodulação do caupi com várias espécies de rizóbios, pois, por exemplo, no caso da soja, também já se constatou a nodulação com várias espécies de rizóbio, no entanto, houve grande trabalho de seleção de inoculantes e melhoramento genético de plantas, com o fim de obter maiores contribuições na FBN. Este procedimento levou ao abandono de cultivares de soja, tidas como boas produtoras de grãos, por apresentarem uma simbiose com rizóbio pouco eficiente (Vargas & Hungria, 2000).

Apesar de promiscua, a simbiose caupi/rizóbio pode induzir as plantas de caupi a um expressivo crescimento vegetativo e rendimento de grãos, quando utiliza-se inoculantes de *Bradyrhizobium* spp. eficientes (Neves et al., 1982), sendo o acúmulo de nitrogênio na planta promovido pela FBN um parâmetro bastante utilizado para esta comprovação. Neves et al. (1987), calcularam que a contribuição relativa da FBN, variou entre 50 e 73kg.ha⁻¹ de N em experimentos conduzidos no Cerrado brasileiro, enquanto em condições de campo Wani et al. (1995) citam uma estimativa mais ampla entre 9 a 125kg.ha⁻¹ nos campos africanos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Teste de Eficiência Simbiótica em Casa de Vegetação

3.1.1 - Escolha das Estirpes

A escolha das estirpes (isolados obtidos do Cerrado, que serão coletivamente chamados de estirpes) a serem testadas foi feita a partir do agrupamento morfológico (Capítulo I). Foram selecionados isolados de cada grupos morfológicos em nível de 80% de similaridade, observando-se a área de coleta da amostra do solo e a cultivar de caupi utilizadas para a captura do rizóbio. Ao todo foram testados 15 estirpes obtidos do solo de cerrado e as estirpes BR2001 (recomendada pela RELARE), BR3267 (obtida do semi-árido nordestino; Martins, 1996) e BR3262 (obtida do Sistema Integrado de Produção Agroecológico (SIPA) da Embrapa Agrobiologia/UFRRJ/Pesagro-Rio; Zilli et al., 1998).

3.1.2 - Cultivo das Plantas

O experimento foi conduzido sob condições estéreis em casa de vegetação nos meses de outubro e novembro de 1999. O delineamento experimental utilizado foi blocos ao acaso com 5 repetições. Usou-se um tratamento controle isento de inoculante e nitrogênio e uma testemunha nitrogenada ($25\text{mg.vaso}^{-1}.\text{semana}^{-1}$ de N, na forma de NH_4NO_3) isenta de inoculante. O cultivo foi realizado em vasos de *Leonard* (Vincent, 1970), contendo areia e vermiculita estéreis (2:1; areia: vermiculita). As sementes do caupi (cultivar BR17) foram lavadas com etanol (100%; 30 segundos), desinfestadas com hipoclorito de sódio (5%; 3 minutos) e lavadas com água esterilizada 10, sucessivamente. A semeadura foi realizada diretamente nos vasos (3 sementes por vaso), sendo que após a germinação deixou-se apenas uma planta por vaso.

3.1.3 - Preparo dos Inoculantes e Inoculação das Plantas

Inicialmente as estirpes foram crescidas em meio de cultura YMA líquido (Fred & Waskman, 1928) (28°C ; 48 horas). Alíquotas de $10\mu\text{l}$ foram transferidas para placas de Petri contendo meio YMA sólido, onde procedeu-se uma diluição seriada com duas repetições entre 10^{-1} a 10^{-8} . Após o surgimento das colônias nestas placas, fez-se a

contagem das colônias, estimando o volume do inoculante necessário para a obtenção de uma concentração da ordem 10^8 unidades formadoras de colônias por ml. De posse desta informação, cresceu-se novamente as estirpes em meio YMA líquido (28°C ; 48 horas) sob agitação (120rpm). As plantas foram inoculadas com 1ml do inoculante para cada planta, três dias após a germinação das mesmas.

3.1.4 - Irrigação e Nutrição das Plantas

A irrigação foi realizada com água destilada e esterelizada. Os nutrientes foram adicionados à água na forma de solução nutritiva Norris e Döbereiner: KCl (2mM); K_2HPO_4 (0,3mM); KH_2PO_4 (0,7mM); $\text{CaSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,3 μM); $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,7 μM); MnSO_4 (1 μM); $(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,002 μM); H_3BO_3 (11,5 μM); $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (17,9 μM); ácido cítrico (26 μM). Forneceu-se 0,25l desta solução por vaso semanalmente e água esterilizada sempre que necessário.

3.1.5 - Colheita do Experimento e Parâmetros Analisados

As plantas foram colhidas aos 55 dias (estágio de florescimento) após o plantio. Para a determinação da atividade da nitrogenase utilizou-se o método de redução de acetileno (C_2H_2) em raízes destacadas (Mague e Burris, 1972). Após separadas da parte aérea, na altura do nó cotiledonar, as raízes noduladas foram incubadas com acetileno a uma concentração de 10% (30ml), por 10 minutos em recipientes de vidros com volume de 300ml, hermeticamente fechados. Após este período, coletou-se 2 amostras (1ml cada) do interior de cada recipiente, as quais detectou-se o etileno produzido em um cromatógrafo gasoso.

Os nódulos, inicialmente foram destacados das raízes e contados. Posteriormente, nódulos, raízes e parte aérea foram secos em estufa (60°C ; 72 horas) para determinação do peso seco. Após a pesagem, a parte aérea das plantas foi moída para a determinação do N-total pelo método “semimicro KJELDAHL, (Liao, 1981) no laboratório de Nitrogênio da Embrapa Agrobiologia. Também foi avaliado o parâmetro eficiência nodular ($\text{Es} = \text{N-total acumulado na parte aérea da planta} / \text{massa seca de nódulos}$), (Saito, 1982).

3.2 - Teste de Competitividade e Eficiência Simbiótica das Estirpes no Campo

3.2.1 - Seleção das Estirpes e Preparo do Inoculante

Sete bactérias testadas em casa de vegetação (BR2001, BR3262, BR3267, 1B13, 7A4, 2A9, 3A8) que apresentaram bons resultados foram selecionadas para testes no experimento de campo. O inoculante foi preparado crescendo-se inicialmente as bactérias em meio YMA líquido por 72 horas e aplicação em turfa esterilizada, sendo a concentração obtida no inoculante da ordem de 10^8 unidades formadoras de colônias por grama do inoculante.

3.2.2 - Estimativa do Número de Rizóbios no Solo Através do Método do NMP

Coletou-se 1 amostra de solo composta de cada um dos blocos do experimento, sendo que cada amostra composta era formada por 10 sub-amostras. Após a coleta, as amostras foram imediatamente estocadas em geladeira. A estimativa do NMP (número mais provável), foi realizada pelo método descrito por Woomer (1994). Inicialmente, as amostras foram destorroadas e 100g de solo transferidas para um erlenmeyer, contendo 400ml de solução diluente (0,125g de K_2HPO_4 ; 0,05g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 1 litro de água destilada esterilizada). As amostras foram então agitadas (20 minutos; 5000 rpm) em um agitador horizontal. Considerou-se esta diluição 1:5. Posteriormente, 5ml destas amostras, foram transferidos para novos erlenmeyers com 20ml de solução diluente, tendo-se assim a diluição 1:25. Repetindo-se este procedimento, fez-se diluições seriadas até a ordem de 1:15625.

Como plantas hospedeiras, utilizou-se o siratro (*M. atropurpureum*), que foi plantado em tubos de ensaio de 100ml, contendo 20ml da solução salina de Fahraeus (Fahraeus, 1957) e agar ($12g.l^{-1}$). A inoculação das plantas foi realizada com 1ml das amostras de solo diluídas. Após 45 dias as plantas foram coletadas observando-se a formação de nódulos e estimando-se o número de rizóbios no solo, através das tabelas apresentadas por Woomer et al. (1994).

3.2.3 - Montagem do Experimento

Este experimento foi montado no mês de fevereiro de 1999 no município de Baixa Grande do Ribeiro no estado do Piauí, coincidindo com a época de plantio do caupi na região.

O delineamento experimental utilizado foi blocos ao acaso com 3 repetições. Cada parcela (repetição) constou de 5 X 3 metros de dimensão, com dois metros de bordadura.

Utilizou-se a cultivar de caupi BR17 (recomendada para a região), com espaçamento de 50cm entre linhas e 10cm entre plantas. O experimento constou de 9 tratamentos, sendo as sete estirpes supra citadas, 1 tratamento com nitrogênio na forma de uréia (100kg.ha^{-1}), aplicada 50% no plantio e 50% 30 dias após o plantio e, uma testemunha sem N e sem inoculante (controle). O experimento recebeu uma adubação com 200kg.ha^{-1} do formulado mineral NPK-00:40:06, conforme recomendação de cultivo na fazenda.

A inoculação das sementes foi realizada de acordo com o manual de recomendação de inoculação da Embrapa (De-Polli & Franco, 1985).

3.2.4 - Coleta de Nódulos e Colheita do Experimento

Inicialmente, estava previsto uma coleta de nódulos aos 40 dias, onde algumas plantas seriam coletadas ao acaso em cada uma das repetições do experimento. Pretendia-se também avaliar o teor de N-total nas folhas das plantas, que seria coletadas por volta dos 55-60 dias e também a produção de grãos do experimento, a qual seria o principal parâmetro de distinção do efeito dos tratamentos. Porém por volta dos 35 dias ocorreu um ataque severo de cerotoma (*Cerotoma arcuata*), por ocasião da colheita das lavouras de soja circunvizinhas. O ataque foi intenso e acabou causando danos irreversíveis ao experimento, impedindo assim a avaliação da produção de grãos.

Embora tenha ocorrido a perda do experimento, foi possível a coleta de nódulos em todas as repetições. A coleta foi realizada retirando-se algumas plantas ao acaso em cada uma das repetições, sendo que pelo menos 20 nódulos de cada repetição foram coletados. Estes nódulos foram inicialmente acondicionados em sílica gel (temperatura ambiente) e posteriormente analisou-se 10 nódulos de cada uma das repetições através da reação de *ELISA*.

3.2.5 - Produção dos Anti-soros e Testes de *ELISA* (Teste de Imunoadsorção com Enzima Acoplada)

3.2.5.1 - Preparo dos Antígenos, Inoculação dos Coelhos e Coleta do Sangue

As estirpes BR2001, BR3262, BR3267, 1B13, 7A4, 2A9, 3A8 foram inicialmente crescidas em 50ml do meio de cultura YMA líquido (Fred e Waksman, 1928) (28⁰C; 5 dias). Após o crescimento, as células bacterianas foram centrifugadas (10 minutos; 15000g), descartando-se o sobrenadante, com posterior ressuspensão do pelet em 50ml de água destilada esterilizada. Este procedimento foi repetido por três vezes para total remoção do meio de cultura. O precipitado final foi ressuspensão em 5 ml de água destilada esterilizada e dividido em alíquotas de 1ml em tubos de microcentrifuga, onde procedeu-se uma nova centrifugação (10minutos; 15000g) para total remoção de componentes extracelulares e obtenção de um pelet uniforme. Descartou-se o sobrenadante e acrescentou-se 1ml de água destilada esterilizada em cada microtubo. As amostras foram agitadas em vórtex e aquecidas (90⁰C; 30 minutos), para que houvesse desprendimento dos flagelos. Novamente efetuou-se 2 centrifugações, iguais as anteriores, para nova lavagem das células bacterianas. Após estas etapas os antígenos foram ressuspensos em 1ml de água destilada esterilizada e estocadas (-20⁰C) até a sua utilização. A produção de antígenos seguiu o método apresentado por Reis et al. (1997).

A inoculação do antígeno nos coelhos foi realizada segundo Ribeiro (1999). Foram escolhidos coelhos jovens (5 a 6 semanas). Na primeira inoculação fez-se uma emulsão com 1ml do antígeno, 0,5ml de adjuvante Freud completo e 0,5ml de adjuvante Freud incompleto, agitando-se até obter-se uma solução homogênea. Esta emulsão foi injetada subcutaneamente em 7 a 8 pontos na região lombar dos animais. A segunda inoculação foi realizada 15 dias após a primeira, onde 0,5ml do antígeno foi acrescido de 0,5ml de solução salina esterilizada (NaCl; 0,9%). A aplicação foi realizada em 1 ou 2 pontos da região lombar. Posteriormente foram feitas inoculações, iguais a segunda, semanalmente, até a 8 semana.

Foram realizadas ao todo 4 coletas de sangue: antes da primeira inoculação coletou-se 5ml de sangue pré-imune de cada animal e na terceira e quinta semana após o início da aplicação do antígeno coletou-se novamente 5ml de sangue de cada animal. Estas coletas

foram sempre realizadas pela veia periférica da orelha. A sangria final e a preparação dos anti-soros foram realizadas de acordo com Carpenter (1975). Cinquenta mililitros de sangue foram retirados de cada coelho por punção cardíaca com seringa esterilizada. O sangue coletado foi posto em frasco de vidro esterilizado, onde deixou-se por 2 a 3 horas para a total coagulação. Após este período foi possível separar o soro do coágulo. O soro foi coletado cuidadosamente com pipeta automática e centrifugado (600g; 10 minutos; 4°C). As células precipitadas foram descartadas e o sobrenadante transferido para um outro frasco onde foi armazenado. O coágulo foi descolado das paredes do vidro e guardado a 4°C por uma noite, para que sofresse contração e liberasse o restante do soro. Na manhã seguinte o soro liberado pelo coágulo foi coletado, centrifugado e misturado com o soro coletado no dia anterior e estocado a -20°C.

3.2.5.2 - Purificação dos Anti-soros, Curvas de Titulação e Testes de *ELISA*

A purificação foi realizada utilizando-se colunas contendo proteína A de *Staphylococcus aureus* ligadas a agarose. Para os anti-soros BR3267, BR2001, 7A4, 3A8 e 2A9 utilizou-se a coluna HiTrap® Protein A (Amensham Pharmacia Biotech) e para os anti-soros BR3262 e 1B13 a coluna Econo-Pac® Protein A Cartridge (BioRad). Os protocolos de purificação dos anti-soros estão listados no Apêndice 5.

Os testes de *ELISA*, foram realizadas em uma placa de poliestireno Hemobag® (Hemobag Produtos Cirúrgicos, LTDA) de 96 poços e seguiram o protocolo descrito por Reis et al. (1997). Cada poço recebeu 50µl de Poli-L-lisina (0,01%), seguido de incubação (20 minutos; temperatura ambiente) e lavagem com 200µl de tampão TBS 0,1M (TBS: tris-HCl 10mM; NaCl 0,15M; pH8,0). Posteriormente aplicou-se 50µl do antígeno por poço (o mesmo antígeno injetado nos coelhos ou 50µl de nódulo masserado em 500µl de água destilada) e incubou-se as placas (37°C; 30 minutos). Após este período a placa foi lavada 1 vez com 200µl TBS 0,1M por poço, adicionou-se 100µl de solução de bloqueio (albumina bovina 3% em TBS 0,1M), incubando-se a 37°C por 30 minutos. Decorrido este tempo, a solução de bloqueio foi retirada, acrescentou-se então 50µl do anticorpo primário (anti-soro) e incubou-se as placas (37°C; 30 minutos). Para a determinação da curva de titulação,

o anticorpo primário foi diluído sucessivamente nas frações 1/5 até 1/640. Após os 30 minutos de incubação, retirou-se o excesso de anticorpo primário e a placa foi lavada 3 vezes com solução de lavagem (albumina bovina 0,5%; tween 20 0,05%; diluídos em TBS 0,1M). Depois da lavagem, adicionou-se a cada poço 50µl do anticorpo secundário (anti-imunoglobulina de coelho conjugado com a enzima fosfatase alcalina, Sigma[®]), seguido de incubação (37⁰C; 60 minutos). O conjugado restante foi retirado e a placa lavada 5 vezes com 200µL da solução de lavagem por poço. Em seguida, 100µl/poço da solução contendo o substrato para a enzima fosfatase alcalina (p-Nitrofenilfosfato) foram adicionados e a reação foi mantida por 30 minutos a temperatura ambiente. Após este período efetuou-se a leitura da placa a 405nm, em espectrofotômetro Labsystem Multiskan Plus (especial para a leitura) da placa e acoplado a um computador com o Labsystem Transmit Multiskan Plus.

3.3 - Relação Filogenética das Estirpes de Rizóbios utilizadas como Inoculantes

A relação filogenética das estirpes de rizóbio estudadas quanto sua eficiência simbiótica foi realizada utilizando-se os dados de ARDRA, referente a estas estirpes, obtidos no capítulo I deste trabalho (Material e Métodos, item 3.7).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Eficiência Simbiótica

Foram testadas 12 estirpes de rizóbio provenientes do Cerrado do estado do Piauí (1B13, 7A4, 2A9, 3A8, 8A2, 2C3, 3A5, 6A4, 4A5, 2B9, 7C5 e 1C5) e 3 as BR2001, BR3262 e BR3267.

Tabela 1 – Médias de matéria seca total (g), nitrogênio total acumulado na parte aérea das plantas (mg), massa de nódulos secos (g), eficiência nodular (N-total acumulado na parte aérea da planta / massa seca de nódulos; mg.g^{-1}) e taxa de fixação (N-total da amostra – N-total do controle x 100 / N-total da amostra) de plantas de caupi inoculadas com 15 diferentes estirpes de rizóbio.

Estirpes	Matéria seca total	N-total da parte aérea	Massa de nódulos secos	Número de nódulos	Eficiência Nodular
BR3267	9,55 a	288,24 a	0,89 a	204,25 ab	272,89 ab
BR3262	8,66 a	293,27 a	0,62 a	145,25 ab	563,66 a
7A4	7,74 ab	239,17 abc	0,87 ab	268,50 ab	277,97 ab
BR2001	7,39 abc	250,12 ab	0,37 ab	116,00 ab	612,58 a
1B13	6,96 abc	218,83 abcd	0,71 ab	315,75 a	321,23 a
7C5	6,58 abcd	206,88 abcd	0,66 ab	219,25 ab	380,74 a
3A8	6,41 abcd	239,58 abc	0,49 ab	99,75 ab	522,45 a
2A9	5,97 abcd	198,53 abcd	0,45 ab	167,75 ab	382,48 a
8A2	5,86 abcde	118,06 bcde	0,70 ab	212,25 ab	149,31 b
3A5	5,82 bcde	133,93 abcde	0,63 ab	132,50 ab	217,92 ab
2B9	4,55 bcde	124,70 bcde	0,26 b	125,75 ab	453,73 a
2C3	3,68 cde	78,52 cde	0,22 b	77,75 ab	304,11 ab
1C5	3,41 de	93,28 bcde	0,31 ab	125,50 ab	363,52 a
4A5	2,66 de	71,17 de	0,31 ab	172,00 ab	315,81 a
6A4	1,93 de	56,60 de	0,22 b	64,25 b	342,05 a
175mg de N*	4,51 bcde	57,15 de	--	--	--
Controle (S/I)	0,87 e	5,39 e	--	--	--
CV (%)	40,11	20,86	24,50	26,61	28,12

Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente a nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Os dados de N-total parte aérea, número de nódulos, eficiência nodular e redução de acetileno foram corrigidos pela raiz quadrada para terem homocedastia e distribuição normal.

* Acúmulo do N aplicado durante 7 semanas ($25\text{mg.vaso}^{-1}.\text{semana}^{-1}$).

Dez das estirpes provenientes do Cerrado apresentaram médias significativamente iguais a da estirpe BR2001 e superior ao tratamento com 25mg.semana^{-1} de N, em todos os parâmetros analisados (Tabela 1). A estirpe BR2001, atualmente recomendada pela

RELARE como inoculante para a cultura do caupi, tem apresentado bons níveis de FBN em casa de vegetação (Martins, 1996; Zilli et al., 1999). Porém, embora seja recomendada há alguns anos, poucos trabalhos de avaliação da sua eficiência simbiótica têm sido feitos em campo, o que é necessário, na prática, para a determinação dos benefícios a cerca do uso deste inoculante para a cultura do caupi. Ferreira et al. (1999) conduziram um experimento de campo com caupi, na Fazendinha Agroecológica (SIPA), por um período de 2 anos, com o objetivo de avaliar a competitividade e o estabelecimento desta estirpe frente a população de rizóbio nativa do solo. A identificação da estirpe formadora do nódulo foi determinada por *ELISA* em nódulos coletados das raízes de caupi coletadas nas parcelas experimentais e também do cultivo de caupi com solo da área do experimento. Os resultados obtidos indicaram que esta estirpe não foi capaz de contribuir para a nodulação das plantas no campo e também não foi capaz de se estabelecer no solo. Estes resultados provavelmente estão associados à dificuldade de adaptação às condições de campo desta estirpe, que podem ser justificados por ela ter sido proveniente de nódulos de *Crotalaria juncea* coletados na Libéria (Franco, comunicação pessoal).

As estirpes que apresentaram eficiência simbiótica semelhante ou maior do que a BR2001, por serem provenientes de solo de Cerrado, podem representar uma boa alternativa de inoculantes para a região, pois provavelmente elas devam estar bem adaptadas às condições edafoclimáticas destes locais.

Estudos de seleção de inoculantes que privilegiem testes com rizóbios nativos ou naturalizados no local de seleção, têm sido considerados capazes de apresentarem melhores resultados, a medida que estirpes já estabelecidas no solo, normalmente são mais competitivas que estirpes introduzidas de outros locais (Chatel, 1968; Thies et al., 1991b; Neves et al., 1992, 1996).

A adaptação de estirpes de rizóbio no solo foi intensamente estudada no final da década de 80 e início dos anos 90 (Neves et al., 1992, 1996). Estes autores introduziram estirpes de rizóbio no solo e reisolaram ao final do ciclo da cultura da soja, repetindo esta estratégia por vários ciclos. Os resultados indicaram que as estirpes introduzidas conseguiram adaptar-se as condições do solo sem perder eficiência de FBN. Resultados semelhantes também foram observados por Vargas et al., (1994a, b) que recuperaram

estirpes de *B. japonicum* descendentes de estirpes utilizadas como inoculantes alguns anos atrás. Segundo o autor as estirpes isoladas mantiveram a eficiência simbiótica, semelhante as suas parentais, porém, conseguiram competir melhor na nodulação da soja.

Quanto à produção de matéria seca observou-se que a maioria das estirpes proporcionaram uma produção muito superior à testemunha nitrogenada, 8 delas inclusive, com produção acima de 6g (Tabela 1; Figura 1), que é uma alta produção, comparada com experimentos semelhantes conduzidos por outros autores (Martins, 1996; Zilli et al., 1999). Contudo, 25mg.semana^{-1} de N pode não ter sido suficiente para o desenvolvimento máximo das plantas testemunhas.

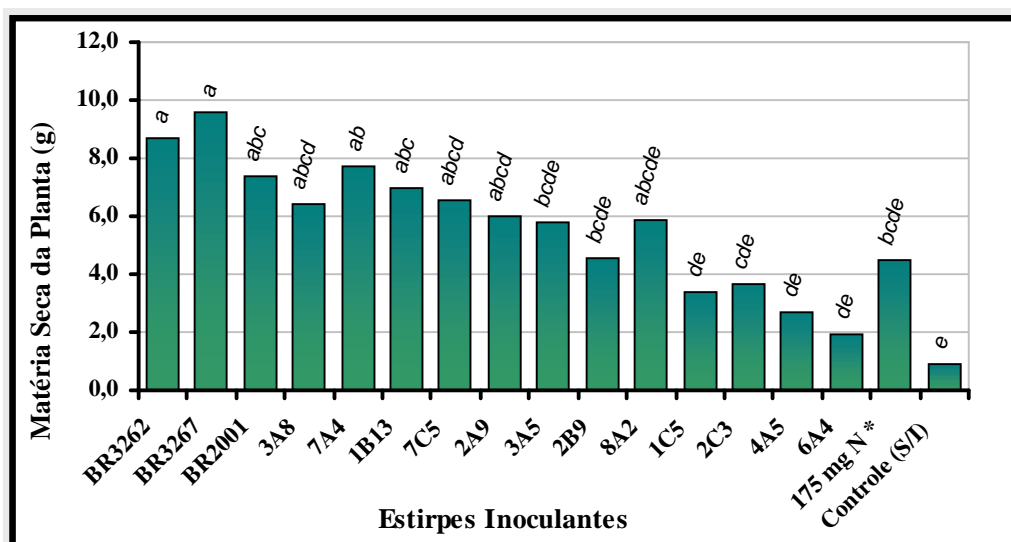


Figura 1 - Matéria seca produzida por plantas de caupi inoculadas com estirpes de rizóbio isoladas do solo de Cerrado. As estirpes BR2001, BR3262 e BR3267 foram oriundas da coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia.

* Acúmulo do N aplicado durante 7 semanas ($25\text{mg.vaso}^{-1}.\text{semana}^{-1}$)

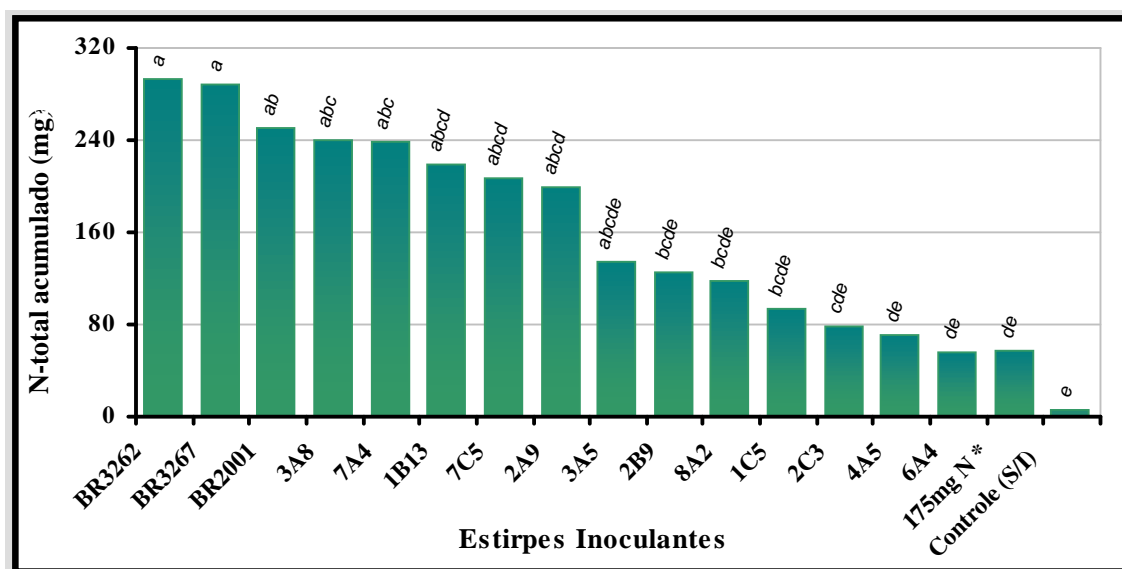


Figura 2 - N-total acumulado pela parte de plantas de caupi inoculadas com estirpes de rizóbio obtidas do cultivo de caupi com solo de Cerrado. As estirpes BR2001, BR3262 e BR3267 foram oriundas da coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia.

* Acúmulo do N aplicado durante 7 semanas ($25\text{mg.vaso}^{-1}.\text{semana}^{-1}$)

Semelhante ao parâmetro anterior, relativo a produção de matéria seca, a maioria das estirpes contribuíram para um elevado acúmulo de N quando comparado a outros trabalhos. Oito delas se destacaram contribuindo com um acúmulo de N superior a 200mg.planta^{-1} (Tabela 1, Figura 2). Destacadamente as estirpes BR3267 e BR3262 apesar de não terem apresentado diferenças significativas da estirpe BR2001, acumularam um teor de N cerca de 15% maior. É importante destacar que a estirpe BR3262 isolada da fazendinha Agroecológica (Zilli et al., 1997) já foi testada em outros experimentos de eficiência simbiótica (Zilli et al., 1999; Valicheski, dados não publicados), apresentando em todos um bom desempenho.

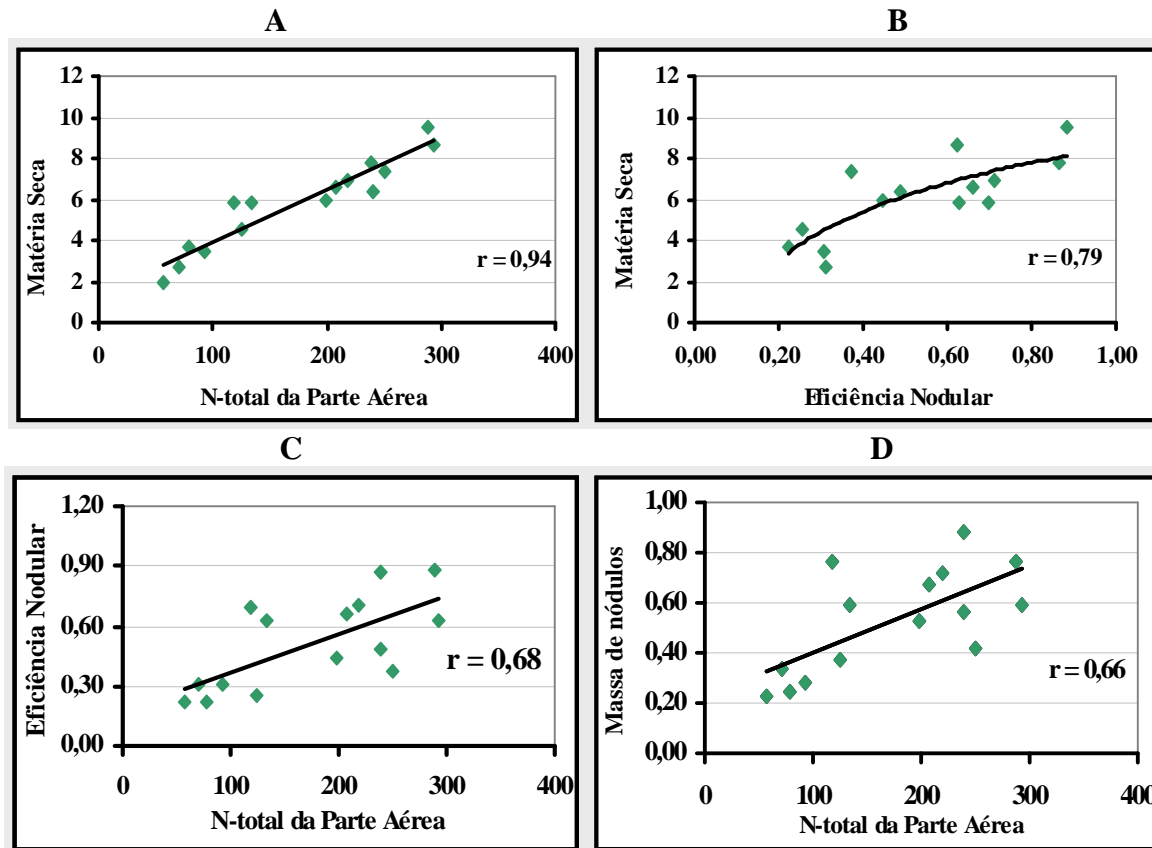


Figura 3 - Correlações entre os parâmetro de eficiência simbiótica de 15 estirpes de rizóbio nodulante de caupi. (A) – correlação entre matéria seca da planta por N-total da parte aérea, (B) – matéria seca por eficiência nodular (N-total da parte aérea / massa seca de nódulos; mg.g^{-1}), (C) - Eficiência nodular (N-total da parte aérea / massa seca de nódulos; mg.g^{-1}) por N-total da parte aérea e (D) - Massa seca de nódulos por N-total da parte aérea.

A Figura 3 (A) mostra uma correlação linear entre os parâmetros matéria seca produzida e N-total acumulado pela parte aérea das plantas, demonstrando, que a capacidade produtiva das plantas não foi explorada totalmente, ou seja, a quantidade de N não atendeu o potencial produtivo das plantas.

O parâmetro eficiência nodular (Saito, 1982) indicou que apenas a estirpe 8A2 não teve uma eficiência significativamente igual a da estirpe BR2001, mostrando que embora o acúmulo de N tenha sido maior para algumas estirpes, a atividade nodular foi semelhante, havendo variação apenas na massa de nódulos (Tabela 1). Esta observação se expressa na Figura 3 (C e D), onde se observa uma baixa correlação entre eficiência nodular com o N-total acumulado e massa de nódulos secos com o N-total acumulado. De modo geral, a

estirpe que teve uma melhor eficiência nodular não foi necessariamente a que proporcionou o maior acúmulo de N e nem a que produziu a maior massa de nódulos a que teve a melhor eficiência simbiótica. A massa de nódulos parece ter sido o fator discriminante entre as estirpes na acumulação de N, pois mesmo possuindo uma eficiência nodular menor, a maior quantidade de tecido nodular propiciou acúmulo de N semelhante. No caso da cultura da soja tem-se verificado, de modo geral, que estirpes de *B. japonicum* produzem menos nódulos quando comparadas com estirpes de *B. elakanii*, no entanto, seus nódulos apresentam uma maior eficiência (Boddey & Hungria, 1997). A observação de baixa correlação entre os parâmetros de eficiência nodular com a massa de nódulos e rendimento da produção das plantas de caupi também foi verificado também Zablotowich & Focht (1981).

A redução de acetileno é normalmente a análise utilizada para obter a estimativa direta da atividade da nitrogenase (Mague & Burris, 1972), pois esta enzima pode utilizar o acetileno como substrato ao invés de N_2 . Porém, por problemas ocorridos no cromatógrafo gasoso, não foi possível a determinação da concentração do acetileno reduzido pelas estirpes. No entanto, Valicheski (dados não publicados), conduziu um experimento em casa de vegetação onde avaliou a atividade da nitrogenase das estirpes BR3267, BR2001, BR2362, 7A4 e 1B13 utilizadas neste experimento.

O experimento conduzido por Valicheski (dados não publicados) testou a recuperação da atividade da nitrogenase de estirpes de rizóbios nodulantes de caupi quando submetidas a um choque térmico ($40-42^{\circ}C$; $5 \text{ horas}^{-1} \cdot \text{dia}$; 3 dias consecutivos). Os resultados apresentados no Quadro 4 e na Figura 4, são parciais e se referem apenas aos dados obtidos para as estirpes BR3267, BR2001, BR2362, 7A4 e 1B13. Observa-se, que em todos os tratamentos houve uma pequena queda no teor de N-total das plantas (Quadro 4), em função do estresse térmico sofrido pelas bactérias. Já para a matéria seca houve um pequeno aumento entre os dois períodos, indicando que o N que estava presente nos tecidos das plantas foi suficiente para manter o crescimento das plantas.

Quadro 4* - Teor de nitrogênio (%) nas folhas e produção de matéria seca (g) por plantas de caupi submetidas a um choque térmico. Experimento conduzido por Valicheski, (dados não publicados).

Estirpes	Nitrogênio acumulado nas folhas (%)		Matéria seca (g)	
	Coleta logo após o choque	Coleta 1 semana após o choque	Coleta logo após o choque	Coleta 1 semana após o choque
BR3267	1,57	1,75	0,23	0,29
BR2001	3,83	3,71	0,74	1,42
7A4	3,49	2,94	1,35	2,28
BR3262	4,11	4,01	1,64	2,69
1B13	3,94	3,27	1,86	2,37

* Dados reproduzido com autorização autor.

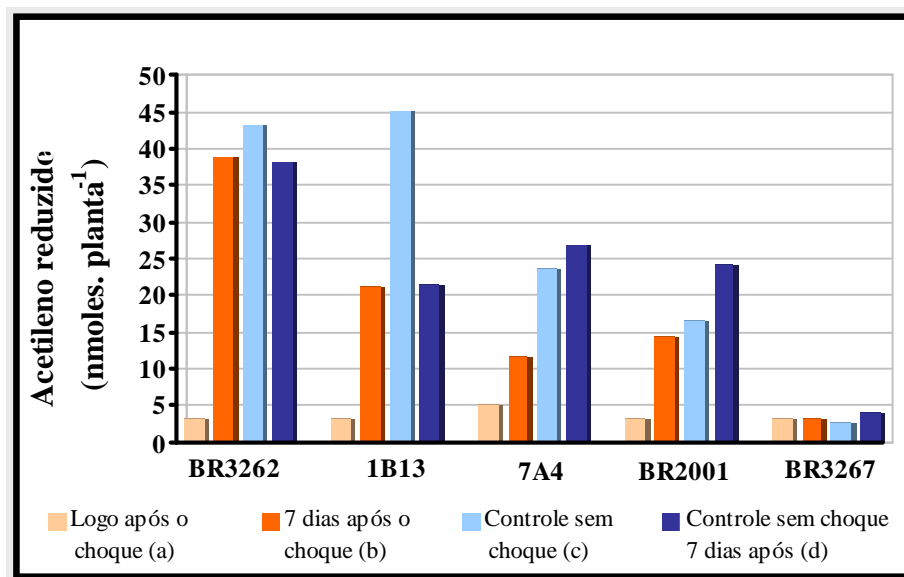


Figura 4* - Atividade de redução de acetileno (ARA), realizada por Valicheski (dados não publicados), mostrando o efeito do choque térmico aplicado em plantas de caupi inoculadas com as estirpes de rizóbio 1B13, BR3262, 7A4, BR2001 e BR3267. (a) – ARA no tratamento que recebeu choque térmico (b) - ARA no tratamento que recebeu choque térmico após 7 dias, (c) – ARA no tratamento controle (d) – ARA no tratamento controle após 7 dias.

Obs. - A ARA foi realizada logo após o término do choque térmico.

* Dados reproduzido com autorização autor.

De maneira geral, com exceção da estirpe BR3267, todas as estirpes apresentaram alta atividade de redução de acetileno, o que representa alta atividade da nitrogenase. Quanto a capacidade de recuperação após o choque térmico, a estirpe 7A4 conseguiu recuperar pelo menos 50% da sua atividade, quando comparada a testemunha, enquanto as

estirpes BR3262, 1B13 e BR2001 recuperam totalmente a sua atividade. A excelente recuperação destas estirpes, após o choque térmico, demonstra que elas possuem boa adaptação às altas temperaturas o que pode ser favorável na seleção de inoculantes para regiões de clima tropical (Wani et al., 1995).

4.2 - Avaliação da Ocupação Nodular através da Técnica de *ELISA*

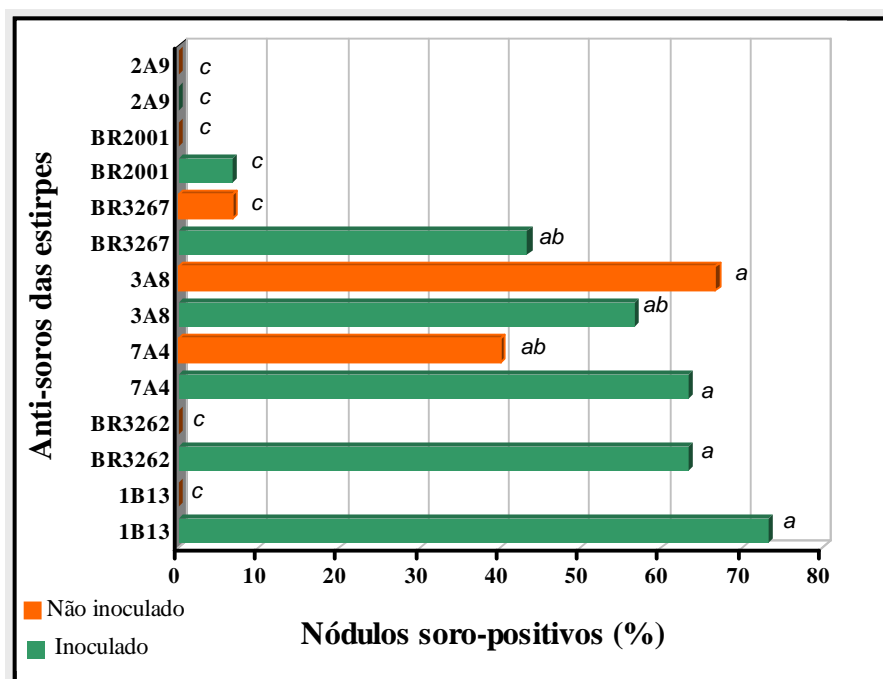


Figura 5 - Percentagem de nódulos soro-positivos avaliada por reação de *ELISA*, utilizando anti-soros policlonais específicos para cada estirpe inoculante. Os dados foram analisados estatisticamente, sendo que tratamentos com as mesmas letras não diferem a nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey, com coeficiente de variação de 30, 01%.

Obs. – A análise estatística foi realizada com os dados reais.

A análise da taxa de ocupação nodular no experimento de campo, através da reação de *ELISA* (Figura 5), revelou que três dos anti-soros utilizados (anti-soro BR3267, 3A8 e 7A5) reagiram positivamente com nódulos coletados no tratamento controle, o qual não havia recebido inoculante, demonstrando desta forma que estas estirpes ou seus soro-grupos estão estabelecidas na área de experimentação. A presença destas estirpes na área do experimento não é uma surpresa, pois com exceção da estirpe BR3267, BR2001 e BR3262, todas as outras foram obtidas de áreas de Cerrado. Ao contrário, não se detectou reações dos anti-soros 1B13, BR3262, BR2001 e 2A9 com nódulos do tratamento controle, o que

indica que estas estirpes não estavam presentes na área do experimento. É importante destacar que as estirpes 1B13 e BR3262 proporcionaram a formação de mais de 60% dos nódulos em área onde elas não estavam estabelecidas, e onde a estimativa do número mais provável de rizóbios na área do experimento revelou alta população de rizóbio, da ordem de 6×10^3 células de rizóbio por grama de solo (apêndice 4), sugerindo desta forma, boa capacidade competitiva destas estirpes.

Uma melhor capacidade de competir por sítios de nodulação no campo tem sido atribuída à espécie *B. elkanii*, no caso da soja (Kuykendall et al. 1988; Neves & Rumjanek, 1997; Boddey & Hungria, 1997). Porém, apesar desta espécie apresentar uma melhor capacidade de competir na formação de nódulos, tem sido verificado uma menor eficiência quanto à FBN quando promovida por estirpes de *B. elkanii*, comparada com estirpes de *B. japonicum* (Teaney & Fuhrmann, 1992; Neves et al., 1987). Isto tem sido atribuído pelo elevado número de nódulos fisiologicamente inativos colonizados por *B. elkanii* (Boddey et al. 1997) e também pelo fenótipo *Hup* presente na associação soja/*Bradyrhizobium japonicum*. No caso de *B. japonicum*, apesar da maior eficiência em termos de FBN, quando comparada à *B. elkanii*, possui dificuldades em competir para a formação de nódulos e se estabelecer no solo. No entanto, trabalhos conduzidos por Weaver et al., (1972) e por Kuykendall (1989) em outros países mostraram a presença de *B. japonicum*, em número elevado, 5 anos após a sua inoculação, mesmo em áreas sem o cultivo de soja. No caso específico do Brasil, Vargas et al. (1994a, b) mostraram a existência de estirpes de *B. japonicum* estabelecidas no solo de Cerrado, que além de serem eficientes na FBN, foram altamente competitivas em nível de campo.

4.3 - Relação Filogenética das Estirpes de Rizóbios Utilizadas como Inoculantes

A análise filogenética (Figura 6) revelou que as estirpes testadas agruparam-se com o gênero *Bradyrhizobium*, demonstrando que todas devam pertencer a este gênero. Sete das estirpes obtidas do solo de Cerrado (estirpes 2A9, 2B9, 3A8, 8A2, 2C3, 3A5 e 6A4) agruparam à 100% de similaridade com a estirpe BR29 (grupo I), o que indica que estas estirpes pertencem a espécie *B. elkanii*, contudo necessitando de confirmação por sequenciamento do 16S rDNA. A estirpe BR2001 também agrupou com *B. elkanii* a pelo

menos 90% de similaridade, mostrando que também provavelmente, pertença à espécie *B. elkanii*. No grupo II, grupo da espécie *B. japonicum*, quatro estirpes agruparam, sendo que 1B13 e 7A4 foram totalmente similares com a estirpe BR111 enquanto, BR3267 e 7C5 apresentaram uma distância de aproximadamente 10% com relação a esta estirpe. É importante perceber que não houve o predomínio da espécie *B. japonicum* ou *B. elkanii* nos parâmetros de eficiência simbiótica testados e que também não se detectou maior formação de nódulos a campo por uma ou outra espécie. Estes resultados diferem do que é normalmente observado na cultura da soja no Brasil. Pois, a maior formação de nódulos é atribuída à espécie *B. elkanii* que se adaptada melhor às condições dos solos brasileiros e a maior eficiência simbiótica à *B. japonicum*, que ocasiona maiores acúmuloa de N e rendimentos na produção de grãos (Neves & Rumjanek, 1997; Boddey & Hungria, 1997). No experimento de campo observou-se também que a estirpe 1B13, identificada por ARDRA como pertencente a espécie *B. japonicum*, foi capaz de ocupar 75% dos nódulos, o que demonstra que embora seja uma estirpe de *B. japonicum*, possui alta capacidade de competir na nodulação de caupi.

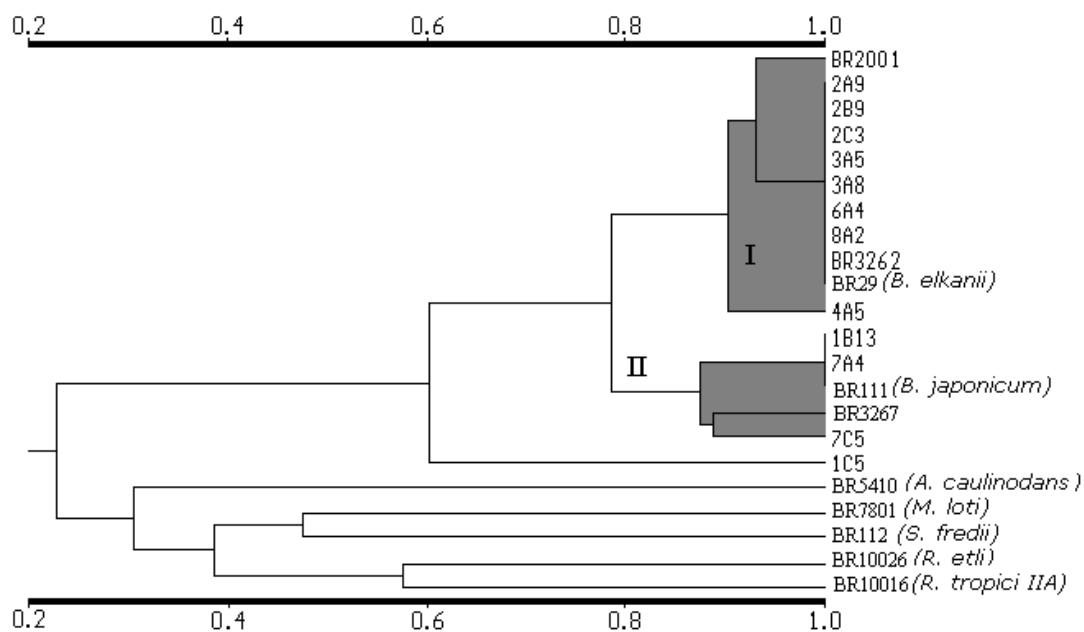


Figura 6 – Dendrograma elaborado pelo algoritmo *UPGMA*, seguindo uma matriz de similaridade genética, mostrando a similaridade entre 15 estirpes de rizóbio nodulante de caupi e 6 estirpes padrões: BR29, BR111, BR112, BR10016, BR10026 e BR5410. A estirpe BR3267, BR3262 e BR2001 foram oriundas da coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia. O coeficiente cofenético calculado teve valor igual a 0,98.

5. CONCLUSÕES

- Os experimento de eficiência simbiótica e ocupação nodular e, a análise filogenética mostraram não haver diferenças significativas na eficiência simbiótica e ocupação nodular entre estirpes de *B. elkanii* e *B. japonicum* na cultura do caupi;
- O experimento de campo mostrou que a estirpe BR2001, atualmente recomenda para a cultura do caupi, estabeleceu baixa nodulação com a cultivar de caupi BR17;
- O experimento de eficiência simbiótica mostrou que as estirpes BR3267 e 3A8 contribuíram significativamente para a FBN em todos os parâmetros avaliados, no entanto, não foi possível avaliar a taxa de ocupação nodular no campo, pois elas ou soro-grupos estavam estabelecidos na área do experimento;
- Os experimento de eficiência simbiótica e ocupação nodular indicaram que as estirpes BR3262 e 1B13 são potencialmente promissoras como inoculantes para a cultura do caupi, pois, além de se destacarem em todos os parâmetros de FBN avaliados, formaram mais de 60% dos nódulos no campo, onde já havia alta população de rizóbios estabelecida.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados de isolamento, caracterização morfológica e genotípica dos isolados de rizóbio, obtidos de plantas de caupi, cultivadas com solo de Cerrado revelaram que na área de Cerrado clímax, há predominantemente uma população de rizóbio semelhante a *B. elkanii*, que altera-se a medida que ocorre o cultivo do solo. Desta forma, também, surge uma população de rizóbio característica de *B. japonicum*, provavelmente em decorrência do uso de inoculantes de *B. japonicum* para a cultura da soja.

Os resultados obtidos do experimento de casa de vegetação indicaram que 10 das estirpes provenientes do Cerrado, assim como também as estirpe BR3267 (oriunda do Semi-árido) e BR3262 (oriunda da Fazendinha Agroecológica) contribuíram para a FBN em caupi, significativamente igual a estirpe BR2001, atualmente recomendada para esta cultura. Entretanto, as estirpes BR3262, 1B13 e BR2001 testadas por Valicheski (dados não publicados), quanto a atividade da nitrogenase após um choque térmico (40-42⁰C; 5 horas.dia⁻¹; 3 dias consecutivos) apresentaram alta atividade da nitrogenase, bem como excelente capacidade de recuperação da atividade desta enzima.

No experimento de campo, onde estimou-se a presença de rizóbios da ordem de 6x10³ células.g⁻¹ de solo, testou-se a ocupação nodular na cultivar de caupi BR17 por 4 estirpes de rizóbios provenientes do Cerrado (1B13, 7A4, 3A8 e 2A9) e as estirpes BR2001, BR3267 e BR3262. Os resultados indicaram, com exceção das estirpes 2A9 e BR2001, que as demais estirpes não diferiram estatisticamente na ocupação nodular das plantas de caupi. No entanto, as estirpes BR3262 e 1B13, identificadas como pertencentes a *B. elkanii* e *B. japonicum*, respectivamente, ocuparam mais de 60% dos nódulos analisados e, ao contrário do que ocorreu para as estirpes 7A4, 3A8 e BR3267 não detectou-se suas presenças ou de seus soro-grupos na área do experimento. O resultado obtido para a estirpe 1B13 indica boa capacidade competitiva de *B. japonicum* nas condições de solo tropical, ao contrário do que tem sido reportado na literatura.

Desta forma, apesar de várias estirpes terem contribuído significativamente para a FBN em caupi, as estirpes BR3262 e 1B13 destacaram-se, pois, ocuparam mais de 60% dos nódulos no experimento de campo, além de recuperarem totalmente a atividade da nitrogenase, após um choque térmico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKKERMANS, W. M. Molecular ecology of microbes: A review of promisses, pitfalls and true progress. **Feems Microbiolology Reviews**, Amsterdam, v. 15, p. 185 - 194, 1994.
- AMARGER, N.; BOURS, M.; REVOY, F.; ALLARD, M. R.; LAGURRE, 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 *R. giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 47, p. 996-1006, 1997.
- ANKOMAH, A.B.; ZAPATA, F.; HARDSON, G. Yeld, nodulation, and N₂ fixation by cowpea cultivars at different phosphorus levels. **Biology and Fertily of Soils**, Berlin, v. 22, p. 10-15, 1996.
- ANUÁRIO ESTATÍSTICO DA AGRICULTURA BRASILEIRA. Agrianual 98. São Paulo, FNP Consultoria & Comércio, 1998. p.247-253.
- 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.P.P; VATT, E.E. O caupi no Brasil. Brasília, IITA/EMBRAPA, 1988, 722p.
- AVÍLIO ANTÔNIO FRANCO, comunicação pessoal.
- AWONAIKE, K.O.; KUMARASINGLE, K.S.; DANSO, S.K.A. Nitrogen fixation and yeld of cowpea (*Vigna unguiculata*) as influenced by cultivar and *Bradyrhizobium* strains. **Field Crop Research**, Amsterdan, v. 24, p. 163 – 171, 1990.
- 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.
- BEZERRA, A.A. de C. Variabilidade e diversidade genética em caupi (*Vigna unguiculata*, L.Walp.) precoce, de crescimento determinado e porte ereto e semi-ereto, Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 1997. 105p. Dissertação de Mestrado.

BODDEY, L.H.; HUNGRIA, M. Phenotypic grouping of brazilian *Bradyrhizobium* strains which nodulate soybean. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 25, p. 407-415, 1997.

BODDEY, L.H.; HUNGRIA, M.; SANTOS, M.A.; VARGAS, M.A.T. Capacidade de fixação de nitrogênio e ocupação nodular de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii*. In: XXVI Congresso Brasileiro de Ciências do solo, CD-ROOM, Rio de Janeiro, 1997.

BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; NEVES, M.C.P.; SUHET, A. R.; PERES, J.R. Quantification of the contribution of N₂ fixation to field-grown grain legume – a strategy for the practical application of the ¹⁵N isotope dilution technique. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 22, p. 649-655, 1990.

BONO, J.; GRESSEN, F.; NIEBEL, F.; RANJEVA, A.; BONO, J.; CULLIMORE, J. Perception of lipo-chitooligosaccharidic Nod factors in the legume-rhizobia symbiosis. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M., YATOS, M.G.; NEWTON, W., ed. **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**; proceedings of the 12th International Congress on Nitrogen Fixation, Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil, 12-17 setembro, 1999. Kluwer Academic publishers, 2000, p. 213-217.

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.

BURTON, J.C. *Rhizobium* species. In: In: PEPLER, H.J.; PERLMAN, D., ed. **Microbial Technology**, 2nd ed., Vol. 1 Microbial process. New York. Academic Press. Inc. 1979. p. 29-58.

CARPENTER, P.L. Immunology and serology. 3^a edição, Sanders College Publishing, Filadélfia, 1975, 346p.

CASSMAN, K.G.; MUNNS, D. N. BECK, D. P. Growth of rhizobium strains at low concentration of phosphate. **Soil Society of America Journal**, Madison, v. 45, p. 520-523, 1981.

CHATEL, D.L.; GREENWOOD, R.M.; PARKER, C.A. Saprophytic competence as an important character in selection of *Rhizobium* for inoculation. In: 9th Int. **Congress in Soil Science Society**. Adelaide, v. 2. p. 65-73, 1968.

- CHEN, W. X.; LI, G. S.; QI, Y.L. WANG, E. T.; YUAN, H. L.; LI, J.L. *Rhizobium huakii* sp nov. isolated from the nodules of *Astragalus sinicus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 41, p. 275-280, 1991.
- CHEN, W.E.; WANG, E.; WANG, S.; CHEN, X.; LI, Y. Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slow growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 43, p. 153-159, 1995.
- CHEN, W.X.; TAN, Z.Y.; GAO, J. LI, Y.; WANG, E.T. *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washigton, v. 47, p. 870-873, 1997.
- 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.
- CILIA, V. LAFAY, B.; CHRISTEN, R. Sequences heterogeneities among 16S ribossomal RNA sequences and their effect on phylogenetic analyses at species level. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 13, p. 451-461, 1996.
- CODON, C.; PHILIPS, J.; FU, Z.Y.; SQUIRES, C.; SQUIRES, C.L. Comparison of the expression of the seven ribosomal RNA operons in *Escherichia coli*. **EMBO Journal**, Oxford, v. 11, p. 4175-4185, 1992.
- COUTINHO, H.L.L.; KAY, H.E.; MANFIO, G.P.; NEVES, M.C.P.; RIBEIRO, J.R.A.; RUMJANEK, N.G.; BERINGER, J. Molecular evidence for shifts in poly saccaride composition associated with adaptation of soybean *Bradyrhizobium* strains to the Brazilian Cerrado soils. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 1, p. 401-408, 1999.
- DANSO, S.K.A.; OWIREDU, J.D.; Competitiveness of introduced and indegenous cowpea *Bradyrhizobium* strains for nodule formation on cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) in three soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 20, p. 305-310, 1988.
- de FARIA, S.M.; FRANCO, A.A.; JESUS, R.M.; MENANDRO, M. de S.; BAITELLO, J.B.; MUCCI, E. S.F.; DÖBEREINER, J.; SPRENT, J.I. New nodulating legume trees from Suth-East Brazil. **New Phytologist**, Oxford, v. 98, p. 317-328, 1984.

- de LAJUDIE, P.; LAURENT-FULELE, E.; WILLEMS, A.; TORK, U.; COOPMAN, R.; COLLINS, M.D.; KERSTERS, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov. nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. **Internacional Journal of Systematic Bacteriology**, v, 48, p. 1270–1290, 1998a.
- de LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; MASTROJUAN, 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. **Internacional Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, p. 715-733, 1994.
- de LAJUDIE, WILLEMS, A., NICK, G.; MOREIRA, F.; MOLOUBA, F.; HOSTE, B.; TORCK, U.; NEYRA, M.; COLLINS, M. D.; LINDSTRÖM, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 48, p. 369-382, 1998b.
- de OLIVEIRA, V.M. Diversidade genética de rizóbios em amostras ambientais através do uso de sondas moleculares e *primers* específicos. Campinas, Universidade Estadual de Campinas, 1999, 170p. Tese de doutorado.
- DE-POLLI, H.; FRANCO, A.A. Inoculação de leguminosas. Rio de Janeiro, EMBRAPA-UAPNBS, 1985, circular técnica.
- DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contribution. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, p.771-774, 1997.
- DREYFUS, B.L.; GARCIA, J.L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. **Internacional Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 38, p. 89-98, 1988.
- EHLERS, J.D.; FOSTER, K.W. Introgression of agronomic characters from exotic cowpea germplasm into blackeye bean. **Field Crop Research**, Amsterdam, v. 35, p. 43–50, 1992.

EHLERS, J.D.; HALL, A.E. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Field Crop Research**, Amsterdam, v. 53, p. 1870–204, 1997.

FAHRAEUS, G. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. **Journal of General Microbiology**, London, v. 16, 347-381, 1957.

FERNANDEZ, G. C.; CREIGHTON, J. M. Interaction between rhizobia inoculation and fertilizer nitrogen in five cowpea cultivars. **HortScience**, Alexandria, v. 21, p. 1345–1348, 1986.

FERREIRA, E.P.B.; ZILLI, J.E.; RUMJANEK, N.G.; NEVES, MC.P. Diversidade de rizóbio nativo em área da Mata Atlântica sob diferentes sistemas. In: XX Congresso Brasileiro de Microbiologia, p. 303, Salvador, 1999.

FERREIRA, M.G.; HUNGRIA, M. Soybean bradyrhizobia strains isolates from Brazilian soil under native vegetation. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M., YATOS, M.G.; NEWTON, W., ed. **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**; proceedings of the 12th International Congress on Nitrogen Fixation, Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil, 12-17 setembro, 1999. Kluwer Academic publishers, 2000, p. 192.

FOX, G.E.; WISOTZKEY, J.D.; JURTSCHUK J.R.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.

FRED, E.B.; WAKSMAN, S.A. Yeast Extract – Mannitol agar for laboratory manual of general microbiology. New York, McGraw Hill, 1928, 145p.

FREIRE FILHO, F.R.; RIBEIRO, V.Q.; BARRETO, P.D.; SANTOS, C.A. Melhoramento genético de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) na região do Nordeste. Embrapa Semi-Árido. Workshop, 1998.

GARCÍA-de los SANTOS, A.; BROM, S.; ROMERO, D. *Rhizobium* plasmids in bacteria-legume interactions. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 12, p. 119-125, 1996.

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.
- HAM, G.E. Inoculation of legumes with *Rhizobium* in competition with naturalized strains. P. 131-138. In W. E. Newton and W. H. Orme-Johnson, ed., **Nitrogen fixation**. V. II. University Park Press, Baltimore, Madisson, 1980.
- HARRIS, R.F. Effect of water potencial on microbial growth and activity. In: PARR, J.F.; GARDNER, W.R.; ELLIOT, L.F., ed. **Water Potencial Relations in Soil Microbiology**. Madison, Soil Science Society of America, p. 23-95, 1981.
- HAUKKA, K. Genetic diversity and phylogeny of rhizobia isolated from tropical tree legumes. Helsinki: University of Helsinki, 1997. 94p. Tese de doutorado.
- HIRSCH, P.R. Population dynamics of indigenous and genetically modified rhizobia in the field. **The New Phytologist**, London, v. 133, p. 159-171, 1996.
- HIRSCH, P.R.; JONES, M.J.; MCGRATH, S.P.; GILLER, K.E. Heavy metals from past aplication of sewage decrease the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* population. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 25, p. 1485-1490, 1993.
- HIRSCH, A. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. **Current opinion in Plant Biology**, Amsterdan, v. 2, p. 320-326, 1999.
- JARVIS, B.D.W. DOWNER, J.L.; YOUNG, J.P.W. Phylogeny of fast-growing soybean-nodulating rhizobia supports synonymy of *Shinorhizobium* & *Bradyrhizobium* and assignmentt *Rhizobium fredii*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 42, p. 93-96, 1992.
- JARVIS, B.D.W.; PANKUHURST, C.; PATEL, J.J. *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 32, p. 378-380, 1982.
- JARVIS, B.D.W.; van BERKUM, P. CHEN, W.X.; NOUR, S.M. FERNANDEZ, M.P.; CLEYET-MAREL, J.C.; GILLIS, M. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum* and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 47, p. 895-898, 1997.

- JORDAN, D.C. Family III Rhizobiaceae. CONN. 1983. In: KRIEG, N.R. ed., **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore, Williams and Wilkins, 1984. P. 234-256.
- JORDAN, D.C. Transfer of *Rhizobium japonicum*, Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminosus plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 32, p. 136-139, 1982.
- KISHINEVSKY, B.; LOBEL, R.; FRIENDMAN, Y. Symbiotic performance and efficiency evaluation of different peanut *Rhizobium* strains under field conditions. **Oleagineux**, Paris, v. 39, p. 417-421, 1984.
- KUYKENDALL, L.D. Influence of *Glycine max* nodulation on the persistence in soil of genetically marked *Bradyrhizobium japonicum* strain. **Plant and Soil**, Dordrecht v. 161, p. 275-277, 1989.
- KUYKENDALL, L.D., SAXENA, B., DEVINE, T.E.; UDELL, S.E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordam 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. **Canadian Journal Microbiology**, Montreal, v.38, p.501-505,1992.
- KUYKENDALL, L.D.; SAXENA, B.; ROY, M.A.; O'NEILL, J.J.; DEVINE, T.E. Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *B. japonicum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 38, p. 358-361, 1988.
- LABES, G.; ULRICH, A.; LENTZCH, P. Influence of bovine slurry deposition on the structure of nodulating *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* soil population in a nature habitat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 1717-1722, 1996.
- 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. 62, p. 56-63, 1994.
- 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, 1993.

- 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 length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.2029–2036, 1996.
- LIAO, C.F.H. Devarda's allow methods for total nitrogen determination. **Soil Science Society of American Journal**, Madison, v. 45, p. 852-855, 1981.
- LIE, T.A.; GOKTAN, D.; ENGIN, M.; PIJNENBORG, J.; ANLARSAL, E. Co-evolution of the legume-*Rhizobium* association. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 100, p. 171-181, 1987.
- LINDSTRÖM, K. *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 39, p. 365-367, 1989.
- LOPES, L.H. de O.; FARIAS, C.M.B. Recomendações técnicas para o cultivo de feijão-de-corda. Petrolina, Embrapa-CPATSA, 1995, 13p.
- LOWENDORF, H.S. Factors affecting survival of *Rhizobium* in soil. **Advances in Microbial Ecology**, New York, v. 4, p. 87-123, 1980.
- MAGUE, T.H.; BURRIS, R.H. Reduction of acetylene and nitrogen by fiel-grown soybeans. **The New Phytologist**, London, v. 71, p. 275-286, 1972.
- MAGURRAN, A.E. Ecological diversity and its measurement. New Jersey, Princeton University Press, 1988, 179p.
- MARTINAZZO, A.F. Potencial de Fixação em N₂ em (*Vigna unguiculata* L. Walp) em diferentes condições ambientais. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural Rio de Janeiro, 1989, 154p. Dissertação de mestrado.
- 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. Características ecológicas e fisiológicas de rizóbios de *caupi* (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) isolados a partir de solos da região Nordeste do Brasil. Seropédica: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1996, 213p. Tese de mestrado.
- MARTINS, L.M.V.; NEVES, M.C.P.,; RUMJANEK, N.G. Characteristics of cowpea rhizobia isolates from the northeast region of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 5/6 p. 1005-1010, 1997.
- MERCANTE, F. Diversidade genética de rizóbio que nodula o feijoeiro e troca de sinais moleculares na simbiose com plantas hospedeira. Seropédica: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1997, 195p. Tese de doutorado.
- MIETHLING, R.; WIELAND, G.; BACKHAUS, H.; TEBBE, C.C. Variation of microbial rizosphere communities in response to crop species, soil origin, and inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33. **Microbial Ecology**, New York, v. 40, p. 45-56, 2000.
- MODY, B.; MODY, R; MODI, V. Peanut agglutinin-induced structural changes in cowpea rhizobia as revealed by freeze-etching. **Current Microbiology**, New York, v. 21, p. 243-247, 1990.
- MPEPEREKI, S. WOLLUM, A.G.; MAKONESE, F. Diversity in symbiotic specificity of cowpea rhizobia indigenous to Zimbabwean soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 186, p. 167-171, 1998.
- MUNNS, D.N.; KEYSER, H.H. Response of *Rhizobium* strains to acid aluminium stress. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 13, p. 115-118, 1981.
- NEVES, M.C.P.; COUTINHO, H.L.C.; RUMJANEK, N.G. Adaptation of soybean bradyrhizobia to the brazilian edaphic savannahs. In: COLWELL, R.R.; SIMIDU, R.R.; OHWADA, K., ed. **Microbial Diversity in Time and Space**. New York, Plenum Press, 1996, p. 109-114.
- NEVES, M.C.P.; Energy cost of biological nitrogen fixation, biological nitrogen fixation for tropical agriculture. Cali, Centro Internacional de Agricultura tropical, 1982, p. 77-92.
- NEVES, M.C.P.; RAMOS, M.L.G.; MARTINAZZO, A.F.; BOTELHO, G.R.; DÖBEREINER, J. Adaptation of more efficient soybean and cowpea rhizobia to replace established population. In: MULONGOY, K.; GUEYNE, M.; SPENCER, D.S.C., ed.

Biological Nitrogen Fixation and Sustainability of Tropical Agriculture, Ibadan, Trinity Press, 1992, p. 219-233.

NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Diversity and adaptability of soybean and cowpea rhizobia in tropical soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 889-895, 1997.

NEVES, M.C.P.; URQUIAGA-CABALLERO, S.S.; PERES, J.R.; SUHET, A.R. E BODDEY, R.H. Aplicação da técnica da diluição isotópica de ^{15}N na quantificação da fixação biológica de N_2 em caupi, soja e amendoim. In: Congresso Brasileiro de Ciências do solo, 21, Campinas, 1987, p. 39.

NICK, G.; de LAJUDIE, P.; EARDLY, B. D.; SUOMALAINEN, S.; PAULIN, L.; ZHANG, X.; GILLIS, M.; LINDSTRÖM, K. *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostense* sp. nov., isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 49, p. 1359-1368, 1999.

NISHI, C.Y.M.; BODDEY, L.H.; VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Morphological, physiological and genetic characterization of two new *Bradyrhizobium* strains recently recommended as Brazilian commercial inoculants for soybean. **Symbiosis**, Philadelphia, v. 20, p. 177-162, 1996.

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.

NOUR, S.M.; CLEYT-MAREL, J.C.; NORMAND, P.; FERNANDEZ, M.P. Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 45, p. 640-648, 1995.

ODUM, E. P. Ecologia (tradução). Editora Guanabara, RJ. 1988, 434p.

OKELEYE, K.A.; OKELANA, M.A.O. Effect of phosphorus fertilizer on nodulation, growth and yield of cowpea (*Vigna unguiculata*) varieties. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, New Delhi, v. 67, p. 10-12, 1997.

- OLIVEIRA, L.A. DE; VIDOR, C. Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* em soja. II. Capacidade competitiva por sítios de nódulos. **Revista Brasileira de Ciências do solo**, Campinas, v. 8, p. 43-47, 1984.
- 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.
- OSONUBI, O.; MULONGOY, K.; A.W.O, O.O.ATAYESE, M.O.; OKALI, D.U.U. Effects of ectomycorrhizal and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on drought tolerance of four leguminous woody seedlings. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 135, p. 131-143, 1991.
- OTHMAN, W.M.W; LIE. T.A; -`t-MANNETJE, L. WASSINK, G.Y.; WAN-OTHMAN, W.M; MANNETJE-L- -`t-. Low level phosphorus suply affecting nodulation, N₂ fixation and growth cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). **Plant and Soil**, Dordrecht, v.135, p. 67-74, 1991.
- PADMANABHAN, S.; HIRTZ, R.D.; BROUGHTON, W.J. Rhizobia in tropical legumes: cultural characteristics of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* sp. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 22, p. 23-28, 1990.
- RALPH, D.; MCCLELLAND, M.; WELSH, J.; BARANTON, G.; PEROLAT, P. *Leptospira* species categorized by arbitrarily primed polymerase chain reaction (PCR) and by mapped restriction polymorphism in PCR-amplified rRNA genes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 175, p. 973-981, 1994.
- REIS, V.M.; CRUZ, G.B.; FERREIRA, A., FERREIRA, M.; FERREIRA, A.C.; REIS, F.B.; RIBEIRO, J.R.A.; SALLES, J.F.; WEBWER, O.B. Produção e caracterização de soros policlonais para a detecção de bactérias diazotróficas. Seropédica, Embrapa CNPAB, 1997, 9p., documentos n^o 30.
- RIBEIRO, J.R.A. Aplicação da técnica de *ELISA* no estudo ecológico de *Rhizobium* sp. isolados de nódulos de caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) originários da região nordeste brasileira. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1999, 120p. Dissertação de mestrado.
- ROHLF, F.J. NTSYS-pc – Numerical taxonomy and multivariate analysis sistem. New York, Staet Unversity of New York, 1994.

- ROMANO VALICHESKI, dados não publicados
- ROME, S.; FERNANDEZ, M.P.; BRUNEL, B.; NORMAND, P.; CLEYTEL-MAREL, J.C. *Shinorhizobium medicae* sp. nov. isolated from annual *Medicago* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 46, p. 972-980, 1996.
- ROUGHLEY, R.J.; BLOWES, W.M.; HERRIDGE, D.G. Nodulation of *Trifolium subterraneum* by introduced rhizobia in competition with naturalized strains. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 8, p. 403-407, 1976.
- RUMJANEK, N.G.; DOBERT, R.C.; van BERKUM, P; TRIPLETT, E.W. Common soybean inoculant strain in Brazil are members of *Bradyrhizobium elkanii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 4371-4373, 1993.
- SAITO, S.M.T. Avaliação em campo da capacidade de fixação simbiótica de estirpes de *Rhizobium phaseoli*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, p. 999-1006, 1982.
- SANGINGA, N.; MULONGOY. K.; SWIFT, M.J. Contribution of soil organisms to the sustainability and productive systems in the tropics. **Agriculture, Ecosystem and Environment**, Amsterdam, v. 41, p. 135-152, 1992.
- SANGINGA, N.; VANLAUWE, S.; DANSO, S.K.A. Management of biological N₂ fixation in alley cropping systems: estimation and contribution to N balance. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 174, p. 119-141, 1995.
- SANJUAN, J.; HERRERA-CERVERA, J.A.; SANJUAN-PINILLA, J.M.; MUNÓZ, S.; NOGALES, J. OLIVARES, J. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M., YATOS, M.G.; NEWTON, W., ed. **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**; proceedings of the 12th International Congress on Nitrogen Fixation, Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil, 12-17 setembro, 1999. Kluwer Academic publishers, 2000, p. 593-594.
- SCHLAMMAN, H.R.M.; OKKER, R.J.H.; LUGTENBERG, B.J.J. Regulation of nodulation gene expression by nodD in rhizobia. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 174, p. 5177– 5182, 1992.
- SCHOLLA, M.H.; MOOREFIELD, J.A.; ELKAN, G.H. Deoxyribonucleic acid homology between fast-growing soybean-nodulating bacteria and other rhizobia. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 34, p. 283-286, 1984.

- SCOTTI, M.R.M.M.L.; CARVALHO-SILVA, D.R.; VARGAS, M.A.T.; NEVES, M.C.; DÖBEREINER, J. Changes in electrophoretic profile of lipopolysaccharides from competitive strains of *Bradyrhizobium* spp. induced by soybean roots. **Journal of Applied Microbiology**, Cambridge, v. 83, p. 552-560, 1997.
- SCOTTI, M.R.M.M.L.; NEVES, M.C.P.; PAIVA, E.; DÖBEREINER, J. Effect of soybean roots on strains competitiveness and protein profile of *Bradyrhizobium japonicum* adapted to Cerrado soils. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, Rio de Janeiro, v. 65, p. 427-438, 1993.
- 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.
- SILVA, F.V. Diversidade de rizóbio em áreas sob diferentes coberturas vegetais do programa *SHIFT* localizado na região amazônica. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1999, 85p. Tese de mestrado.
- SINGLETON, P.W.; TAVARES, J.W. Inoculation response of legumes in relation to the number and effectiveness of indigenous *Rhizobium* population. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 51, p. 1013-1018, 1986.
- SINGLETON, P.W.; BOHLOOL, B.B.; NAKAO, P.L. Legume response to rhizobial inoculation in the tropics: myths and realities. In: Myphis and Science of Soils in the tropics. Mandison, **Soil Science Society of American**, p. 135-155. (SSSA Special Publication, 29), 1992.
- SOUZA, V.; EGUIARTE, L.; AVILA, G., CAPPELLO, R.; GALLARDO, C.; MONTROYA, J.; PIÑERO, D. Genetic structure of *Rhizobium etli* biovar *phaseoli* associated with wild and cultured bean plants (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*) in Morales, México. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 1260-1268, 1994 .
- SPRENT, J.I. Evolution and diversity in the legume-rhizobium symbiosis: chaos theory?. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 161, p. 1-10, 1994.
- SPRENT, J.I. Evolution, structure and function of nitrogen-fixing root nodules: confessions of ignorance. In: GRESSHOFF, P.M., ROTH, L.E., STACEY, G.; NEWTON, W.E., ed.

Nitrogen fixation: achievements and objectives. Chapman and Hall, p. 45-54 New York, 1990.

STACEY, G. Nod factor reception. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M., YATOS, M.G.; NEWTON, W., ed. **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**; proceedings of the 12th International Congress on Nitrogen Fixation, Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil, 12-17 setembro, 1999. Kluwer Academic publishers, 2000, p. 211-212.

STACKEBRANDT, E.; LIESACK, W.; WITT, D. Ribosomal RNA and rRNA sequence analysis. **Gene**. Amsterdam, v. 115, p. 255-260, 1992.

STAMFORD, N.P.; CHAMBER, P.M.; CAMACHO, M.M. Symbiotic effectiveness of several tropical *Bradyrhizobium* strains on cowpea under a long-term exposure to nitrate: relationships between nitrogen and nitrate reduction activities. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 147, p. 378-382, 1995.

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N.G. Aplicação e evolução dos métodos moleculares para o estudo da biodiversidade de rizóbio. Seropédica, Embrapa Agrobiologia, nov. 1999. 70p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 93).

SWARAJ, K.; BISHNOI, N. R. Effects of salt stress on nodulation and nitrogen fixation in legumes. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 37, p. 843-848, 1999.

TEANEY, G.B.; FUHRMANN, J.J. Soybean response to nodulation by bradyrhizobia differing in rhizobitoxine phenotype. **Plant and soil**, Dordrecht, v. 145, p. 275-285, 1992.

THIES, J.E.; BOHLOOL, B.; SINGLETON, P.W. Subgroups of the cowpea miscellany: symbiotic specificity within *Bradyrhizobium* spp. for *Vigna unguiculata*, *Phaseolus lunatus*, *Arachis hypogaeae*, *Macroptilium atropurpureum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 1540-1545, 1991a.

THIES, J.E.; SINGLETON, P.W.; BOHLOOL, B. Influence of the size of indigenous rhizobial population on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-crop legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 19-28, 1991b.

THIOLOUSE, J.; CHESSEL, D.; DOLÉDEC, S.; OLIVER, J.M. ADE-4 multivariate analysis and graphical display software. **Statistics and Computing**, Lyon, v. 7, p. 75-83, 1997.

TIGHE, S.W.; de LAJUDIE, P.; DIPIETRO, K.; LINDSTRÖM, K.; NICK, G.; JARVIS, B.D.W. Analysis of cellular fatty acids and phenotypic relationships of *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* species using Sherlock Microbial Identification System. **International Journal of Systematic and Evolutionary Micorbiology**, Washington, v. 50, p. 787-801, 2000.

TORO, N. Nodulation competitiveness in *Rhizobium*-legume symbiosis. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 12, p. 157-162, 1996.

UGOZARA, S. G.; OFUYA, Z. M. Processing and utilization of cowpeas in developing countries: a review. **Journal of Food and Preservation**, Trumbull, v. 16, p. 105 – 147, 1992.

van BERKUM, P.; BEYENE, D.; BAO, G.; CAMPEBEL, T.A.; EARDLY, B.D. *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of the three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 48, p. 13-22, 1998.

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.; FUHRMANN, J.J.; EARDLY, B. Phylogeny of rhizobia. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M., YATOS, M.G.; NEWTON, W., ed. **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**; proceedings of the 12th International Congress on Nitrogen Fixation, Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil, 12-17 setembro, 1999. Kluwer Academic publishers, 2000, p. 165.

VARGAS, M.; HUNGRIA, M. Legume inoculation in cerrado soils. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M., YATOS, M.G.; NEWTON, W., ed. **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**; proceedings of the 12th International Congress on Nitrogen Fixation, Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil, 12-17 setembro, 1999. Kluwer Academic publishers, 2000, p. 187 - 188.

VARGAS, M.A.T.; MENDES, I.C.; SUHET, A.R.; PERES, J.R.R. Inoculation of soybean in Cerrado soils with established population of *Bradyrhizobium japonicum*. **Revista Brasileira de microbiologia**. São Pulo, v. 25, p. 245-250, 1994a.

- VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R.; MENDES, I.C.; PERES, J.R.R. SOJA. **Fixação Biológica de Nitrogênio em Solos de Cerrado**. Brasília, EMBRAPA – CPAC/SPI, 1994b, 25p.
- VARGAS, M.T.A.; HUNGRIA, M. Legume inoculation in cerrado soils. PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M., YATOS, M.G.; NEWTON, W., ed. **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**; proceedings of the 12th International Congress on Nitrogen Fixation, Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil, 12-17 setembro, 1999. Kluwer Academic publishers, 2000, p. 587-588.
- VARGAS, M.T.A.; PERES, J.R.R.; SUHET, A. R. Fixação biológica de nitrogênio atmosférico pela soja em solos de Cerrados. **Informe Agropecuário**, Brasília, v. 17, p. 20-23, 1982
- VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford, Blackwell Scientific, 1970, 164p.
- VLASSAK, K.; VANDERLEYDEN, J.; FRANCO, A. A. Competition and persistence of *Rhizobium tropici* and *Rhizobium etli* in tropical soil during successive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultures. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 21, p. 61 - 68, 1996.
- WANG, E.T.; van BERKUM, P.; BEYENE, D.; SUI, X.-H.; DORADO, O.; CHEN, W.X.; MAERTÍNEZ-ROMERO, E. *Rhizobium huatlense* sp. nov. a symbiont of *Sesbania hebecae* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 48, p. 687-699, 1998.
- WANG, E.T.; van BERKUM, P.; SUI, X. H.; BEYENE, D.; CHEN, W. X.; MARTINEZ-ROMERO, E. Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 49, p. 51 - 65, 1999.
- WANI, S.P.; RUPELA, O.P.; LEE, K.K. Sustainable agriculture in the semi-arid tropics through biological nitrogen in grain legumes. **Plant and Soil**, Dordrecht v. 174, p. 29-49, 1995.

WEAVER, R.W.; FREDERICK, L.R.; DUMENIL, L.C. Effect of soybean cropping and soil properties on number of *Rhizobium japonicum* in Iowa soils. **Soil Science**, Baltimore, v. 114, p. 137-141.

WOESE, C.R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 51, p. 221-271, 1987.

WOLFF, A.B.; STREIT, W.; KIPE-NOLT, J.A.; Vargas, H.; WERNER, D. Competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strains in relation to environmental stress and plant defense mechanisms. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 12, p. 170 - 176, 1991.

WOOMER, P.; SINGLETON, P.; AND BOHLOOL, B.B. Ecological indicators of native rhizobia in tropical soils. **Applied and Environment Microbiology**, Washington, v. 54, p. 1112-1116, 1988.

WOOMER, P.L. Most probable number counts. In: WEAVER, P.W.; ANGLE, J.S.; BOTTOMELY, P.S., ed. **Methods of soil analysis**. Soil Science Society of American Book, Madison, Wisconsin, USA, 1994, p. 59-79.

XAVIER, G. R. Estudo da ocupação nodular de genótipos de caupi (*Vigna unguiculata*) agrupados pela técnica de RAPD, Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural Rio de Janeiro, 2000, 113p. Dissertação de mestrado.

XAVIER, G.R.; MARTINS, L.M.M.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in cowpea rhizobia population. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 27, p. 386-392, 1997.

XU, L.M.; GE, C., CUI, Z., LI, J.; FAN, H. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 45, p. 706-711, 1995.

YOUNG, J. M. Correction to the authority of *Rhizobium leguminosarum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 49, p. 1943, 1999.

YOUNG, J.P.W. All those new names: an overview of the molecular phylogeny of plant-associated bacteria. In: DANIELS, M.J.; OSBOURN, A.E., ed. **Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions**. Dordrecht, Kluwer, 1994, p. 73-80.

YOUNG, J.P.W.; DOWNER, H.L.; EARDLY, B.D. Phylogeny of the phototropic rhizobium strain BTAIL by polymerase chain reaction sequencing of a 16S rDNA gene segment. **Journal of Bactriology**, Washington v. 173, p. 2271 – 2277, 1991.

YOUNG, J.P.W.; HAUKKA, K. Diversity and phylogeny of rhizobia. **The New Phytologist**, London, v. 133, p. 87-94, 1996.

YOUNG, J.P.W. Phylogeny and taxonomy of rhizobia. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 186, p. 45 – 52, 1996.

YOURSELF, A.N.; AL-NASSIRI, S.K.; AZAWI, A.L.; ABDUL-HUSSAIN, N. Abundance of peanut rhizobia as affected by environment conditions in Iraq. **Soil Biology and Bochementry**, Oxford, v.19, p. 319-396, 1987.

ZABLOTOWICH, R.M.; FOCHT, D.D. Physiological characteristics of cowpea rhizobia: evaluation of symbiotic efficiency in *Vigna unguiculata*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 41, p. 679-685, 1981 .

ZILLI, J.E.; CAMARA, A.F.S.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Diversidade de rizóbio nativo em área da Mata Atlântica sob diferentes sistemas. In: XX Congresso Brasileiro de Microbiologia, p. 302, Salvador, 1999.

ZILLI, J.E.; FERREIRA, E.P.B.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Efficiency of fast-growing rhizobia capable of nodulating cowpea. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, Rio de Janeiro, v. 71, p. 553-560, 1999.

ZILLI, J.E.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Biodiversidade de rizóbio em área de um sistema integrado de produção agroecológica em Seropédica RJ. In: XXVI Congresso Brasileiro de Ciências do solo, CD-ROOM, Rio de Janeiro, 1997.

Apêndice 1

Caracterização Morfológica de Isolados de Rizóbio obtidos do Cultivo de Caupi com Solo de Cerrado

Gr. Morfológico*	Isolado	Tempo de crescimento	pH do meio	Tamanho da colônia (mm)	Forma da colônia	Elevação da colônia	Borda	Transparência	Aparência da colônia	Cor da colônia	Aparência do muco	Elasticidade do muco	Tipo de muco
1	5C4	2	Ácido	2 a 3	Irregular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Homogêneo	C/elast.	Viscosa
2	2A8	2	Ácido	2 a 3	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Homogêneo	C/elast.	Viscosa
3	2C1	2	Ácido	1 a 2	Irregular	Plana	Inteira	Sim	Homogêneo	Branca	Homogêneo	C/elast.	Viscosa
4	2C10	2	Ácido	2 a 3	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogêneo	Branca	Homogêneo	C/elast.	Viscosa
4	2C11	2	Ácido	2 a 3	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogêneo	Branca	Homogêneo	C/elast.	Viscosa
4	2C9	2	Ácido	2 a 3	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogêneo	Branca	Homogêneo	C/elast.	Viscosa
5	2A1	2	Ácido	2 a 3	Irregular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Homogêneo	C/elast.	Viscosa
5	2B10	2	Ácido	2 a 3	Irregular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Homogêneo	C/elast.	Viscosa
5	2B3	2	Ácido	2 a 3	Irregular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Homogêneo	C/elast.	Viscosa
6	1B14	3	Ácido	2 a 3	Irregular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
7	5C3	2	Ácido	2 a 3	Irregular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Heterogêneo	C/elast.	Viscosa
7	2B6	2	Ácido	2 a 3	Irregular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Heterogêneo	C/elast.	Viscosa
7	5C1	2	Ácido	2 a 3	Irregular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Heterogêneo	C/elast.	Viscosa
8	1B4	2	Ácido	2 a 3	Circular	Plana	Inteira	Sim	Heterogêneo	Branca	Heterogêneo	C/elast.	Viscosa
8	1B5	2	Ácido	2 a 3	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Heterogêneo	C/elast.	Viscosa
9	2B5	2	Alcalino	2 a 3	Irregular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Heterogêneo	S/elast.	Viscosa
9	2B7	2	Alcalino	2 a 3	Irregular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Heterogêneo	S/elast.	Viscosa
9	2B8	2	Alcalino	2 a 3	Irregular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Heterogêneo	S/elast.	Viscosa
10	2A10	2	Ácido	2 a 3	Irregular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Heterogêneo	S/elast.	Viscosa
10	3A2	2	Ácido	2 a 3	Irregular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Heterogêneo	S/elast.	Viscosa
11	2A11	2	Ácido	2 a 3	Irregular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Amarela	Heterogêneo	S/elast.	Viscosa
11	3B2	2	Ácido	2 a 3	Irregular	Plana	Inteira	Sim	Homogêneo	Amarela	Heterogêneo	S/elast.	Viscosa
12	1C3	2	Ácido	2 a 3	Circular	Plana	Inteira	Sim	Heterogêneo	Branca	Heterogêneo	S/elast.	Viscosa
13	7A1	2	Ácido	2 a 3	Irregular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Heterogêneo	S/elast.	Viscosa
14	2C3	6	Alcalino	2 a 3	Irregular	Plana	Inteira	Sim	Homogêneo	Branca	Homogêneo	C/elast.	Viscosa
15	2A2	6	Alcalino	2 a 3	Irregular	Plana	Inteira	Sim	Heterogênea	Amarela	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
16	2C2	6	Alcalino	2 a 3	Irregular	Plana	Inteira	Sim	Homogêneo	Branca	Heterogêneo	C/elast.	Viscosa
17	2B9	6	Alcalino	1 a 2	Irregular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Heterogêneo	C/elast.	Viscosa
18	3C1	6	Alcalino	Puntiforme	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Homogêneo	C/elast.	Viscosa
19	2A6	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Heterogêneo	C/elast.	Viscosa

19	2A7	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Heterogêneo	C/elast.	Viscosa
20	2A9	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Homogêneo	C/elast.	Viscosa
21	2B4	6	Alcalino	Puntiforme	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Homogêneo	S/elast.	Butírica
21	5C7	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Homogêneo	S/elast.	Butírica
21	5C8	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Homogêneo	S/elast.	Butírica
22	1B13	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Não	Homogênea	Branca	Homogêneo	S/elast.	Butírica
22	4B10	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Não	Homogênea	Branca	Homogêneo	S/elast.	Butírica
22	4B11	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Não	Homogênea	Branca	Homogêneo	S/elast.	Butírica
22	4B12	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Não	Homogênea	Branca	Homogêneo	S/elast.	Butírica
22	4B13	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Não	Homogênea	Branca	Homogêneo	S/elast.	Butírica
22	4B8	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Não	Homogênea	Branca	Homogêneo	S/elast.	Butírica
22	4B9	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Não	Homogênea	Branca	Homogêneo	S/elast.	Butírica
23	5B2	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogêneo	Branca	Heterogêneo	S/elast.	Butírica
23	5C9	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Heterogêneo	S/elast.	Butírica
24	5B4	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Não	Homogêneo	Branca	Heterogêneo	S/elast.	Butírica
25	3B1	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogêneo	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
25	8B1	6	alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogêneo	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
25	2A3	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
25	2B11	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
25	2C8	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogêneo	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
25	4A6	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
25	5A2	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
25	5C2	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
25	6C3	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
25	8A5	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
25	8C7	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogêneo	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
25	5B1	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogêneo	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
25	2C6	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogêneo	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
25	3B11	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogêneo	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
25	3B4	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogêneo	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
25	3B5	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogêneo	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
25	3B7	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogêneo	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
25	5B8	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogêneo	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
25	5C5	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
25	6C4	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa

25	3C5	6	Alcalino	Puntiforme	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
25	3C7	6	Alcalino	Puntiforme	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
25	3C8	6	Alcalino	Puntiforme	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
25	6C7	6	Alcalino	Puntiforme	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
25	6C8	6	Alcalino	Puntiforme	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
25	6C9	6	Alcalino	Puntiforme	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
25	8C11	6	Alcalino	Puntiforme	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogêneo	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
25	8C12	6	Alcalino	Puntiforme	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogêneo	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
26	4A8	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Elevada	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
26	4A9	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Elevada	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
26	2C5	6	Alcalino	Puntiforme	Circular	Elevada	Inteira	Sim	Homogêneo	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
27	4B2	6	Alcalino	1 a 2	Irregular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
27	2B2	6	Alcalino	1 a 2	Irregular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
27	6A4	6	Alcalino	1 a 2	Irregular	Plana	Inteira	Sim	homogêneo	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
27	6A2	6	Alcalino	1 a 2	Irregular	Plana	Inteira	Sim	homogêneo	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
27	3A9	6	Alcalino	Puntiforme	Irregular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
28	2C7	6	Ácido	1 a 2	Irregular	Plana	Inteira	Sim	Homogêneo	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
29	2A4	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Heterogêneo	S/elast.	Viscosa
29	3B3	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogêneo	Branca	Heterogêneo	S/elast.	Viscosa
29	2A13	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Heterogêneo	S/elast.	Viscosa
29	2A5	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Heterogêneo	S/elast.	Viscosa
29	3A3	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Heterogêneo	S/elast.	Viscosa
29	3B6	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogêneo	Branca	Heterogêneo	S/elast.	Viscosa
29	5B10	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogêneo	Branca	Heterogêneo	S/elast.	Viscosa
29	8A3	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Heterogêneo	S/elast.	Viscosa
29	8A4	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Heterogêneo	S/elast.	Viscosa
29	3A6	6	Alcalino	Puntiforme	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Heterogêneo	S/elast.	Viscosa
29	8A1	6	Alcalino	Puntiforme	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Heterogêneo	S/elast.	Viscosa
29	2B1	6	Alcalino	Puntiforme	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Heterogêneo	S/elast.	Viscosa
29	3A1	6	Alcalino	Puntiforme	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Heterogêneo	S/elast.	Viscosa
29	3A4	6	Alcalino	Puntiforme	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Heterogêneo	S/elast.	Viscosa
30	2B12	6	Alcalino	1 a 2	Irregular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Heterogêneo	S/elast.	Viscosa
30	3A5	6	Alcalino	1 a 2	Irregular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Heterogêneo	S/elast.	Viscosa
30	6A3	6	Alcalino	1 a 2	Irregular	Plana	Inteira	Sim	homogêneo	Branca	Heterogêneo	S/elast.	Viscosa
31	4A5	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Plana	Inteira	Sim	Homogênea	Branca	Heterogêneo	S/elast.	Butírica

36	7B2	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Elevada	Inteira	Não	Homogênea	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
36	7C7	6	Alcalino	1 a 2	Circular	Elevada	Inteira	Não	Homogêneo	Branca	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
37	1C5	4	Alcalino	2 a 3	Interrompida	Elevada	Inteira	Não	Homogêneo	Branca	Heterogêneo	S/elast.	Butírica
38	8A6	6	Ácido	Puntiforme	Circular	Elevada	Inteira	Não	Homogênea	Amarela	Homogêneo	S/elast.	Viscosa
39	4C2	2	Ácido	2 a 3	Circular	Elevada	Inteira	Não	Homogêneo	Branca	Homogêneo	S/elast.	Butírica

* Grupo obtido pelo método *UPGMA* e coeficiente *SM*.

Obs. – O coeficiente cofenético teve valor igual a 0,96.

Apêndice 2

Matriz de Dados das Características Morfológicas dos Isolados de Rizóbios (Ordenados em Duas Classes*) Utilizada para o Cálculo da Similaridade dos Isolados, através do Coeficiente SM e Agrupamento dos mesmos por UPGMA.

Isolados	Tempo de crescimento	Tamanho da colônia (mm)	Forma da colônia	Aparência da colônia	Cor da colônia	pH do meio	Transparência	Elevação da colônia	Aparência do muco	Tipo de muco (pegajosidade)	Elasticidade do muco	Quantidade de muco
1A1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
1A10	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
1A11	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
1A2	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
1A3	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
1A4	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
1A5	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
1A6	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
1A7	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
1A8	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
1A9	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
1B1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
1B10	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
1B11	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
1B12	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
1B13	1	1	2	1	1	1	2	2	1	1	2	1
1B14	2	2	1	1	1	2	1	2	1	2	2	2
1B2	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
1B4	2	2	2	1	1	2	1	2	2	2	1	2
1B5	2	2	2	1	1	2	1	2	2	2	1	2
1B7	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
1B8	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
1B9	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
1C1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
1C10	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
1C11	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
1C12	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
1C13	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
1C14	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
1C2	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
1C3	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	1
1C4	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
1C5	1	2	1	1	1	1	2	1	2	1	2	1
1C6	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
1C7	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
1C8	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
1C9	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
2A1	2	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2

2A10	2	2	1	1	1	2	1	2	2	2	2	2
2A11	2	2	1	1	2	2	1	2	2	2	2	2
2A12	1	1	2	1	1	1	1	2	2	2	2	2
2A13	1	1	2	1	1	1	1	2	2	2	2	2
2A2	1	2	1	2	2	1	1	2	1	2	2	1
2A3	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
2A4	1	1	2	1	1	1	1	2	2	2	2	1
2A5	1	1	2	1	1	1	1	2	2	2	2	1
2A6	1	1	2	1	1	1	1	2	2	2	1	1
2A7	1	1	2	1	1	1	1	2	2	2	1	1
2A8	2	2	2	1	1	2	1	2	1	2	1	1
2A9	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	1	2
2B1	1	1	2	1	1	1	1	2	2	2	2	1
2B10	2	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2
2B11	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
2B12	1	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1
2B2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	1
2B3	2	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2
2B4	1	1	2	1	1	1	1	2	1	1	2	1
2B5	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2
2B6	2	2	1	1	1	2	1	2	2	2	1	2
2B7	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2
2B8	2	2	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2
2B9	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	2
2C1	2	1	1	1	1	2	1	2	1	2	1	2
2C10	2	2	2	1	1	2	1	2	1	2	1	2
2C11	2	2	2	1	1	2	1	2	1	2	1	2
2C2	1	2	1	1	1	1	1	2	2	2	1	2
2C3	1	2	1	1	1	1	1	2	1	2	1	1
2C4	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
2C5	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	1
2C6	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
2C7	1	1	1	1	1	2	1	2	1	2	2	1
2C8	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
2C9	2	2	2	1	1	2	1	2	1	2	1	2
3A1	1	1	2	1	1	1	1	2	2	2	2	1
3A10	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
3A11	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
3A2	2	2	1	1	1	2	1	2	2	2	2	2
3A3	1	1	2	1	1	1	1	2	2	2	2	1
3A4	1	1	2	1	1	1	1	2	2	2	2	1
3A5	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1
3A6	1	1	2	1	1	1	1	2	2	2	2	1
3A7	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
3A8	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
3A9	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	1
3B1	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
3B10	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1

3B11	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
3B2	2	2	1	1	2	2	1	2	2	2	2	2
3B3	1	1	2	1	1	1	1	2	2	2	2	1
3B4	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
3B5	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
3B6	1	1	2	1	1	1	1	2	2	2	2	1
3B7	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
3B8	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
3B9	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
3C1	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	1	1
3C10	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
3C11	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
3C12	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
3C3	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
3C4	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
3C5	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
3C6	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
3C7	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
3C8	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
4A1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
4A10	1	1	2	1	1	1	2	1	1	2	2	1
4A11	1	1	2	1	1	1	2	1	1	2	2	1
4A2	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
4A3	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
4A4	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
4A5	1	1	2	1	1	1	1	2	2	1	2	2
4A6	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
4A7	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1
4A8	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	1
4A9	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	1
4B1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
4B10	1	1	2	1	1	1	2	2	1	1	2	1
4B11	1	1	2	1	1	1	2	2	1	1	2	1
4B12	1	1	2	1	1	1	2	2	1	1	2	1
4B13	1	1	2	1	1	1	2	2	1	1	2	1
4B2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	1
4B3	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
4B4	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
4B5	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
4B7	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
4B8	1	1	2	1	1	1	2	2	1	1	2	1
4B9	1	1	2	1	1	1	2	2	1	1	2	1
4C1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
4C10	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
4C2	2	2	2	1	1	2	2	1	1	1	2	2
4C3	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
4C4	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
4C5	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1

4C6	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1
4C7	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
4C8	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
4C9	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
5A1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
5A10	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
5A13	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
5A2	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
5A3	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
5A4	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
5A5	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
5A6	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
5A7	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
5A8	1	1	2	1	1	1	2	2	1	2	2	1
5A9	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
5B1	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
5B10	1	1	2	1	1	1	1	2	2	2	2	1
5B2	1	1	2	1	1	1	1	2	2	1	2	1
5B3	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
5B4	1	1	2	1	1	1	2	2	2	1	2	1
5B5	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
5B6	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
5B7	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
5B8	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
5B9	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
5C1	2	2	1	1	1	2	1	2	2	2	1	2
5C2	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
5C3	2	2	1	1	1	2	1	2	2	2	1	2
5C4	2	2	1	1	1	2	1	2	1	2	1	1
5C5	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
5C6	1	1	2	1	1	1	2	2	1	2	2	1
5C7	1	1	2	1	1	1	1	2	1	1	2	1
5C8	1	1	2	1	1	1	1	2	1	1	2	1
5C9	1	1	2	1	1	1	1	2	2	1	2	1
6A1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
6A2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	1
6A3	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2	1
6A4	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	1
6A5	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
6C1	1	1	2	1	1	1	2	2	1	2	2	1
6C2	1	1	2	1	1	1	2	2	1	2	2	1
6C3	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
6C4	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
6C5	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
6C6	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
6C7	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
6C8	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
6C9	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1

7A1	2	2	1	1	1	2	1	2	2	2	2	1
7A10	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
7A2	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
7A3	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
7A4	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
7A5	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
7A6	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
7A7	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
7A8	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
7A9	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
7B1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	2	2	1
7B10	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
7B2	1	1	2	1	1	1	2	1	1	2	2	1
7B3	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
7B4	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
7B5	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
7B6	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
7B7	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
7B8	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
7B9	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
7C1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
7C10	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
7C11	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
7C2	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
7C3	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
7C4	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
7C5	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
7C6	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
7C7	1	1	2	1	1	1	2	1	1	2	2	1
7C8	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
7C9	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
8A1	1	1	2	1	1	1	1	2	2	2	2	1
8A2	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
8A10	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
8A3	1	1	2	1	1	1	1	2	2	2	2	1
8A4	1	1	2	1	1	1	1	2	2	2	2	1
8A5	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
8A6	1	1	2	1	2	2	2	1	1	2	2	1
8A7	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
8A8	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
8A9	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
8B1	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
8B10	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
8B2	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
8B3	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
8B4	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
8B5	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
8B6	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1

8B7	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
8B8	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
8B9	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
8C1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
8C10	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1
8C11	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
8C12	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
8C2	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
8C3	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
8C4	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
8C5	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
8C6	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
8C7	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1
8C8	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1
8C9	1	1	2	1	1	1	1	2	1	2	2	1

*** Ordenação das Características Morfológicas dos Isolados de Rizóbios em Duas Classes**

Características	Código Numérico	
	1	2
Tempo de crescimento	Acima de 3 dias	1 a 3 dias
Tamanho da colônia	Puntiforme a 1mm	2 e 3mm
Forma da colônia	Irregular	Circular
Aparência da colnia	Homogênea	Heterogênea
Cor da colônia	Branca	Amarela
pH do meio	Neutro e alcalino	Ácido
Trasparência	Sim	Não
Elevação da colônia	Plana	Elevada
Aparência do muco	Homogênea	Heterogênea
Pegajosidade	Sem	Com
Elasticidade do muco	Com	Sem
Quantidade de muco	Pouca	Muita
Borda da colônia	Desconsiderada em função de todos os isolados terem bordas inteiras	

Apêndice 3

Análise Química do Solo para Macronutrientes, Realizada no Laboratório de Solos da Embrapa Agrobiologia.

Áreas	pH em água	Al ⁺³	Ca ⁺²	Mg ⁺²	P	K ⁺
		cmol _c .dm ⁻³			mg.dm ⁻³	
1 *	4,9	0,8	2,0	1,2	3	23
2 **	5,2	0,3	2,1	1,5	4	78
3 **	4,9	0,7	1,8	1,2	20	78
4 *	4,9	0,6	2,2	0,7	19	26
5 **	4,9	0,8	1,4	1,3	3	62
6 *	4,4	1,7	*	*	0	28
7 **	5,0	0,2	3,3	0,9	8	90
8 **	4,8	0,5	1,8	0,8	13	28
9 ***	4,3	0,8	1,18	1,36	22	17

* Áreas localizadas no município de Bom Jesus PI, local de coleta de amostras para avaliação da população de rizóbio nodulante de caupi;

** Áreas localizadas no município de São Domingos do Azeitão PI, local de coleta de amostras para avaliação da população de rizóbio nodulante de caupi;

*** Área localizada no município de Baixa Grande do Ribeira PI, local da implantação do experimento no campo;

* Teor do elemento abaixo do limite de detecção do método utilizado.

Análise Química do Solo para Micronutrientes, Realizada no Laboratório de Solos, Água e Plantas da Embrapa Solos

Áreas	Elementos Analisados (mg.dm ⁻³)										
	Mo	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Al	Cd	Pb
1 *	*	0,076	1,14	33,1	*	0,087	0,074	1,96	345	0,020	*
2 **	*	0,076	2,02	37,8	*	*	0,106	0,257	492	*	*
3 **	*	0,058	1,86	28,3	*	*	0,121	1,3	441	*	*
4 *	*	0,042	0,800	38,3	*	*	0,046	0,487	252	0,024	*
5 **	*	0,053	0,972	28,8	*	*	0,118	0,217	554	*	*
6 *	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
7 **	*	0,089	1,18	36,1	*	0,075	0,066	1,98	322	0,010	*
8 **	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
9 ***	*	0,042	1,91	28,5	*	*	0,080	0,608	314	*	*

* Áreas localizadas no município de Bom Jesus PI, local de coleta de amostras para avaliação da população de rizóbio nodulante de caupi;

** Áreas localizadas no município de São Domingos do Azeitão PI, local de coleta de amostras para avaliação da população de rizóbio nodulante de caupi;

*** Área localizada no município de Baixa Grande do Ribeira PI, local da implantação do experimento no campo;

* Teor do elemento abaixo do limite de detecção do método utilizado;

nd Amostras não analisadas.

Apêndice 4

Dados Relativos a Nodulação das Plantas de Siratro utilizados para Estimativa do Número de Células de rizóbios no Solo pelo NMP (Woomer, 1994)

Diluições do Solo	Repetições				Total de Plantas noduladas*
	1	2	3	4	
5 ⁻¹	+	+	-	+	3
5 ⁻²	+	-	+	+	3
5 ⁻³	-	+	+	+	3
5 ⁻⁴	+	+	+	-	3
5 ⁻⁵	-	-	+	+	2
5 ⁻⁶	+	-	-	-	1

* De acordo com a tabela 5 – 5 (Woomer, 1994), o total de plantas nodulas 3-3-3-3-2-1 representa uma estimativa de células de rizóbio da ordem de 6×10^3 .

Apêndice 5

Purificação de Anti-soros com Coluna HiTrap® Protein A (Amershan Pharmacia Biotech)

1. Lavar a coluna com 3ml de tampão Tris (Tris-HCl 0,06M; Tris-base 0,04M; pH 8,0);
 2. Aplicar 10ml do anticorpo diluído 1:50 (9,5ml de tampão Tris + 0,5ml do anti-soro);
 3. Lavar a coluna com 4ml de tampão Tris (Tris-HCl 0,06M; Tris-base 0,04M; pH 8,0);
 4. Aplicar 4ml de eluente, tampão Glicina (10mM pH 4,0);
 5. Coletar o efluente da coluna;
 6. Aplicar 4ml de eluente, tampão Glicina (10mM pH 3,0);
 7. Coletar o efluente da coluna;
 8. Lavar a coluna com 4ml de eluente, tampão Glicina (10mM pH 3,0);
 9. Lavar a coluna com 3ml de tampão Tris (Tris-HCl 0,06M; Tris-base 0,04M; pH 8,0);
 10. Lavar a coluna com 5ml de etanol (20%);
 11. Adicionar 3ml de etanol na coluna, fechá-la e guardá-la a 4°C;
 12. Ajustar o pH do anti-soro purificado para 7,0, utilizando NaOH (0,5M);
 13. Adicionar azida sódica em uma concentração final de 0,02%, para evitar contaminação. O soro deve ser aliquotado, estocando-se um volume rotineiro a 4°C e o restante a -20°C).
- Obs. - As soluções são aplicadas na coluna através utilizando uma seringa,

Purificação de Anti-soros com Coluna ECONO-PAC (BioRad)

1. Ajustar o fluxo da bomba peristáltica (0,4ml; 1 minuto);
 2. Lavar a coluna com 5ml de tampão Tris (Tris-HCl 0,06M; Tris-base 0,04M; pH 8,0);
 3. Aplicar 10ml do anticorpo diluído 1:50 (9,5ml de tampão Tris + 0,5ml do anti-soro);
 4. Lavar a coluna com 4ml de tampão Tris (Tris-HCl 0,06M; Tris-base 0,04M; pH 8,0);
 5. Aplicar 4ml de eluente, tampão Glicina (10mM pH 4,0);
 6. Coletar o efluente da coluna;
 7. Aplicar 4ml de eluente, tampão Glicina (10mM pH 3,0);
 8. Coletar o efluente da coluna;
 9. Lavar a coluna com 4ml de eluente, tampão Glicina (10mM pH 3,0);
 10. Lavar a coluna com 3ml de tampão Tris (Tris-HCl 0,06M; Tris-base 0,04M; pH 8,0);
 11. Lavar a coluna com 5ml de metanol (20%);
 12. Adicionar 3ml de metanol na coluna, fechá-la e guardá-la a 4°C;
 13. Ajustar o pH do anti-soro purificado para 7,0, utilizando NaOH (0,5M);
 14. Adicionar azida sódica em uma concentração final de 0,02%, para evitar contaminação. O soro deve ser aliquotado, estocando-se um volume rotineiro a 4°C e o restante a -20°C),
- Obs. - As soluções são aplicadas na coluna através de uma bomba peristáltica.

Apêndice 6

Nomenclatura das Estirpes Utilizadas no Experimento de Eficiência Simbiótica

Nomenclatura na Coleção de Cultura da Embrapa Agrobiologia	Nomenclatura Original	Local de Origem e Referência
BR3288	7A4	Cerrado (Isolada neste trabalho)
BR3287	1B13	Cerrado (Isolada neste trabalho)
BR3286	7C5	Cerrado (Isolada neste trabalho)
BR3280	3A8	Cerrado (Isolada neste trabalho)
BR3278	2A9	Cerrado (Isolada neste trabalho)
BR3282	8A2	Cerrado (Isolada neste trabalho)
BR3284	3A5	Cerrado (Isolada neste trabalho)
BR3283	2B9	Cerrado (Isolada neste trabalho)
BR3277	2C3	Cerrado (Isolada neste trabalho)
BR3281	1C5	Cerrado (Isolada neste trabalho)
BR3279	4A5	Cerrado (Isolada neste trabalho)
BR3285	6A4	Cerrado (Isolada neste trabalho)
BR3262	-	SIPA Seropédica RJ (Zilli et al., 1997)
BR3267	-	Semi-Árido nordestino (Martins, 1996)
BR2001	-	Libéria (Indefinida)