

**DIVERSIDADE GENÉTICA E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ISOLADOS DE
RIZÓBIOS NATIVOS EM FEIJÃO-FAVA (*Phaseolus lunatus* L.)**

JADSON EMANUEL LOPES ANTUNES

TERESINA
Estado do Piauí - Brasil
Maio - 2010

**DIVERSIDADE GENÉTICA E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ISOLADOS DE
RIZÓBIOS NATIVOS EM FEIJÃO-FAVA (*Phaseolus lunatus* L.)**

JADSON EMANUEL LOPES ANTUNES

**Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Agronomia do
Centro de Ciências Agrárias da
Universidade Federal do Piauí, para
obtenção do título de Mestre em
Agronomia, Área de Concentração:
Produção Vegetal.**

**TERESINA
Estado do Piauí - Brasil
Maio – 2010**

A636d

Antunes, Jadson Emanuel Lopes

Diversidade genética e eficiência simbiótica de isolados de rizóbios nativos em feijão-fava(*Phaseolus lunatos* L.) [manuscrito] / Jadson Emanuel Lopes Antunes - 2010. 108f.

Cópia de computador (printout)

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Agronomia. 2010.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Regina Lucia Ferreira Gomes

1. Feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) 2. *Fingerprinting* de DNA 3. BOX, REP e ERIC-PCR 4. ARDRA 5. Fixação biológica do nitrogênio (FBN) 6. Rizóbio 7. Eficiência simbiótica 8. Sequenciamento do gene 16S rDNA I. Título.

CDD 635.651

DIVERSIDADE GENÉTICA E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ISOLADOS DE RIZÓBIOS NATIVOS EM FEIJÃO-FAVA (*Phaseolus lunatus* L.)

JADSON EMANUEL LOPES ANTUNES

Biólogo / Engenheiro Agrônomo

Orientadora: Prof. Dra. Regina Lucia Ferreira Gomes

Co-Orientadora: Prof. Dra. Ângela Célis de Araújo Lopes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Produção Vegetal.

TERESINA

Estado do Piauí - Brasil

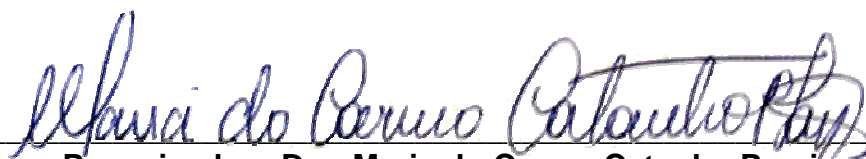
Mai - 2010

**DIVERSIDADE GENÉTICA E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ISOLADOS DE
RIZÓBIOS NATIVOS EM FEIJÃO-FAVA (*Phaseolus lunatus* L.)**

JADSON EMANUEL LOPES ANTUNES

Aprovada em 07/05/2010

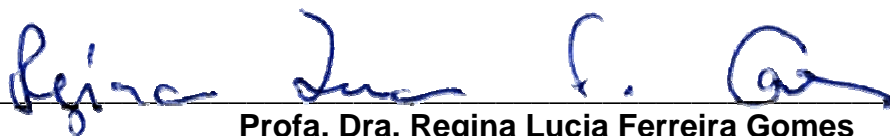
Comissão julgadora:



Pesquisadora Dra. Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra
Laboratório de GENOMA/IPA



Prof. Dr. Ademir Sérgio Ferreira de Araújo
Departamento de Engenharia Agrícola e Solos/CCA/UFPI



Profa. Dra. Regina Lucia Ferreira Gomes
Departamento de Fitotecnia/CCA/UFPI
Orientadora

"Nosso maior desejo na vida é encontrar alguém que nos faça fazer o melhor que pudermos"

Ralph Waldo Emerson

*"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.*

*Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.*

*Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."*

Martin Luther King

*Aos meus pais, Antunes e Desterro
aos meus irmãos Jayro e Janderson a
minha sobrinha Maria Júlia e a todos
que acreditam na concretização deste
Ideal.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pelo fortalecimento diante dos inúmeros obstáculos e por conceder o que há mais de valioso para mim, minha Família.

À Universidade Federal do Piauí e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela oportunidade de realização dessa dissertação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado.

Ao CNPq pelo financiamento da pesquisa.

Ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), pela utilização dos Laboratórios de Genoma e Biologia do Solo.

À Profa. Dra. Regina Lucia Ferreira Gomes, pelas cobranças, pelo excesso de confiança, pelos ensinamentos, pela orientação e, sobretudo pela amizade e convívio pessoal.

Ao Prof. Dr. Ademir Sérgio Ferreira de Araújo, pelas constantes e imprescindíveis ajudas, pela orientação, pelos contatos que possibilitaram a relação com outros bons pesquisadores.

À Profa. Dra. Ângela Celis de Almeida Lopes, pelas sugestões, pela amizade e, sobretudo pela serenidade em ajudar ao próximo.

À Profa. Dra. Eulália Maria de Sousa Carvalho, pela total confiança no uso de seu laboratório, pelas sugestões na dissertação e sobretudo pelas valiosas dicas na Docência Superior.

A Pesquisadora Ph.D Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra do IPA, carinhosamente conhecida como Cacau, pela acolhida, atenção e pelos valiosos ensinamentos repassados.

A Pesquisadora Dra. Márcia do Vale Barreto Figueiredo, pelas valiosas e claras sugestões, pelo ensinamento e disposição em atender a mais um, mantendo sempre as portas abertas.

Ao MSc. Jardel Oliveira Santos, pela disposição em ensinar-me na manipulação dos isolados de rizóbios.

A todos os colegas da Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal do Piauí, em especial Douglas Rafael e Antônio Almeida, pelo uso da mão-de-obra qualificada e barata no início dos trabalhos, em Teresina, e pelos esclarecimentos estatísticos.

Aos amigos do Laboratório de Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal do Piauí, Verônica, Cristiana Soares e Raimundo Nonato, por fornecer as sub-amostras de feijão-fava usadas neste trabalho.

Aos alunos de Graduação em Engenharia Agrônoma da Universidade Federal do Piauí, Dyêgo e Jaqueline pela ajuda indispensável na condução do experimento em casa de vegetação e nos laboratórios.

Ao Pesquisador MSc. José de Paula Oliveira do IPA, por não medir esforços para realização desse trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Genoma do IPA, Dra. Adália Mergulhão, Dra. Maria Luiza, Isabel, Lilian, Carol, Natália, Kirley, Meiry, Túlio e Daniel, pelas conversas entre uma e outra reação de PCR, pelas dicas e ajuda durante a minha estada neste laboratório.

A Valéria Xavier do Laboratório de Planta e Ração do IPA, pela ajuda nas análises de nitrogênio das amostras.

Aos amigos do Laboratório de Biologia do Solo do IPA, Rosa Moraes, Maria do Carmo Barreto, Raissa Rattes, Juliana Marques, Maria Vanilda Santana, Marcela Vila Nova, Emmanuela Vila Nova, e Mario Leandro, que ajudaram durante todo o experimento de eficiência simbiótica.

Ao Pesquisador Dr. Venézio Felipe do Santos do IPA, pela ajuda nas análises estatística.

A Maria Carolina Abreu e Vera Lúcia Abreu, pela acolhida, belas comidas e amizade convivida em seu apartamento, durante os seis meses de permanência em Recife-PE.

Aos meus pais Antunes e Desterro, pelo exemplo de vida, dedicação e honestidade a ser seguido e a compreensão pelas minhas ausências; minha gratidão pela oportunidade que me deram de buscar o conhecimento, como forma de conquistar meus sonhos e tornar-me um homem.

Aos meus irmãos Jayro Antunes e Janderson Antunes, que sempre me apoiaram nesta empreitada às vezes malucas.

À todos que estiveram envolvidos indiretamente neste trabalho, para que houvesse êxito.

Meu muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE QUADROS E TABELAS	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUÇÃO GERAL	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1. A espécie feijão-fava (<i>Phaseolus lunatus</i> L.)	22
2.2. Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN)	24
2.3. Eficiência simbiótica	25
2.4. Taxonomia dos rizóbios	27
2.5. Técnicas moleculares utilizadas no estudo rizóbiano	30
3. REFERÊNCIAS	35
4. CAPÍTULO I	49
Diversidade genética de isolados de rizóbios nativos de feijão-fava (<i>Phaseolus lunatus</i> L.) do Piauí.	
RESUMO.....	49
ABSTRACT	50
4.1. INTRODUÇÃO	51
4.2. MATERIAL E MÉTODOS	54
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.4. CONCLUSÕES	79
4.4. AGRADECIMENTOS	80
4.5. REFERÊNCIAS	80
ANEXOS	86

5. CAPÍTULO II	91
 Eficiência simbiótica de isolados de rizóbio noduladores de feijão-fava (<i>Phaseolus lunatus</i> L.)	
RESUMO	91
SUMARRY	92
5.1. INTRODUÇÃO	93
5.2. MATERIAL E MÉTODOS	95
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
5.4. CONCLUSÕES	102
5.5. AGRADECIMENTOS	103
5.6. LITERATURA CITADA	105

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** Padrão de bandas dos produtos de amplificação com os oligonucleotídeos BOX, REP e ERIC-PCR de alguns isolados de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.).
Legenda: Marcador 1Kb Plus, 2 a 13 correspondem aos isolados (Isol2, Isol3, Isol4, Isol5, Isol6, Isol7, Isol8, Isol9, Isol10, Isol11, Isol12 e Isol13) 58
- Figura 2.** Dendrograma formado pelo agrupamento (UPGMA, com o coeficiente de Simple Matching (SM)) dos produtos obtidos na análise de **REP-PCR** dos 50 isolados de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) e estirpes de referência (ER1 – *Rhizobium* SP NGR234, ER2 – *Mesorhizobium mediterraneanus* BR 523, ER3 – *R. etli* CFN42, ER4 – *Ensifer fredii* USDA205, ER5 – *Bradyrhizobium japonicum* BR111 e ER6 – *R. tropici* CIAT899) 60
- Figura 3.** Dendrograma formado pelo agrupamento (UPGMA, com o coeficiente de Simple Matching (SM)) dos produtos obtidos na análise de **ERIC-PCR** dos 50 isolados de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) e estirpes de referência (ER1 – *Rhizobium* SP NGR234, ER2 – *Mesorhizobium mediterraneanus* BR 523, ER3 – *R. etli* CFN42, ER4 – *Ensifer fredii* USDA205, ER5 – *Bradyrhizobium japonicum* BR111 e ER6 – *R. tropici* CIAT899) 62
- Figura 4.** Dendrograma formado pelo agrupamento (UPGMA, com o coeficiente de Simple Matching (SM)) dos produtos obtidos na análise de **BOX-PCR** dos 50 isolados de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) e estirpes de referência (ER1 – *Rhizobium* SP NGR234, ER2 – *Mesorhizobium mediterraneanus* BR 523, ER3 – *R. etli* CFN42, ER4 – *Ensifer fredii* USDA205, ER5 – *Bradyrhizobium japonicum* BR111 e ER6 – *R. tropici* CIAT899)..... 64

Figura 5. Dendrograma polifásico (UPGMA, com o coeficiente de Simple Matching (SM)) dos produtos obtidos nas análises de **REP, ERIC e BOX-PCR** dos 50 isolados de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) e estirpes de referência (ER1 – *Rhizobium* SP NGR234, ER2 – *Mesorhizobium mediterraneanus* BR 523, ER3 – *R. etli* CFN42, ER4 – *Ensifer fredii* USDA205, ER5 – *Bradyrhizobium japonicum* BR111 e ER6 – *R. tropici* CIAT899) 66

Figura 6. Dendrograma de similaridade dos 50 isolados de rizóbio provenientes de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) e 6 estirpes de referência na análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA) usando a endonuclease **Ddel**. Legenda: ER1- *Rhizobium* sp NGR234; ER2- *Mesorhizobium mediterraneus* BR523; ER3- *Rhizobium etli* CFN42; ER4 - *Ensifer fredii* USDA205; ER5 - *Bradyrhizobium japonicum* BR11 e ER6 - *Rhizobium tropici* CIAT899 70

Figura 7. Dendrograma de similaridade dos 50 isolados de rizóbio provenientes de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) e 6 estirpes de referência na análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA), usando a endonuclease **Hhal**. Legenda: ER1- *Rhizobium* sp NGR234; ER2- *Mesorhizobium mediterraneus* BR523; ER3- *Rhizobium etli* CFN42; ER4 - *Ensifer fredii* USDA205; ER5 - *Bradyrhizobium japonicum* BR11 e ER6 - *Rhizobium tropici* CIAT899 71

Figura 8. Dendrograma de similaridade dos 50 isolados de rizóbio provenientes de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) e 6 estirpes de referência na análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA), usando a endonuclease **Mspl**. Legenda: ER1- *Rhizobium* sp NGR234; ER2- *Mesorhizobium mediterraneus* BR523; ER3- *Rhizobium etli* CFN42; ER4 - *Ensifer fredii* USDA205; ER5 - *Bradyrhizobium japonicum* BR11 e ER6 - *Rhizobium tropici* CIAT899 72

Figura 9. Dendrograma de similaridade dos 50 isolados de rizóbio provenientes de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) e 6 estirpes de referência na análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA), usando a endonuclease **Ddel** e **Hhal**. Legenda: ER1- *Rhizobium* sp NGR234; ER2- *Mesorhizobium mediterraneus* BR523; ER3- *Rhizobium etli* CFN42; ER4 - *Ensifer fredii* USDA205; ER5 - *Bradyrhizobium japonicum* BR11 e ER6 - *Rhizobium tropici* CIAT899 73

Figura 10. Dendrograma de similaridade dos 50 isolados de rizóbio provenientes de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) e 6 estirpes de referência na análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA), usando a endonuclease **Ddel** e **Mspl**.
Legenda: ER1- *Rhizobium* sp NGR234; ER2- *Mesorhizobium mediterraneus* BR523; ER3-*Rhizobium etli* CFN42; ER4 - *Ensifer fredii* USDA205; ER5 - *Bradyrhizobium japonicum* BR11 e ER6 - *Rhizobium tropici* CIAT899 74

Figura 11. Dendrograma de similaridade dos 50 isolados de rizóbio provenientes de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) e 6 estirpes de referência na análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA), usando a endonuclease **Hhal** e **Mspl**.
Legenda: ER1- *Rhizobium* sp NGR234; ER2- *Mesorhizobium mediterraneus* BR523; ER3-*Rhizobium etli* CFN42; ER4 - *Ensifer fredii* USDA205; ER5 - *Bradyrhizobium japonicum* BR11 e ER6 - *Rhizobium tropici* CIAT899 75

Figura 12. Dendrograma de similaridade genética compilado entre os 50 isolados obtidos por UPGMA, com base na análise do DNA ribossomal amplificado (ARDRA), usando as enzimas **Ddel**, **Hhal** e **Mspl**. Legenda: ER1- *Rhizobium* sp NGR234; ER2- *Mesorhizobium mediterraneus* BR523; ER3-*Rhizobium etli* CFN42; ER4 - *Ensifer fredii* USDA205; ER5 - *Bradyrhizobium japonicum* BR11; ER6 - *Rhizobium tropici* CIAT899. 76

Figura 13. Árvore filogenética reconstruída a partir de sequências do gene 16S rDNA dos isolados de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.), utilizando-se o método de Neighbor-Joining, com distâncias calculadas pelo método de Jukes-Cantor. Os valores de cada rama representam as porcentagens de 1000 réplicas bootstrap. Ramas com valores de bootstrap abaixo de 55% são como não resolvidas. 78

CAPÍTULO 2

Figura 1. : Nodulação em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) por rizóbio: a)ISOL-18; b)ISOL-21; c)ISOL-23; d)ISOL-24; e)ISOL-25; f) ISOL-30; g)ISOL-32; h)ISOL-35; i)ISOL-36; j)ISOL-43; k) ISOL-45 e l) ISOL-50 104

LISTA DE QUADROS E TABELAS

CAPÍTULO 1

- Tabela 1.** Características morfológicas e fisiológicas dos isolados de rizóbios, oriundos dos solos de Nova Esperança e Santa Rita, município de Água Branca, PI noduladores de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). Santos, 2008 86
- Quadro 1.** Resultados da busca por similaridade no GENBANK com o programa BLAST dos 50 isolados de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) 88

CAPÍTULO 2

- Quadro 1.** Características morfológicas e fisiológicas dos 17 isolados de rizóbios utilizados no estudo, oriundos dos solos de Nova Esperança e Santa Rita, município de Água Branca, PI noduladores de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). Santos, 2008 96
- Quadro 2.** Valores médios da massa seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e do nódulo (MSN), dos diferentes isolados de rizóbios inoculados em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) sub-amostra UFPI-468 98
- Quadro 3.** Valores médios da relação (MSPA/MSR), nitrogênio acumulado na MSPA (Nac) e eficiência da fixação do nitrogênio dos diferentes isolados de rizóbios inoculados em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) sub-amostra UFPI-491 100
- Quadro 4.** Matriz de correlação da massa seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR), do nódulo (MSN), da relação (MSPA/MSR), nitrogênio acumulado na MSPA (Nac) e eficiência da fixação do nitrogênio dos diferentes isolados de rizóbios inoculados em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) sub-amostra UFPI-468 102

DIVERSIDADE GENÉTICA E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ISOLADOS DE RIZÓBIOS NATIVOS EM FEIJÃO-FAVA (*Phaseolus lunatus* L.)

Autor: Jadson Emanuel Lopes Antunes

Orientadora: Profa. Dra. Regina Lucia Ferreira Gomes

Co-Orientadora: Profa. Dra. Ângela Celis de Araújo Lopes

RESUMO

Objetivou-se realizar a caracterização molecular de 50 isolados nativos de rizóbios de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) no Piauí, assim como estudar a eficiência simbiótica de 17 isolados na fixação biológica do nitrogênio. O trabalho foi desenvolvido durante os meses de abril a setembro de 2009, nos Laboratórios de Genoma e Biologia dos Solos do Instituto Agrônomo de Pernambuco. Para a caracterização molecular dos isolados, estes foram crescidos em meio TY líquido (Beringer, 1974), e posteriormente extraiu-se o DNA, utilizando Kit's comerciais. Com os oligonucleotídeos REP, BOX e ERIC e a técnica de ARDRA para o gene 16S rDNA, observou-se que existe grande diversidade genética entre os simbiotes de feijão-fava. Para o estudo da eficiência simbiótica, os isolados foram escolhidos após diferenciação molecular, sendo posteriormente cultivados em meio YEM (Vicente, 1970), por até 120h. O estudo ocorreu em casa de vegetação, utilizando-se Vasos de Leonard. A coleta foi realizada aos 34 dias após o plantio, analisando-se as seguintes características: massa seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e dos nódulos (MSN); relação MSPA/MSR, nitrogênio acumulado (Nac) na MSPA, pelo método de Kjeldahl segundo Bremner (1965), e a eficiência da fixação de N₂. Observou-se correlação entre todas as características, exceto com MSR. Em geral, os isolados ISOL-18, ISOL-21, ISOL-23, ISOL-24, ISOL-25, ISOL-30, ISOL-32, ISOL-35, ISOL-36, ISOL-43, ISOL-45 e ISOL-50 apresentaram os melhores índices de MSPA, MSR, MSPA/MSR, Nac e eficiência da fixação de N₂ em relação aos isolados ISOL-2, ISOL-9, ISOL-16, ISOL-40 e testemunha absoluta. Os testes de eficiência mostraram que houve diferenças entre os isolados na FBN com o feijão-fava. Aproximadamente 60% dos isolados avaliados apresentaram bom

desempenho no fornecimento de nitrogênio ao desenvolvimento das plantas, podendo ser recomendados para testes de eficiência agronômica em feijão-fava em condições não estéreis.

Palavras-chave: Fixação biológica do nitrogênio, nodulação, oligonucleotídeos, ARDRA, BOX-PCR, 16S rDNA.

**GENETIC DIVERSITY AND SYMBIOTIC EFFICIENCY OF NATIVE RHIZOBIA
ISOLATES IN LIMA BEAN (*Phaseolus lunatus* L.)**

Author: Jadson Emanuel Lopes Antunes

Advisor: Prof. Dra. Regina Lucia Ferreira Gomes

Co-Advisor: Prof. Dra. Ângela Célis Lopes de Araújo

ABSTRACT

This work was aimed at the molecular characterization of 50 isolates of rhizobia native of lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Piauí, and the study of symbiotic effectiveness of 17 isolates in biological nitrogen fixation. This work was conducted during the months from April to September 2009 at the Agronomic Institute of Pernambuco, in the Laboratories of Genome Biology and Soil. Molecular characterization of isolates, these were grown in liquid TY medium (Beringer, 1974) and subsequently extracted using the DNA Extraction Kit's commercials. We used the primers REP, ERIC and BOX. We performed the technique of ARDRA for the 16S rDNA. It was observed that there is great genetic diversity of symbionts of lima bean, the primers used were able to detect such diversity. To study the symbiotic efficiency, the isolates were selected after molecular differentiation, they were cultured on YEM (Vicente, 1970) for 120h. The study took place in a greenhouse using Pot Leonard. The collection was performed 34 days after planting, the variables were analyzed: shoot dry mass (SDM), root (MSR) and nodules (MSN), ratio DMAP / MSR, nitrogen accumulated (Nac) in ADM by Kjeldahl method of Bremner second (1965) and the efficiency of N₂ fixation. Interaction was observed for all variables except for MSR. In general isolates ISOL-18, ISOL-21, ISOL-23, ISOL-24, ISOL-25, ISOL-30, ISOL-32, ISOL-35, ISOL-36, ISOL-43, ISOL-45 and ISOL-50 had better rates of SDM, MSR, DMAP / MSR, Nac and efficiency in relation to isolated ISOL-2, ISOL-9, ISOL-16, ISOL-40 and absolute control. Data from the efficiency tests showed that there were differences among the isolates in BNF with the lima bean. Approximately 60% of isolates showed good performance in the supply of nitrogen the plants can be recommended for efficiency tests under non-

sterile. Most isolates showed good performance in the supply of nitrogen in plant development can be recommended for testing agronomic efficiency in lima bean.

Key words: Biological nitrogen fixation, nodulation, oligonucleotides, ARDRA, BOX-PCR, 16s rDNA.

INTRODUÇÃO GERAL

A família Fabaceae, uma das maiores entre as dicotiledôneas, com 643 gêneros, reúne 18.000 espécies distribuídas em todo o mundo, estando concentrada nas regiões tropicais e subtropicais (BROUGHTON et al., 2003). A espécie *Phaseolus lunatus* L., também conhecida como feijão-fava ou feijão-lima, é cultivada na América do Norte, América do Sul, Europa, leste e oeste da África e sudeste da Ásia (BAUDOIN, 1988). Constitue-se em uma das principais leguminosas cultivadas na região tropical, cujo consumo pelo homem ocorre na forma de grãos verdes e secos, vagens verdes e folhas, que apresenta potencial para o fornecimento de proteína vegetal à população e diminuição da dependência, quase exclusiva, do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) do grupo carioca (VIEIRA, 1992).

No Brasil, apesar de ser cultivada em todos os estados e de apresentar capacidade de adaptação mais ampla que o feijão-comum, o feijão-fava ainda tem pouca relevância, não recebendo a devida atenção por parte dos órgãos de pesquisa e extensão, o que tem resultado em limitado conhecimento das suas características agrônômicas (SANTOS et al., 2002). A importância econômica e social do feijão-fava se deve principalmente à sua rusticidade em regiões semiáridas do Nordeste do país, o que possibilita prolongar a colheita em período seco (AZEVEDO et al., 2003).

Segundo o IBGE (2008), no Brasil foram produzidas 19.890 ton de grãos secos do feijão-fava, numa área plantada de 42.004 ha. Os Estados da Paraíba, Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco, Piauí, Maranhão, Sergipe e Alagoas, em ordem decrescente, são os maiores produtores, e juntos fazem do Nordeste, a maior região produtora, com 19.053 ton, em 40.711 ha. Nessa região, o feijão-fava é produzido principalmente por pequenos produtores, sendo consumido como uma iguaria especial, que não substitui o feijão-comum ou o feijão-caupi (*Vigna unguiculata*).

Um outro aspecto interessante relacionado à espécie, é a possibilidade de interação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico, também denominados rizóbios, permitindo o aumento de rendimento, bem como a facilidade de manejo e diminuição do custo de produção, além de economizar combustíveis fósseis utilizados para a produção industrial de fertilizantes nitrogenados (SOARES et al., 2006).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é o processo pelo qual o nitrogênio atmosférico (N_2) é convertido em amônia (NH_3) e posteriormente é disponibilizado para as plantas. Em sistemas agrícolas, talvez 80% do nitrogênio fixado biologicamente venha da simbiose envolvendo leguminosas e bactérias da família Rhizobiaceae (VANCE, 1998).

Nem sempre a população nativa do solo é capaz de estabelecer uma simbiose mutualista com o hospedeiro cultivado. A seleção de estirpes eficientes para maximizar a fixação de nitrogênio em espécies vegetais de importância econômica tem sido um dos principais alvos de pesquisas. Logo, a seleção de estirpes que combinem habilidade na fixação de nitrogênio, adaptação às condições edafoclimáticas e alta competição por sítios de infecção nodulares são importantes para a produção de inoculante. No processo de seleção dessas estirpes, é fundamental que se tenha variabilidade do microssimbionte, para que aumente a probabilidade de sucesso da simbiose hospedeiro-rizóbio (SOARES, 2004).

Bactérias denominadas coletivamente de rizóbios, possuem genes de nodulação que possibilitam a infecção dos pêlos radiculares de espécies de leguminosas, que por sua vez, as abrigam em estruturas especiais chamadas nódulos. Esta associação planta – bactéria é tida como simbiótica, onde o rizóbio fornece à planta o nitrogênio proveniente da fixação biológica; a planta fornece à bactéria carboidratos provenientes da fotossíntese (STRALIOTTO e TEIXEIRA, 2000).

Atualmente, segundo Kuykendall e Dazzo (2005), Kuykendall (2005a, 2005b), Chen et al. (2005); Kuykendall et al (2005), a ordem Rhizobiales é classificada em dez famílias: Aurantimonadaceae, Bartonellaceae, Beijerinckiaceae, Bradyrhizobiaceae, Brucellaceae, Hyphomicrobiaceae, Methylobacteriaceae, Methylocystaceae, Phyllobacteriaceae, Rhizobiaceae. Nesta última, encontram-se os seguintes gêneros: *Agrobacterium* (SETUBAL et al, 2009), *Allorhizobium*

(SESSITSCH et al., 2002). *Carbophilus* (EUZÉBY e KUDO, 2001), *Chelatobacter* (KÄMPFER et al, 2002), *Kaistia* (WEON et al, 2008), *Rhizobium* (SAWADA et al, 2003), *Sinorhizobium/Ensifer* (MARTENS et al, 2008), *Candidatus* (DE VOS et al, 2005).

A partir da década de 1980, o uso de ferramentas de genética molecular (hibridização DNA-DNA e seqüenciamento do 16S rDNA), juntamente com técnicas moleculares mais modernas, como a reação em cadeia da polimerase (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) e sequenciamentos de genes específicos para análise de filogenia, levaram à modificação e reorganização taxonômica dos gêneros existentes e à descrição de novos gêneros (WILLEMS, 2006).

Assim, objetivou-se analisar o perfil genético de isolados de rizóbios nativos e avaliar a eficiência simbiótica do feijão-fava no Piauí.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A espécie *Phaseolus lunatus* L.

P. lunatus L., o feijão-fava, é uma espécie amplamente distribuída através da América Tropical, cultivada especialmente em solos de baixa fertilidade da maioria das áreas úmidas (YAGUIU et al., 2003). Originária da América Central e do Sul, sua domesticação parece ter ocorrido em ambos locais (SAUER, 1993; ZIMMERMANN e TEIXEIRA, 1996). A primeira domesticação ocorreu no noroeste da América do Sul e produziu uma grande variação nesta espécie. Evidências para esta domesticação vieram de um sítio arqueológico Peruano (Caverna Guitarrero), onde foram encontrados grãos de fava que dataram de 6500 a.C., 1000 anos antes que grãos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) fossem encontrados no mesmo local e ainda antes do milho (*Zea mays* L.). As variedades Sieva Bean, Butter Bean e Baby Lima Bean foram originadas da segunda domesticação, a qual ocorreu na América Central, provavelmente na Guatemala, embora a mais nova evidência arqueológica seja do México, onde os grãos dataram de pelo menos 800 d.C. (SAUER, 1993).

O feijão-fava, também conhecido por fava, feijão-de-lima, feijoal, bongue, mangalô-amargo, fava-belém, fava-terra, feijão-espadinho, feijão-farinha, feijão-favona, feijão-fígado-de-galinha, feijão-verde (OLIVEIRA et al., 2004; GRIN, 2010), é uma leguminosa pertencente à família Fabaceae ou Leguminosae, uma das maiores famílias botânicas, de ampla distribuição geográfica e de importância econômica por apresentar espécies produtoras de alimentos como soja (*Glycine Max*), ervilha (*Pisum sativum*), alfafa (*Medicago sativa*) e feijão (*Phaseolus vulgaris*) (MCCLEAN et al., 2005). Esta família é subdividida em três subfamílias, sendo *Phaseolus* um membro da subfamília Papilionoideae, que é a maior, consistindo de 476 gêneros (LEWIS et al., 2003).

De acordo com Castineiras (1991), são reconhecidos três grupos de feijão-fava, baseados na forma e peso de 100 sementes, os quais são chamados como

“papas” (sementes pequenas, com peso de 100 sementes entre 35 a 50 g), “sieva” (sementes médias e planas, com peso de 100 sementes entre 50 a 70 g) e “big lima” (sementes grandes, com peso de 100 sementes entre 70 a 110 g).

Segundo Zimmermann e Teixeira (1996), o *P. lunatus* pode ser identificado como uma leguminosa de germinação epígea; onde as folhas geralmente apresentam coloração escura, mais persistentes que em outras espécies do gênero, mesmo depois do amadurecimento das vagens; bractéolas pequenas e pontiagudas; vagens de forma geralmente oblonga e recurvada, com duas alturas distintas (ventral e dorsal) e número de sementes variando de duas a quatro. Tais sementes exibem grande variação de tamanho e cor de tegumento (SANTOS et al., 2002). Uma característica marcante dessa espécie, que a distingue facilmente de outros feijões, são as linhas que se irradiam do hilo para a região dorsal das sementes, mas em algumas variedades essas linhas podem não ser tão facilmente observadas (VIEIRA, R.F., 1992).

O feijão-fava é uma das quatro espécies do gênero *Phaseolus* exploradas comercialmente (SANTOS et al., 2002). Acredita-se que as principais razões para o seu cultivo relativamente limitado sejam a tradição do consumo do feijão-comum, o paladar e o seu tempo de cocção mais longa da fava, além da falta de variedades adaptadas às condições da região (LYMMAN, 1983).

Nos Estados Unidos, um dos maiores produtores de feijão-fava do mundo, o seu consumo ainda em estado verde, na forma de conserva é muito apreciado, superando o consumo na forma de grãos secos. No Brasil, o consumo é preferencialmente na forma de grãos verdes cozidos (VIEIRA, 1992).

O feijão-fava é cultivado em quase todo território nacional, atingindo relativa importância econômica, principalmente na região Nordeste, destacando-se os estados da Paraíba e Ceará como os maiores produtores (IBGE, 2008). É uma das alternativas de renda e alimento para a população dessa região, sendo cultivado por pequenos produtores, que utilizam principalmente cultivares de crescimento indeterminado (OLIVEIRA et al., 2004).

A baixa produtividade de feijão-fava pode ser atribuída ao fato de parte da produção ser oriunda de pequenos produtores, em consórcio, sem adoção de tecnologia que vise seu aumento (SANTOS et al., 2002). A sua associação com bactérias do grupo dos rizóbios, capazes de fixar o nitrogênio atmosférico e fornecê-

lo à cultura, é uma tecnologia que pode substituir, pelo menos parcialmente, a adubação nitrogenada, resultando em benefícios ao pequeno produtor.

2.2. Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN)

A fixação biológica de nitrogênio é caracterizada pela utilização do nitrogênio gasoso da atmosfera (N_2) como fonte de nitrogênio para o metabolismo de um grupo seletivo de seres vivos, que inclui algumas espécies de microrganismos procarióticos. Estes microrganismos possuem o complexo enzimático chamado nitrogenase, necessário para transformar o N_2 em amônia, subsequente assimilada em aminoácidos e proteínas (NEVES e RUMJANEK, 1998).

A capacidade diazotrófica está restrita a Bactéria e Archaea, incluindo cianobactérias e bactérias Gram positivas e Gram negativas (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). A observação de uma árvore filogenética contendo espécies procarióticas mostra que os microrganismos diazotróficos ocorrem em um grande número e sua distribuição não obedece nenhum padrão lógico. Esta característica pode ser explicada por três hipóteses. A primeira é que a capacidade diazotrófica teve origens múltiplas. A segunda é que o caráter diazotrófico estava presente num ancestral comum a todas as espécies, mas foi perdido durante o processo evolutivo que deu origem a diferentes ramos filogenéticos. A terceira é que o potencial diazotrófico teve uma única origem, mas se estendeu a outros ramos filogenéticos por transferência lateral de plasmídeos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

As bactérias denominadas rizóbios são consideradas o principal grupo de diazotróficos, por sua importância agrônoma e pela fixação de nitrogênio. O segundo grupo economicamente mais importante é composto pelas cianobactérias, que têm sido encontradas como fixadoras de vida-livre e em associações com várias plantas, dentre estas, a planta aquática *Azolla*. O manejo desta espécie vegetal vem sendo estimulado junto ao sistema de arroz irrigado na China e Vietnam. Cianobactérias podem formar ainda associações com vários outros organismos, como fungos e algas (formando líquens) e angiospermas do gênero *Gunnera*. O terceiro grupo de organismos fixadores de N é representado pela associação simbiótica entre actinomicetos (*Frankia*, *Nostoc*) e plantas de várias famílias, principalmente plantas arbóreas pertencentes aos gêneros *Alnus* e *Casuarina* (SPRENT e SPRENT, 1990).

Na fixação biológica, o nitrogênio molecular ou dinitrogênio (N_2) é transformado em NH_3 (amônia) a custas de energia da planta (BURRIS, 1999; TAÍZ e ZIEGER, 2004). O complexo enzima nitrogenase, formado por duas unidades protéicas, a Ferro-proteína (Fe-proteína) e a Molibdênio-Ferro-proteína (MoFe-proteína), é responsável pela fixação de nitrogênio no nódulo (MYLONA et al., 1995; BURRIS, 1999; TAÍZ e ZIEGER, 2004).

Em leguminosas, a adição de adubos nitrogenados tem efeito adverso na fixação biológica, devido à diminuição de disponibilidade de oxigênio na respiração nodular (DENISON e HARTEK, 1995) e a limitação de carboidratos ao metabolismo do nódulo (STEFENS e NEYRA, 1983). Estes autores demonstraram que a adição de nitrogênio às plantas de soja na forma de KNO_3 diminui substancialmente a atividade da nitrogenase em mais de 50%. Isso ocorre porque o nitrato e o nitrito acumulados a nível nodular inibem a fixação de nitrogênio, devido a diminuição da disponibilidade de energia ao bacteróide. Entretanto, se a planta apresentar um suprimento de sacarose para os nódulos, a atividade da nitrogenase é incrementada devido ao decréscimo no nível de nitrito acumulado nos mesmos.

2.3. Eficiência simbiótica

Os estudos com leguminosas tropicais, no ambiente tropical, ainda são incipientes. A utilização de inoculantes rizobianos tem se mostrado limitada porque a maior parte das leguminosas são noduladas por estirpes naturais nem sempre de alta eficiência. Por outro lado, a introdução de uma estirpe considerada mais eficiente em fixar nitrogênio em condições tropicais é quase sempre prejudicada pela competitividade dos rizóbios nativos, normalmente mais adaptados às condições edafoclimáticas da região (SANTOS et al, 2008).

Em trabalho realizado com diferentes cultivares de amendoim (*Arachis hypogaea*), Santos et al. (2005) mostraram que a eficiência de isolados nativos pode variar, tanto entre cultivares de uma mesma espécie de leguminosas, quanto com a cobertura vegetal do solo utilizado. Entretanto, alguns isolados foram muito eficientes, apresentando-se com 80% de eficiência em relação ao controle com 100kg de N/ha na forma de uréia. Dessa forma, não se pode afirmar que rizóbios nativos de regiões tropicais são sempre ineficientes.

A constante seleção de novas estirpes, capazes de fixar N atmosférico quando em simbiose com leguminosas, é uma alternativa importante na busca de um par simbiótico mais eficiente. Contudo, estirpes selecionadas em laboratório e casa de vegetação podem não alcançar o máximo potencial de fixação no campo, em decorrência, dentre outros fatores, da competição com a população nativa e estabelecida do solo e da baixa adaptação às condições ambientais locais (SOARES et al. 2006b).

O estudo da eficiência simbiótica juntamente com o estudo da sobrevivência das bactérias inoculadas em competição com a microbiota do solo têm sido realizações importantes para seleção de estirpes, devido à grande variabilidade genética entre o macrosimbionte e estirpes de rizóbios na simbiose (NOGUEIRA, 2005).

A seleção de estirpes eficientes para otimizar o potencial de fixação do N₂ em leguminosas de importância econômica deve levar em conta, além da eficiência da estirpe, características como habilidade de competir com estirpes nativas por sítios de infecção, maior estabilidade genética, maior tolerância a estresses, habilidade de sobreviver e se multiplicar no solo mesmo na ausência do hospedeiro, formação de nódulos sob larga faixa de temperatura e umidade nas raízes, dentre outras (HUNGRIA et al., 1997; CHUEIRE et al., 2003).

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

2.4. Taxonomia dos rizóbios

Os rizóbios foram agrupados com base em suas características fenotípicas, principalmente na habilidade de nodular algumas leguminosas, dando origem ao conceito de “grupos de inoculação cruzada”. A taxonomia do rizóbio, baseada na especificidade hospedeira, foi sendo substituída pela taxonomia numérica, que se apóia nas características bioquímicas, fisiológicas, sorológicas e moleculares (HUNGRIA et al., 1997).

A família Rhizobiaceae foi primeiramente representada apenas pelo gênero *Rhizobium*, o qual era constituído por bactérias capazes de nodular e fixar nitrogênio em relações simbióticas com plantas da família Leguminosae. As espécies simbióticas eram *Rhizobium leguminosarum* (espécie tipo), *R. japonicum*, *R. lupini*, *R. meliloti*, *R. phaseoli* e *R. trifoli*. As espécies *Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *A. rubi*, *Phyllobacterium myrsinacearum* e *P. rubiacearum*, todas causando hipertrofias em plantas, também foram incluídas na família Rhizobiaceae (SKERMAN et al., 1980). A classificação das espécies, nesse período, tinha como base, principalmente, a leguminosa hospedeira com a qual fossem capazes de formar nódulos e fixar nitrogênio. Desse modo, *R. phaseoli* nodula feijoeiro; *R. japonicum*, a soja; *R. meliloti*, a alfafa (*Medicago sativa*); *R. lupini*, *Lupinus spp.* e *R. trifolii*, o trevo (*Trifolium repens*) (COUTINHO, 2003).

O conceito de planta hospedeira, porém, foi modificado após a observação de muitas reações cruzadas entre as plantas hospedeiras e as bactérias simbióticas, pois uma única leguminosa, por exemplo, Acácia, *Glycine max* ou *Leucaena sp* poderia abrigar diferentes simbioses (TEREFEWOR et al., 2000). A Acácia, por exemplo, é nodulada por *Bradyrhizobium sp.* (DUPUY e DREYFUS, 1992), *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* (LAJUDIE et al., 1992) e *R. huakuii* (MARTÍNEZ-ROMERO, 1994). Já o feijoeiro é nodulado por uma grande diversidade de rizóbios e, em adição a *R. tropici*, *R. etli*, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. giardinii* e *R. gallicum*, provavelmente há novas espécies ainda não descritas (MOSTASSO et al., 2002; GRANGE e HUNGRIA, 2004).

Os estudos de taxonomia rizobiana foram impulsionados com o advento de metodologias avançadas, tais como a sistemática molecular e quimiotaxonômica, para a caracterização de microrganismos. Bactérias de crescimento rápido e lento foram, então, separadas em dois gêneros, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*

respectivamente (JORDAN, 1984) e, posteriormente, mais quatro novos gêneros foram incluídos: *Sinorhizobium* (CHEN et al., 1998; LAJUDIE et al., 1994), *Azorhizobium* (DREYFUS et al., 1988), *Mesorhizobium* (JORDAN, 1984; JARVIS et al., 1982; NOUR et al., 1994; LINDSTRÖM et al., 1995) e *Allorhizobium* (LAJUDIE et al., 1998). De acordo com Piñero et al. (1988), a grande diversidade e a ampla distribuição geográfica podem ser interpretadas como uma evidência de que *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e outros rizóbios, sejam estirpes antigas e com uma longa história evolutiva.

Hoje, as espécies caracterizadas molecularmente como *Rhizobium* são 30: *R. cellulosilyticum* (GARCIA-FRAILE et al, 2007), *R. daejeonense* (QUAN et al, 2005), *R. etli* (SEGOVIA et al, 1993), *R. galegae* (LINDSTROM ,1989) , *R. gallicum*, *R. giardinii*, (AMARGER et al, 1997) *R. hainanense*,(CHEN et al, 1997) *R. huakuii* (CHEN et al, 1991), *R. huautlense* (WANG et al, 1998), *R. indigoferae*, *R. larrymoorei*, *R. leguminosarum* (*R. l. bv. phaseoli* , *R. l. bv. trifolii*, *R. l. bv. viciae*), *R. loessense*, *R. lupini*, *R. lusitanum*, *R. mediterraneum*, *R. mongolense*, *R. phaseoli*, *R. radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. sullae*, *R. tainshanense*, *R. tropici*, *R. undicola*, *R. vitis*, *R. yanglingense*.

As análises da diversidade desses microrganismos têm revelado estreita relação filogenética entre bactérias que, aparentemente, não estariam relacionadas. Além disso, os novos estudos estão permitindo uma melhor compreensão dos mecanismos que atuam na evolução das bactérias simbióticas. De acordo com essa ampla diversidade de estirpes, vários grupos de pesquisa têm se empenhado na descoberta e tentativa de classificar tais microrganismos (MARTÍNEZ-ROMERO, 1994).

Descobertas recentes (ESTRADA DE LOS SANTOS et al, 2001) apontam bactérias do Gênero *Burkholderia* nodulando leguminosas. Essas bactérias pertencentes à classe das β -proteobacteria foram, inicialmente, encontradas em associação com plantas de milho e café e, de acordo com perfis de restrição e sequências do gene 16S rDNA, se apresentaram estreitamente relacionadas a espécies fixadoras de nitrogênio. A capacidade de fixar N_2 foi descrita somente para duas espécies: *B. vietnamiensis* (GILLIS et al., 1995) e *B. hururiensis* (ESTRADA DE LOS SANTOS et al., 2001). Contudo, Reis (2002) sugeriu *B. tropicalis* como sendo uma nova espécie simbiótica. Estes novos dados mostram que a capacidade de

fixação do nitrogênio em simbiose com as leguminosas é muito mais difundida entre as bactérias que se supunha até o presente. No Filo Beta Proteobacteria foi isolado o gênero *Ralstonia* (*R. taiwanensis*), a partir de nódulos de *Mimosa* spp., por Chen et al. (2001), enquanto Vandamme et al. (2002) reportaram o gênero *Burkholderia*, abrangendo quatro espécies (*B. tuberum*, *B. phymatum*, *B. caribensis*, *B. cepacia*) isoladas de cinco leguminosas tropicais. Tais descobertas indicam que a diversidade de procariotos capazes de estabelecer simbiose com leguminosas pode ser muito mais ampla que o previsto e certamente conduzirão a ganhos significativos no conhecimento sobre a origem e evolução da fixação biológica de nitrogênio, assim como sua manipulação pelo homem.

Com o avanço constante e progressivo das técnicas de biologia molecular e com as frequentes mudanças relatadas na taxonomia desses microrganismos, a identificação de novas espécies será mais fácil e rápida. É fundamental, portanto, estar atualizado com as novas correntes taxonômicas e atentar para o fato de que, certamente, a cada ano, novos gêneros e espécies são descritos ou reclassificados, seguindo uma tendência lógica, visto que se calcula conhecer somente 12% das espécies de bactérias. Atualmente, na definição de novas espécies, recomenda-se o uso da “taxonomia polifásica”, a qual procura integrar diferentes tipos de informações fenotípicas, genotípicas e filogenéticas dos microrganismos, buscando uma classificação de consenso (LAJUDIE et al., 1994; VANDAMME et al., 1996).

Nesta abordagem, uma árvore filogenética de 16S rDNA é a base para construir a classificação das bactérias e a validação multidimensional é feita examinando-se as várias características moleculares e fenotípicas dos organismos em questão. A referida metodologia é considerada a abordagem padrão na sistemática bacteriana moderna (BOONE et al, 2001).

O Subcomitê Internacional de Taxonomia de *Agrobacterium* e *Rhizobium* também adotou um sistema de classificação polifásica, no qual a descrição de novos gêneros ou espécies deve conter vários níveis de informações celulares como: desempenho simbiótico, características morfológicas e culturais, grau de homologia DNA: DNA, hibridização rRNA:DNA dentre outros parâmetros.

2.5. Técnicas moleculares utilizadas no estudo rizóbiano

Nos últimos anos a técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) ganhou impulso e esta sendo utilizada para a detecção e identificação de microrganismos em ambientes naturais. Descrita por Saiki et al. (1985), permite a amplificação de segmentos pequenos e específicos do DNA. É uma técnica pela qual se obtém “in vitro”, várias cópias de um segmento de DNA, previamente conhecido. Para se fazer a amplificação de certa seqüência de DNA é necessário primeiro, a extração do DNA, depois sua amplificação (PCR) com algum “primer” (oligonucleotídeo) ou iniciador em um termociclador (FUNGARO e VIEIRA, 1998).

A interpretação dos géis de eletroforese de PCR depende dos propósitos pelos quais se utiliza a técnica, por exemplo, em genética, a PCR pode ser utilizada para identificar e quantificar a variabilidade genética. Esta técnica oferece vantagens por ser rápida e versátil, possibilitando que um grande número de genótipos possa ser caracterizado em pouco tempo (YAMAOKA-YANO e VALARINI, 1998; FUNGARO e VIEIRA, 1998).

Em estudos de diversidade de microrganismos, a técnica de PCR é utilizada em várias metodologias como: a análise de restrição do DNA ribossômico amplificado (ARDRA – Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis), polimorfismo dos espaçadores (IGS – intergene sequences) do DNA ribossômico, DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis), PCR-SSCP (Single-Strand-Conformation Polymorphism), PCR de seqüências repetitivas de DNA (rep-PCR usando primers REP, ERIC ou BOX), PCR com primers randômicos (RAPD, AP-PCR) e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (STRALIOTTO e RUMJANEK, 1999).

A ARDRA (análise de restrição do DNA ribossomal amplificado), metodologia que consiste em análises combinadas de seqüências de DNA ribossomal amplificadas por PCR e digeridas com enzimas de restrição de corte freqüente (sítios de 4 pb) gerando padrões de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), tem sido extensivamente utilizada nos estudos de diversidade de rizóbio. Esta técnica foi inicialmente utilizada por Laguerre et al. (1994), sendo que a topologia das árvores filogenéticas obtidas por mapeamento dos sítios de restrição e por alinhamento de seqüências apresentou-se muito bem relacionada, mostrando

que o método é uma ferramenta poderosa para a estimativa rápida de relações filogenéticas (LINDSTRÖM et al., 1998).

A metodologia ARDRA foi aprimorada através da construção de uma base de dados de sítios de restrição nos genes que codificam para o gene ribossomal 16S na família Rhizobiaceae (LAGUERRE et al., 1997). Em rizóbio, sondas baseadas em diferentes genes, tanto ligadas a características simbióticas (*nod*, *fix*) ou não simbióticas (operons do DNA ribossomal e outras), têm sido utilizadas para detectar polimorfismos, com diferentes metodologias de marcação e detecção. Tais metodologias combinadas têm sido usadas para a caracterização da diversidade entre diferentes populações de rizóbio (LAGUERRE et al., 1992; THOMAS et al., 1994; PAFFETTI et al., 1996).

O valor do método do ARDRA está na sua rapidez e habilidade para avaliar diferenças entre grupos filogenéticos, possibilitando análises em vários níveis taxonômicos, inclusive em estudos de evolução, gerando novos marcadores para estudos de genética de populações (JORGENSEN e CLUSTER, 1989). Esta técnica utiliza enzimas de restrição para fragmentar o DNA em diferentes comprimentos, evidenciando o polimorfismo no comprimento dos fragmentos obtidos. Para a identificação desse polimorfismo, é necessário que as sequências de nucleotídeos, nas fitas de DNA dos organismos, sejam distintas (YAMAOKA-YANO e VALARINI, 1998).

Apesar de ser eficiente na identificação de microrganismos, a referida técnica possui custo elevado para uso rotineiro, por isso, outras técnicas são utilizadas para auxiliar na formação de um agrupamento inicial, de onde serão então escolhidas estirpes representativas para serem submetidas a uma análise por ARDRA. A técnica pode ser também utilizada para evidenciar polimorfismos resultantes do corte do DNA genômico com enzimas de restrição de corte raro (6 a 8 pb) gerando fragmentos de DNA grandes, cuja separação em gel só é possível pelo uso da técnica de eletroforese em campo pulsado (“pulsed-field gel electrophoresis”) (CORICH et al., 1991; SOBRAL et al., 1991; HAUKKA e LINDSTRÖM, 1994).

Os métodos de REP-PCR (Reação em cadeia da polimerase de sequências palindrômicas extragênicas repetitivas), ERIC – PCR (Reação em cadeia da polimerase de sequências de DNA entre sequências intergênicas consensuais repetitivas de enterobactérias) e BOX-PCR (Reação em cadeia da polimerase de

sequências de DNA entre os elementos BOX), baseiam-se na amplificação de sequências repetitivas (rep-elements) no genoma bacteriano (VERSALOVIC et al., 1994). Quando um destes elementos repetitivos é detectado dentro de uma distância amplificável durante a reação de polimerase em cadeia, um produto de PCR de tamanho característico é gerado, de modo que o genoma possa gerar padrão de polimorfismo, impressão digital (*fingerprinting*) em um gel (VERSALOVIC et al., 1991). O método é uma poderosa ferramenta para estudar a diversidade genética intraespecífica em nível de estirpe, fornecendo uma análise complementar à caracterização prévia por outras metodologias. A análise da impressão digital gerada a partir de genomas distintos tem sido usada para separação de estirpes muito proximamente relacionadas de *B. japonicum* (JUDD et al., 1993; VINUESA et al., 1998), *R. tropici* (VAN BERKUM et al., 1994), *R. leguminosarum* bv. *trifolii* (LEUNG e BOTTOMLEY, 1994), *R. galegae* (SELENSKA-POBELL et al., 1995) e *R. meliloti* (DE BRUIJN, 1992; ROSSBACH et al., 1995).

BOX-PCR reúne várias vantagens, uma vez que é uma técnica rápida, de execução fácil e altamente discriminatória para espécies, produzindo resultados que representam bem as análises baseadas na homologia DNA-DNA. Esta técnica vem sendo muito utilizada para avaliar diversidade genética de populações microbianas.

Desde o início deste século, os geneticistas têm utilizado recursos poderosos em estudos de biologia de populações e ecologia do comportamento, em especial os marcadores genéticos, para conhecer a estrutura dessas populações. O RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) é um dos marcadores moleculares derivados da técnica de PCR, que gera fragmentos únicos de DNA com um único oligonucleotídeo de sequência arbitrária (WILLIAMS et al., 1990). Esta técnica é uma das mais populares variações da PCR, pois apresenta vantagens em relação aos outros métodos, porque requer pequena quantidade de DNA, não necessitando ter informações sobre a sequência de nucleotídeos do genoma. Além disso, é capaz de revelar alto grau de marcas polimórficas, sendo um método rápido, além de processar grande número de microrganismos ao mesmo tempo (YAMAOKA-YANO e VALARINI, 1998).

O RAPD tem sido utilizado para caracterização de isolados de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, tanto com culturas puras, quanto com nódulos (DE BRUIJN, 1992;

HARRISON et al., 1992; JUDD et al., 1993; LOUREIRO, 1994; VERSALOVIC et al., 1994; SADOWSKY e MOAWAD, 1995).

Outra ferramenta de uso crescente na prática de identificação de bactérias é a amplificação de regiões específicas do genoma e posterior seqüenciamento de bases. A identificação é determinada pela comparação das sequências obtidas com a de outros organismos disponíveis no banco de dados da *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Em rizóbio, ocorrem problemas de concordância dos dados de homologia de DNA com os de seqüenciamento do 16S rDNA, havendo casos de muito baixa homologia de DNA dentro da mesma espécie. A explicação dada pelos autores é de que a hibridização do DNA envolve também o DNA presente em plasmídeos, que, no caso de algumas espécies de rizóbio, pode representar até 45% do genoma. Uma vez que este DNA extracromossomal provavelmente sofre mudanças muito mais rápidas do que o restante do genoma, pode estar contribuindo para a alta variabilidade, não congruente com os demais resultados de similaridade baseados em outros critérios (MARTÍNEZ-ROMERO, 1994).

As moléculas de DNA 16S e 23S presentes no ribossomo são comumente empregadas na taxonomia de procaríotos, por serem regiões conservadas e se enquadrarem nos conceitos que definem um marcador filogenético relatado por Piazza et al. (2006). A região 23S é bem maior do que a 16S, contendo mais informações genéticas úteis em estudos de filogenia (LUDWING et al. 1992), no entanto, o número de sequências presentes nos bancos de dados é pouco, limitando a comparação de novas sequências.

A caracterização da seqüência do gene ribossomal 16S rDNA tem sido amplamente utilizada em estudos evolucionários, taxonômicos e ecológicos, não apenas para definir taxas, mas também para detectar quais taxas estão presentes (FOX et al., 1992; OLSEN et al., 1994). A amplificação direta via PCR do 16S rDNA a partir de amostras de solo tornou possível o estudo da diversidade microbiana sem a necessidade de cultivar o microrganismo (WARD et al., 1990). Comparações entre as sequências de nucleotídeos completas ou parciais do 16S rDNA têm sido amplamente utilizadas para avaliar relações filogenéticas entre muitas espécies de *Rhizobium* (LAGUERRE et al. 1993; VAN BERKUM et al., 1996; BARRERA et al., 1997).

Muitas destas técnicas utilizam definições de agrupamento taxonômico que são a princípio, arbitrárias. No entanto, tem se desenvolvido uma nova forma que hoje é pré-requisito nos estudos de diversidade microbiana chamada *operational taxonomic units* (OTUs). Tal definição é clara, assim como cientificamente possível de validar universalmente os grupos taxonômicos. De acordo com Yang et al. (2004), quando a diversidade microbiana é inferida a partir de *fingerprints* moleculares ou de informações baseadas em sequências, as OTUs individuais devem ser definidas como espécies em potencial.

Para o agrupamento de estirpes de rizóbio, as análises de diversos parâmetros com várias espécies, mostraram que resultados mais confiáveis são obtidos pela utilização de dois a três métodos (LAGUERRE et al., 2001).

Os métodos que mostraram maior confiabilidade nas análises foram: o seqüenciamento, parcial ou total, do gene 16S rDNA, a amplificação do DNA com *primers* específicos pela PCR e a fragmentação do DNA pelas enzimas de restrição através da técnica de ARDRA (LAGUERRE et al., 2001). Portanto, para uma melhor confiabilidade dos dados, conclui-se que a análise polifásica é mais adequada (DUTTA e PAN, 2002).

Iniciada a 25 anos atrás, a chamada taxonomia polifásica, teve como objetivo a integração dos diferentes tipos de dados e informações (fenotípicas, genéticas e filogenéticas) sobre o microrganismo e essencialmente indica uma taxonomia de consenso (VANDAMME et al., 1996). O termo “taxonomia polifásica” foi utilizado pela primeira vez por Colwell (1970) e é usado para o delineamento de taxa em todos os níveis (MURRAY et al., 1990).

Os recentes desenvolvimentos na taxonomia polifásica, também chamada de classificação polifásica ou identificação polifásica, constituem um enorme avanço na moderna taxonomia bacteriana (VANDAMME et al., 1996).

Portanto, para que a FBN traga benefícios maiores para as leguminosas, entre elas o feijão-fava, é necessária a caracterização da diversidade das estirpes brasileiras em termos de classe taxonômica, através de análises envolvendo parâmetros morfológicos, fisiológicos e genéticos e, dentro dessa diversidade, a identificação das estirpes com maior capacidade de fixação de nitrogênio, maior competitividade e maior estabilidade genética (HUNGRIA et al., 1997).

REFERÊNCIAS

- AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 4, p. 996-1006, 1997.
- AZEVEDO, J. DE N.; FRANCO, L. J. D.; ARAÚJO, R. O. C. **Composição química de sete variedades de feijão-fava**. Teresina, 2003. 4p. (Embrapa Meio-Norte: Comunicado Técnico, 152).
- 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**, v.47, p.1086-1091, 1997.
- BAUDOIN, J. P. Genetic resources, domestication and evolution of lima bean, *Phaseolus lunatus*. In: Gepts, P. (ed.). **Genetic resources of Phaseolus bean**. Amsterdam: Kluwer Academic Publishers, p. 393-407, 1988.
- BOONE, D. R.; CASTENHOLZ, R. W.; GARRITY, G. M. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2. ed, Springer-Verlag, 2001.
- BROUGHTON, W. J.; ERNÁNDEZ, G.; BLAIR, M.; BEEBE, S.; GEPTS, P.; VANDERLEYDEN, J. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 252, n. 1, p. 55-128, 2003.
- BURRIS, R.H. Advances in biological nitrogen fixation. **Journal of Industrial of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, p.381-393, 1999.
- CASTINEIRAS, L. Variabilidad de la semilla de *Phaseolus lunatus* L. en Cuba. **Revista del Jardin Botanico Nacional**. v.12, p.109-114, 1991.

CHEN, W. X.; LI, G. S.; QI, Y. L.; WANG, E. T.; YUAN, H. L.; LI, J. L. *Rhizobium huakuii* sp. nov. Isolated from the Root Nodules of *Astragalus sinicus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, v.41, n. 2, p. 275-280, 1991.

CHEN, W. X.; TAN, Z. Y.; GAO, J. L.; LI, Y.; WANG, E. T. *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, v. 47, n. 3, 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**, v.45, p.393-397, 1998.

CHEN, W. M. et al. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of Mimosa species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, v. 51, n. 5, p. 1729-1735, 2001.

CHEN, W. X.; WANG, E. T.; KUYKENDALL, L. D. Genus *Mesorhizobium*, Family Photobacteriaceae. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, George Garrity (Ed.), **Springer-Verlag**, 2 ed., v. 2, p. 403-408. 2005.

COLWELL, R.R. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. **Journal of Bacteriology**, v.104, p.410-433, 1970.

CORICH, V.; GIACOMINI, A.; OLLERO, F. J.; SQUARTINI, A.; NUTI, M. F. Pulsedfield electrophoresis in counter-clamped homogeneous electric fields (CHEF) for fingerprinting of *Rhizobium* spp. **FEMS Microbiology Letters**, v. 83, p. 193- 198, 1991.

COUTINHO, H.L.C. 2003. **Biodiversidade: perspectivas e oportunidades biotecnológicas.** Disponível em <http://www.bdtfat.org.br/publicações/padct/bio/cap9/1/> Acesso em 10 de novembro de 2009.

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

CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E. V.; MOSTASSO, R. J.; PEDROSA, F. O. & HUNGRIA, M. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no seqüenciamento do gene 16S rRNA. **R. Bras. Ci. Solo**, v. 27, p.833-840, 2003.

De BRUIJN, F. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.2180-2187, 1992.

DE VOS, P.; TRÜPER, H.G.; TINDALL, B. J. Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes Xth International (IUMS) Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. Minutes of the meetings, 28, 29 and 31 July and 1 August 2002, Paris, France. **International Journal Systematics Evol. Microbiology**, v. 55, p. 525-532, 2005.

DENISON, R. F.; HARTER, B. Nitrate Effects on Nodule Oxygen Permeability and Leghemoglobin. **Plant Physiol.** v. 107, p. 1355-1364, 1995.

DREYFUS, B.; GARCIA, J.L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov, a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.38, p.89-98, 1988.

DUPUY, N.C. & DREYFUS, B.L. *Bradyrhizobium* populations occur in deep soil under the leguminous tree *Acacia albida*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.2415-2419, 1992.

DUTTA, C.; PAN, A. Horizontal gene transfer and bacterial diversity. **Journal of Biosciences**, v. 27, p. 27-33, 2002.

ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLEROMELLADO, J. *Burkholderia*, a Genus Rich in Plant-Associated Nitrogen Fixers with Wide Environmental and Geographic Distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 2790-2798, 2001.

EUZÉBY, J. P.; KURO, T. Corrigenda to the Validation Lists. **International Journal Systematics Evol. Microbiology**, v. 51, p. 1933-1938, 2001.

FOX, G. E.; WISOTZKEY, J. D.; JURTSCHUK J. R. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, p. 166- 170, 1992.

FUNGARO, M.H.P. & VIEIRA, M.L.C. Aplicações da PCR em ecologia molecular. In: MELO, I.S. & AZEVEDO, J.L. (Ed.) **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998, p.205-225.

GARCIA-FRAILE, P.; RIVAS, R.; WILLEMS, A.; MARTENS, A. P. M.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; MATEOS, P. F. Pedro F.; VELAZQUEZ, E. *Rhizobium cellulosityticum* sp. nov., isolated from sawdust of Populus Alba. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p.844–848, 2007.

GILLIS, M.; VAN, T., V.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HEBBAR, P.; WILLEMS, A.; SEGERS, P.; KERSTERS, K.; HEULIN, T.; FERNANDEZ, M., P. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. **Int. Journal Systematic of Bacteriology**, v.45, p.274-289, 1995.

GRANGE, L. & HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil Biology & Biochemistry**, v.36, p.1389-1398, 2004.

GRIN - **Germplasm Resources Information Network**. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. Disponível em: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/tax_search.pl?language=pt>. 12 jan 2010.

HARRISON, P.; MYTTON, L.R.; SKOT, L.; DYE, M.; CRESSWELL, A. Characterization of *Rhizobium* isolates by amplification of DNA polymorphisms using random primers. **Canadian Journal of Microbiology**, v.38, p.1009-1015, 1992.

HAUKKA, K.; LIDSTRÖM, K. Pulsed-field electrophoresis for genotypic comparison of *Rhizobium* bacteria that nodulate leguminous trees. **FEMS Microbiology Letters**, v. 119, p. 215-220, 1994.

HUNGRIA, M. & STACEY, G. Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: basic aspects and potential application in agriculture. **Soil Biology and Biochemistry**, v.19, p.819-830, 1997.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção agrícola municipal. Culturas temporárias e permanentes**. Rio de Janeiro, v.57, p.57, tabela 2, 2008.

JARVIS, B.D.W.; PANKHURST, C.E.; PATEL, J.J. *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. **International Journal of Bacteriology**, v.32, p.378-380, 1982.

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

JORGENSEN, R.A.; CLUSTER, P.D. Modes and temps in the evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. **Annual Missouri Botanical Garden**, v. 75, p.1238-1247, 1989.

JUDD, A.K.; SCHNEIDER, M.; SADOWSKY, M.J.; DE BRUIJN, F.J. Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* Serocluster 123 strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.1702-1708, 1993.

KÄMPFER, P.; NEEF, A.; SALKINOJA-SALONEN, M. S.; BUSSE, H. J. *Chelatobacter heintzii* (Auling *et al.* 1993) is a later subjective synonym of *Aminobacter aminovorans* (Urakami *et al.* 1992). **International Journal Systematics Evol. Microbiology**, v. 52, p. 835-839, 2002.

KUYKENDALL, L. D. **Genus Azorhizobium**. In Brenner, Krieg, Staley and Garrity (Editors), The Alpha-, Beta-, Delta- and Epsilon proteobacteria, The Proteobacteria, Part C, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Springer, v. 2, n. 2, p. 505-506, 2005a.

KUYKENDALL, L. D. **Genus Bradyrhizobium, family Bradyrhizobiaceae**. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, George Garrity (Ed.), Springer-Verlag, 2 ed., v. 2, p. 438-443, 2005b.

KUYKENDALL, L. D.; DAZZO, F. B. **Genus *Allorhizobium***. In Brenner, Krieg, Staley and Garrity (Editors), The Alpha-, Beta-, Delta- and Epsilon proteobacteria, The Proteobacteria, Part C, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Springer, v. 2, n. 2, p. 345-346, 2005.

KUYKENDALL, L. D.; YOUNG, J. M.; MARTINEZ-ROMERO, E.; KERR, A.; SAWADA, H. **Genus *Rhizobium*, a highly divergent genus in a revised family, the Rhizobiaceae**. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, George Garrity (Ed.), Springer, 2 ed., v. 2, p. 324-340. 2005.

LAGUERRE, G.; MAZURIER, S.I.; AMARGER, N. Plasmid profiles and restriction length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in field populations. **Microbiology Ecology**, v.101, p.17-26, 1992.

LAGUERRE, G.; FERNANDEZ, M.P.; EDEL, V.; NORMAND, P.; AMARGER, N. Genomic heterogeneity among French *Rhizobium* strains isolated from *Phaseolus Vulgaris* L. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.43, p.761-767, 1993.

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**, v.60, p.56-63, 1994.

LAGUERRE, G.; van BERKUM, P.; AMARGER, N.; PRÉVOST, D. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, p.4748- 4758, 1997.

LAGUERRE, G.; NOUR, S.M.; MACHERET, V.; SANJUAN, J.; DROUIN, P.; AMARGER, N. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris*. **Symbionts. Microbiology**, v.147, p.981-993, 2001.

LAJUDIE, P. ; LORTET, G.; NEYRA, M.; BADJI, S.; NDOYE, I.; BOIVIN, C.; GILLIS, M.; DREYFUS, B. Etude taxonomique des *Rhizobium* sp. d'Acacia et des Sesbania. **Interactions Plantes Microorganismes**. IFS/ORSTOM, p.238-245, 1992.

LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK D.; MAESTROJUAN, G.; NEYRA, M.; COLLINS M.D.; DREYFUS B.; KERSTERS K.; GILLIS M. Polyphasic

taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. Nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. **International Journal of Bacteriology** , v.44, p.715-733, 1994.

LAJUDIE, P.; LAURENTE-FULELE, E.; WILLEMS, A.; TORCK, U.; COOPMAN, R.; COLLIMS, M.D.; KERSTERN, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixation bacteria nodulate *Neptunia natans* in Senegal. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.58, p.1277-1290, 1998.

LEUNG, K.; BOTTOMLEY, P.J. Growth and nodulation characteristics of subclover (*Trifolium subterraneum* L.) and *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii at different water potentials. **Soil and Biology Biochemistry**, v.26, p.805-812, 1994.

LEWIS, G.P.; SCHRIRE, B.D.; MACKINDER, B.A.; LOCK, J.M. **Legumes of the world**, Royal Botanic Gardens, Kew, United Kingdom, 2003.

LINDSTROM, K. *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. **Internacional Journal of Systematic Bacteriology**, v. 39, p. 365-367, 1989.

LINDSTRÖM, K.; van BERKUM, P.; GILLIS, M.; MARTÍNEZ, E.; NOVIKOVA, N.; JARVIS, B. Report from the roundtable on *Rhizobium* taxonomy. In: TIKHONOVICH, I.A.; PROVOROV, N.A.; ROMANOV, V.I.; NEWTON, W.E. (Ed.) **Nitrogen fixation: fundamentals and applications**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 807-810, 1995.

LINDSTRÖM, K.; LAGUERRE, G.; NORMAND, P.; RASMUSSEN, U.; HEULIN, T.; JARVIS, B.D.W.; de LAJUDIE, P.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; CHEN, W.X. Taxonomy and phylogeny of diazotrophs. In: ELMERICH, C.; KONDOROSI, A.; NEWTON, W.E. (Ed.) **Biological nitrogen fixation for the 21st century - Proceedings of the 11th International Congress on Nitrogen Fixation**. Institut Pasteur, Paris, França, July 20- 25, 1997. Dordrecht: Kluwer, p. 559-570. 1998.

LOUREIRO, M.F. Caracterização das estirpes por técnicas moleculares: o uso dos métodos de PCR e RAPD. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. (Ed.) **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994, p.183-199.

LUDWING, W. et al. Complete 23S ribosomal RNA sequences of gram-positive bacteria with a low DNA G+C content. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 15, p. 487-501, 1992.

LYMMAN, J.M. Adaptation studies on *lima bean* accessions in Colombia. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 108, n.3, p. 369-373, 1983.

MARTENS, M.; DAWYNDT, P.; COOPMAN, R.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; WILLEMS, A. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). **International Journal Systematics Evol. Microbiology**, v. 58, p. 200–214, 2008.

MARTÍNEZ-ROMERO, E. Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.161, p.11-20, 1994.

MOREIRA, F. M. M.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Editora da UFLA, 2006, 726 p.

MOSTASSO, L.; MOSTASSO, F., L.; VARGAS, M., A., T.; HUNGRIA, M. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, v. 73, n. 2, p. 121–132, 2002.

MURRAY, R. G. E.; BRENNER, D. J.; COLWELL, R. R.; De VOS, P.; COODFELLOW, M.; GRIMONT, P. A. D.; PFENING, N.; STACKEBRANDT, E.; ZAVARSIN, G. A. Report of the ad hoc committee on approaches to taxonomy within the Proteobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 40, p. 213-215, 1990.

MYLONA, P.; PAWLOWSKI, K. & BISSELING, T. Symbiotic nitrogen fixation. **The Plant Cell**, v.7, p.869-885, 1995.

NEVES, M. C. P. & RUMJANEK, G. **Ecologia de Bactérias Diazotróficas de Solos Tropicais**. In: Ecologia Microbiana. Eds. Melo, I. S.; Azevedo, J. L., Jaguariúna, EMBRAPA – CNPMA. 1998. p. 15-60.

NOGUEIRA, C. O. N. Eficiência Agronômica de Rizóbios Seleccionados e diversidade das Populações Nativas que Nodulam o Feijoeiro-comum em Formiga- MG. 2005.

84p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

NOUR, S.M.; FERNANDEZ, M.; NORMAND, P.; CLEYET-MAREL, J.C. *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.44, p.511-522, 1994.

OLIVEIRA, A.P. DE; ALVES, E.U.; ALVES, A.U.; DORNELAS, C.S.M.; SILVA, J.A. DA; PORTO, M.L.; ALVES, A.V. Produção de feijão-fava em função do uso de doses de fósforo em um Neossolo Regolítico. **Horticultura Brasileira**, v.22, n.3, p.543-546, 2004.

OLSEN, G. J.; WOESE, C. R.; OVERBEEK, R. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. **Journal of Bacteriology**, v. 176, p. 1-6, 1994.

PAFFETTI, D.; SCOTTI, C.; GNOCCHI, S.; FANCELLI, S.; BAZZICALUPO, M. Genetic diversity of an Italian *Rhizobium meliloti* population from different *Medicago sativa* varieties. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.2279- 2285, 1996.

PIAZA, G. **Identificação molecular de bactérias de solo cultivado de Campo Belo do Sul (SC) capazes de nodular feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 2006. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

PIÑERO, D.; MARTÍNEZ, E.; SELANDER, R.K. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.2825-2832, 1988.

QUAN, Z. X.; BAE, H.S.; BAEK, J.H.; CHEN, W. F.; TAEK, W.; LEE, S. T. *Rhizobium daejeonense* sp. nov. isolated from a cyanide treatment bioreactor. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p.2543–2549, 2005.

REIS, V.M. Ecology of diazotrophic bacteria other than rhizobia. In: XXI REUNIÓN LATINOAMERICANA DE RHIZOBIOLOGÍA. VI CONGRESO NACIONAL DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO, 2002. **Resumos**. Cocoyoc, Morelos, México, 2002, p.42.

ROSSBACH, S.; RASUL, G.; SCHNEIDER, M; EARDLEY, B.; de BRUIJN, F.J. Structural and functional conservation of the Rhizopine catabolism (moc) locus limited to selected *Rhizobium meliloti* strains and unrelated to their geographical origin. **Molecular Plant Microbe Interactions**, v.8, p.549-559, 1995.

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

SADOWSKY, M.J.; MOAWAD, H.A. The use of rep-PCR DNA fingerprinting to examine competition for nodulation among genetically-related *Bradyrhizobium japonicum*. In: TIKHONOVICH, I.A.; PROVOROV, V.A.; ROMANOV, V.I.; NEWTON, W.E. (Ed.) Nitrogen fixation: Fundamental and applications. Dordrecht: **Kluwer Academic Publishers**, 1995, p.673.

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v.230, p.1350-1354, 1985.

SANTOS, C. E. R. S. ; STAMFORD, N. P. ; FREITAS, A. D. S.; NEVES, M. C. P. ; RUMJANEK, N. G.; SOUTO, S. M. Efetividade de rizóbios isolados de solos da região noredeste do Brasil, na fixação do N₂ em amendoim (*Arachis hypogaea*). **Acta Scientiarum**, v. 27, n. 1, p. 305-312, 2005.

SANTOS, C. E. R. S.; FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, I. M. M. B.; COLAÇO, W. Fixação simbiótica do N₂ em leguminosas tropicais. In: FIGUEIREDO, M. V. B et al (Orgs.). **Microrganismos e Agrobiodiversidade: o novo desafio para agricultura**, Guaíba: Agrolivros, 2008. P. 17-41.

SANTOS, D.; CORLETT, F.M.F.; MENDES, J.E.M.F.; WANDERLEY JÚNIOR, J. S. A. Produtividade e morfologia de vagens e sementes de variedades de fava no Estado da Paraíba. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 10, p. 1407-1412, 2002.

SAUER, J.D. **Historical geography of crop plants – a select roster**. CRC Press, Boca Raton, Florida. 1993. Disponível em : <[http:// www.museums.org.za](http://www.museums.org.za)>, acesso 12 de Janeiro de 2010.

SAWADA, H.; KUYKENDALL, L. D.; YOUNG, J. M. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. **Journal Genetic Applied Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 79-155, 2003.

SEGOVIA, L., YOUNG, J. P. W.; MARTÍNEZ-ROMERO. E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. **Internacional Journal of Systematic Bacteriology**, v.43, p.374-377, 1993.

SELENSKA-POBELL, S.; GIGOVA, L.; PETROVA, N. Strain-specific fingerprints of *Rhizobium galegae* generated by PCR with arbitrary and repetitive primers. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 79, p. 425-431, 1995.

SESSITSCH, A.; HOWIESON, J. G.; PERRET, X.; ANTOUN, H.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Advances in *Rhizobium* Research. **Crit Rev Plant Sci**, v.21, p.323-378, 2002.

SETUBAL, J. C. et al. "The Genomics of Agrobacterium: Insights into its Pathogenicity, Biocontrol, and Evolution". **Plant Pathogenic Bacteria: Genomics and Molecular Biology**. Caister Academic Press, 2009.

SKERMAN, V.B.D.; MCGOWAN, V.; SNEATH, P.H.A. Approved lists of bacterial names. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.30, p.225-420, 1980.

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

SOARES, A. L. L.; PEREIRA, J. P. A. R.; FERREIRA, P. A. A.; VALE, H. M. M.; LIMA, A. S.; ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA, F. M. S. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em perdões (MG). I – caupi. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, n. 5, p. 795-802, 2006.

SOARES, A. L. L.; FERREIRA, P. A. A.; PEREIRA, J. P. A. R.; VALE, H. M. M.; LIMA, A. S.; ANDRADE, M. J. B.; MOREIRA, F. M. S. Eficiência agronômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em perdões (MG). II – caupi. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, n. 5, p. 803-811, 2006 b.

SOBRAL, B.W.S.; HONEYCUTT, R.J.; ATHERLY, A.G. The genomes of the family Rhizobiaceae: size, stability, and rarely cutting restriction endonucleases. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 704-709, 1991.

SPRENT, J. I.; SPRENT, P. **Nitrogen fixing organisms: pure and applied aspects**, 2. ed. University Press, Cambridge. 1990. p. 256.

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N. G. **Aplicação e Evolução dos Métodos Moleculares para o Estudo da Biodiversidade do Rizóbio**. Seropédica, 1999, 58p. (Embrapa Agrobiologia: Documento 93).

STRALIOTTO, R.; TEIXEIRA, M. G. **Variabilidade Genética do Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.L): aplicações nos estudos das interações simbióticas e patogênicas**. Seropédica, 2000, 59p. (Embrapa Agrobiologia: Documento 126).

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

TAÍZ, L.; ZIEGER, E. **Fisiologia vegetal**. Trad. SANTARÉM, E.R. et al., 3° ed., Porto Alegre: Artemed, 2004, p.719.

TEREFEWOR, Z., LORTET, G., SUOMINEN, L. AND LINDSTRÖM, K. **Molecular evolution of interactions between rhizobia and their legume hosts**. In.: TRIPLETT, E.W. Prokaryotic nitrogen fixation. Wymondham: Horizon Scientific Press, 2000, p.187-206.

THOMAS, P.M.; GOLLY, K.F.; ZYSKIND, J.W.; VIRGINIA, R. A. Variation of clonal, mesquite-associated rhizobial and bradyrhizobial populations from surface and deep soils by symbiotic gene region restriction fragment length polymorphism and plasmid profile analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.1146-1153, 1994.

VAN BERKUN, P.; NAVARRO, R.B.; VARGAS, A.A.T. Classification of the uptake hydrogenase-positive (Hup+) bean rhizobia as *Rhizobium tropici*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.554-561, 1994.

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**, v. 46, p. 240-244, 1996.

VANCE, C.P. Legume symbiotic nitrogen fixation: agronomic aspects. In: Spaink HP (Ed) The Rhizobiaceae. **Kluwer Academic Publishers**: Dordrecht, p. 509-530, 1998.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; De VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, v. 60, p. 407-438, 1996.

VANDAMME, P. et al. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 507-512, 2002.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 6923-6831, 1991.

VERSALOVIC, J.; SCNEIDER, M.; De BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cell Biology**, v.5, p.25-40, 1994.

VIEIRA, C. Leguminosas de grãos: importância econômica na agricultura e na alimentação humana. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte. v.16, n.174, p.5-11, 1992.

VIEIRA, R.F. A cultura do feijão-fava. **Informe Agropecuário**, v.16, n.174, p.30-37, 1992.

VINUESA, P.; RADEMAKER, J.L.W.; De BRUIJN, F.J.; WERNER, D. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic

palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.2096-2104, 1998.

WANG, E. T.; BERKUM, P. V.; BEYENE, D.; SUI, X. H.; DORADO, O.; CHEN, W. X.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, n. 3, p. 687–699, 1998.

WARD, D. M.; WLLER, R.; BATESON, M. M. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. **Nature**, v. 345, p. 63-65, 1990.

WEON, H. Y.; LEE, C. M.; HONG, S. B.; KIM, B. Y.; YOO, S. H.; KWON, S. W.; GO, S. J. *Kaistia soli* sp. nov., isolated from a wetland in Korea. **International Journal Systematics Evol. Microbiology**, v. 58, p. 1522-1524, 2008.

WILLEMS, A. The taxonomy of rhizobia: an overview. **Pant and Soil**, v.287, n.1, p.3-14, 2006.

WILLIAMS, G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K.L; RAFALSKI, J. A.; TIGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.18, p.6531-6535, 1990.

YAGUIU, A.; MACHADO-NETO, N.B.; CARDOSO, V.J.M. Grouping of Brazilian accesses of lima beans (*Phaseolus lunatus* L.) according to SDS-PAGE patterns and morfological characters. **Acta Scientarum Agronomy**, v. 25, n. 1, p. 7-12, 2003.

YAMAOKA-YANO, D.M.; VALARINI, P.J. **Métodos de identificação de bactérias**. In: MELO, I.S. & AZEVEDO, J.L. (Ed.) Ecologia microbiana. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998, p.369-389.

YANG, H. H.; VINOPAL, R. T.; GRASSO, D.; SMETS, B. F. High diversity among environmental *Escherichia coli* isolates from a bovine feedlot. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.1528-1536, 2004.

ZIMMERMANN, M.J.O; TEIXEIRA, M.G. Origem e evolução. In: ARAÚJO, R.S.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J.O. eds. **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato (POTAFOS), p.57-70, 1996.

4. CAPÍTULO I

Diversidade genética de isolados de rizóbios nativos em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) do Piauí¹

Genetic diversity of strains of rhizobia in lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) Piauí¹

Jadson Emanuel Lopes Antunes² Regina Lucia Ferreira Gomes³ Ângela Celis de Almeida Lopes⁴ Ademir Sérgio Ferreira de Araújo⁵ Márcia do Vale Barreto Figueiredo⁶ Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra^{*7}

RESUMO

Em geral, os solos brasileiros apresentam uma relevante população de rizóbios com a capacidade de nodular e fixar nitrogênio em simbiose com várias leguminosas e entre estas, o feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). Contudo, a diversidade das bactérias capazes de nodularem o feijão-fava é pouca conhecida. O presente trabalho teve como objetivo estudar a variabilidade genética de bactérias isoladas do feijão-fava, por meio de caracterizações genéticas baseada na técnica de rep-PCR,

¹ Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA), Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal do Piauí (UFPI).

² Mestrando do PPGA da Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, s/n, Bairro Ininga, 64049-550, Teresina, PI, Brasil. jadsonmanuel@gmail.com

³ Departamento de Fitotecnia, CCA, UFPI, Teresina, PI, Brasil.

⁴ Departamento de Biologia, Centro de Ciências da Natureza (CCN), UFPI, Teresina, PI, Brasil.

⁵ Departamento de Engenharia Agrícola e Solos. CCA, UFPI, Teresina, PI, Brasil.

⁶ Laboratório de Biologia do Solo, Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA) / CARHP. Av. San Martin, 1331, CEP: 50761-000, Bonji, Recife, PE. Bolsista de Produtividade de Pesquisa do CNPq.

^{*7} Laboratório de Genômica, Instituto Agronômico de Pernambuco. mccatanho@gmail.com

utilizando os oligonucleotídeos BOX-REP-ERIC. Os 50 isolados foram capturados no feijão-fava, como planta isca, e como padrões de comparações foram utilizadas seis estirpes de referência. A extração do DNA dos isolados foi realizada com o kit Purelink Genomic DNA Kits da Invitrogen. Pelas análises dos perfis de DNA após amplificação, foi verificado que os oligonucleotídeos BOX e REP apresentaram maior grau de polimorfismo que o ERIC. O uso dos oligonucleotídeos REP-1 e REP-2 geraram perfis eletroforético de similaridade em torno de 55%. Com os oligonucleotídeos ERIC-1 e ERIC-2, gerou-se perfis eletroforéticos de 56% de similaridade para a maioria dos isolados. Pela análise de BOX, observou-se um complexo agrupamento entre os isolados e as estirpes de referência. Os perfis obtidos pela amplificação do gene 16S rDNA – referência na taxonomia atual de procariotos, seguido pela digestão com as endonucleases *Ddel*, *HhaI* e *MspI* na técnica de ARDRA, resultaram na formação de no máximo três agrupamento para a endonuclease *Ddel*. A endonuclease *HhaI* apresentou menor poder de discriminação entre os isolados. Os gêneros dos isolados consistiram em: 28% de *Bradyrhizobium*, 24% de *Rhizobium*, 20% *Ensifer*, 14% *Burkholderia*, 10% *Sinorhizobium*, 2% *Leifsonia* e 2% *Beijerinckia*. Observou-se uma complexa diversidade genética entre os isolados assim como nas estirpes de referência.

Palavras-chave: 16S rDNA, fixação biológica do nitrogênio, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Burkholderia*.

ABSTRACT

In general, the Brazilian soils have a significant population of established rhizobia with the capacity to nodulate and fix nitrogen in symbiosis with various legumes and among these the lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). So, the diversity of these bacteria able to nodulate lima bean is little known. This work aimed to study the genetic variability of bacteria isolated from lima bean through genetic characterizations based on the technique of rep-PCR using primers BOX-REP-ERIC. The 50 isolates were captured using the lima bean plant as bait and as standards of comparison were used six reference strains. The extraction of DNA from the isolates was performed using the kit Purelink Genomic DNA kits from Invitrogen. For the analysis of DNA profiles after amplification was verified that the BOX and REP primers showed higher

degree of polymorphism that the ERIC. The use of the primers REP-1 and REP-2 electrophoretic profiles generated similarity around 55%. Using the primers ERIC-1 and ERIC-2, was observed to generate electrophoretic profiles of 56% similarity to most isolates. By analysis of BOX observed a complex grouping among isolates and reference strains. The profiles obtained by amplification of 16S rDNA - a reference on the current taxonomy of prokaryotes, followed by digestion with endonucleases *Ddel*, *HhaI* and *MspI* ARDRA technique resulted in the formation of a maximum of three grouping for the endonuclease *Ddel*. The endonuclease *HhaI* showed lower power of discrimination among isolates. The genera of the isolates were: 28% of *Bradyrhizobium*, 24% *Rhizobium*, 20% *Ensifera*, 14% *Burkholderia*, 10% *Sinorhizobium*, 2% *Leifsonia* and 2% *Beijerinckia*. We observed a complex genetic diversity among the isolates and reference strains.

Keywords: 16S rDNA, biological nitrogen fixation, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Burkholderia*.

INTRODUÇÃO

O feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.), também conhecido como fava, feijão-de-lima ou fava-de-lima, é uma das quatro espécies do gênero *Phaseolus* explorada comercialmente, cultivada em muitos países tropicais, por ser considerada mais tolerante à seca, ao excesso de umidade e ao calor que o feijão comum (Vieira, 1992). A cultura, que atinge relativa importância econômica em alguns estados brasileiros (Santos et al., 2002), apresenta potencial para o fornecimento de proteína vegetal à população, funcionando como uma fonte alternativa de alimento em vários municípios do Nordeste, juntamente com o feijão-caupi, milho e mandioca, diminuindo a dependência quase exclusiva dos feijões do grupo carioca (Vieira, 1992).

A fava, por ser uma leguminosa, associa-se simbioticamente com bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Allorhizobium*, coletivamente chamadas de rizóbios, que nódulam as raízes, fornecendo à bactéria fotossintatos e recebendo, em troca, produtos nitrogenados (Boivin et al., 1997). Esta simbiose representa o sistema fixador de

nitrogênio de maior importância para a agricultura e, por isso, os rizóbios têm sido, dentre microrganismos diazotróficos, os mais estudados (Neves & Rumjanek, 1996). Além da importância econômica da fixação biológica de nitrogênio, ressalta-se sua importância ecológica, pois essa simbiose permite que leguminosas colonizem áreas pobres em nitrogênio, que serão enriquecidas pela transferência do nitrogênio atmosférico para o solo (Ladha et al., 1992).

A fixação biológica de nitrogênio é mediada por ampla gama de microrganismos procaríotos com substancial diversidade morfológica, fisiológica, genética, bioquímica e filogenética. Tal diversidade garante a ocorrência desse processo nos mais diferentes habitats terrestres. Contudo, apesar de sua grande importância na manutenção da biosfera, estima-se que menos de 1% dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos (Moreira & Siqueira, 2002).

O feijão-fava é nodulado por grupos de rizóbios de crescimento rápido e lento. Estudos sobre a simbiose nessa espécie mostram uma grande diversidade genética entre os simbiossomas em algumas áreas geográficas do mundo, principalmente na América Latina (Triplett et al., 1981; Thies et al., 1991; Ormeño et al., 2007; Ormeño-Orrillo et al., 2006; Santos, 2008). No centro da diversidade do feijão-fava, localizado no Peru, foram conduzidos alguns estudos com o objetivo de caracterizar a diversidade dos rizóbios simbiossomas (Ormeño-Orrillo et al., 2006, 2007).

O acesso à diversidade genética das bactérias fixadoras de nitrogênio é fundamental para os estudos relacionados à variabilidade e à distribuição ecológica desses microrganismos. O uso de técnicas moleculares tem estimulado o desenvolvimento de métodos simples e rápidos para a caracterização de populações microbianas, inclusive para estudos em nível de gênero, espécie e até mesmo estirpe (Schneider & De Bruijn, 1996). A técnica de amplificação de sequências específicas de DNA, pela reação em cadeia da polimerase (PCR), vem sendo bastante utilizada em estudos filogenéticos (Eardly et al., 1992; Ueda et al., 1995) e para detecção, identificação e caracterização de estirpes de rizóbio (Harrison et al., 1992; Laguerre et al., 1994; Watson et al., 1995).

A técnica PCR (polymerase chain reaction, reação em cadeia da polimerase) pode ser executada utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores arbitrários ou complementares a determinada sequência do genoma bacteriano. Em uma variação

dessa técnica, baseada na utilização de oligonucleotídeos iniciadores, as principais famílias destes elementos são três: as sequências REP (Repetitive Extragenic Palindromic) (35-40 pb), ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) (124-127 pb) e BOX: boxA (54 pb), boxB (43 pb) e boxC (50 pb). Apesar da existência de três elementos na subunidade BOX apenas a subunidade boxA parece ser altamente conservada em bactérias (Koeuth et al., 1995). Segundo (van Berkum, 1999), acredita-se que estas regiões por estarem associadas a graus elevados de polimorfismos, tenham uma participação em processos de evolução adaptativa, mediando a interação dos microrganismos com ambientes inóspitos ou adverso. A subunidade boxA do BOX pode ser amplificada com um único *primer*, se somente se, as repetições estiverem distribuídas no genoma em orientação invertida para gerar polimorfismo de DNA. Os elementos BOX foram, inicialmente, identificados em microrganismos Gram-positivos e depois usados para tipagem em espécies Gram-negativas (Martin et al., 1992, Hungria et al, 2008) .

Outra técnica largamente usada para filogenia rizobiana é o sequenciamento do gene 16S rDNA, que segundo Young et al. (2001), no gênero *Rhizobium* tem conseguido resultados satisfatórios e que na ausência de características fenotípicas claras, vem sendo uma proposta bastante aceita para esta família e para os grupos vizinhos em α -proteobactérias. De acordo com Vinuesa et al. (2005) e Martens et al. (2007), o gene 16S rDNA usado para filogenia, que vem sendo considerado originalmente como um bom modelo para microrganismos, podem ocasionalmente sofrer transferência lateral e recombinação genética resultando em sequências mosaicas.

A classificação de bactérias é uma necessidade atual, para que novas espécies sejam identificadas e que as antigas sejam revistas através de novas e modernas abordagens experimentais de biologia molecular.

O presente trabalho teve como objetivo estudar a variabilidade genética de bactérias isoladas do feijão-fava, cultivado em solos de áreas representativas de regiões produtoras do Piauí, por meio de caracterizações genéticas baseada na técnica de BOX-REP-ERIC PCR.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Gênomica do Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA, de abril a agosto de 2009. Os 50 isolados foram obtidos de nódulos de feijão-fava, usado como planta isca, em amostras de solo coletadas em regiões produtoras de feijão-fava do Piauí (Tabela 1). Como referências, foram utilizadas seis estirpes provenientes do Banco de Germoplasma de rizóbio da EMBRAPA-Agrobiologia, que se encontravam armazenadas no Laboratório de Gênomica do IPA, sendo elas: ER1 – *Rhizobium* sp NGR234; ER2 – *Mesorhizobium mediterraneanus* BR 523; ER3 – *R. etli* CFN42; ER4 – *Ensifer fredii* USDA205; ER5 – *Bradyrhizobium japonicum* BR111 e ER6 – *R. tropici* CIAT899).

Para a extração do DNA genômico, as bactérias foram cultivadas em 5,0mL do meio de cultura TY líquido (Beringer, 1974) e incubadas a 28°C, em shaker, a 200rpm por 48h. Após esse período, uma alíquota de 1,0mL da suspensão de células foi transferida para microtubos de 1,5mL, sendo centrifugados por 3 min a 13.000 rpm. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e com o precipitado foi realizado a extração do DNA, utilizando-se o Kit Purelink Genomic DNA (Invitrogen), conforme recomendação do fabricante. Após a extração, a pureza e a integridade do DNA foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 0,8%.

As amostras de DNA genômico foram diluídas com água milli-Q estéril, a 1:500 (20 a 40 ng), depois armazenadas a -20°C. Para amplificação do elemento BOXA, foi usado o *primer* BOX-A1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') sintetizado pela Invitrogen™ (Life Technologies) (Versalovic et al., 1994). A reação de amplificação com volume final de 10,0µL foi a seguinte: 5,0µL GoTaq Colorlles Master Mix (Promega), 1,0µM de *primer*, 2,0µL de água milli-Q estéril e 2,0µL do DNA diluído. As condições de amplificação foram às seguintes: um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 7 min., 35 ciclos de desnaturação (1 min., a 94 °C), anelamento (1 min., a 55°C) e extensão (8 min., a 65°C), um ciclo de extensão final a 72°C por 16 min (Freitas et al, 2007).

Para a análise de REP-PCR, foram usados os oligonucleotídeos REP-1 (5'-IIICGICGICATCIGGC-3') e REP-2 (5'-ICGICTATCIGGCCTAC-3'), sintetizados pela Invitrogen. A reação de amplificação, com volume final de 10,0µl, foi a seguinte: 5,0µl GoTaq Colorlles Master Mix (Promega), 1,0µM de cada oligonucleotídeo REP-1 e REP-2, 1,0µL de água milli-Q estéril e 2,0µL do DNA diluído. A reação de PCR

foi iniciada com 6 min. de desnaturação a 95°C, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 60 seg., anelamento a 40°C por 60 seg., extensão a 65°C por 8 min., e extensão final a 65°C por 16 min., manutenção a 4°C.

Na análise de ERIC-PCR, os oligonucleotídeos utilizados foram: ERIC-1 (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC - 3') e ERIC-2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG - 3'), sintetizados pela Invitrogen. A reação de amplificação, com volume final de 10,0µl, foi a seguinte: 5,0µl GoTaq Colorlles Master Mix (Promega), 1,0µM de cada oligonucleotídeo ERIC-1 e ERIC-2, 1,0µL de água milli-Q estéril e 2,0µL do DNA diluído. A ciclagem inicial foi com 7 min. de desnaturação a 95°C, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 60 seg., anelamento a 52°C por 60 seg., extensão a 65°C por 8 min., e extensão final a 68°C por 16 min., manutenção a 4°C.

Todas as reações foram realizadas no termociclador MJ Research P-100 (Perker Elmer).

Os fragmentos amplificados ou amplicons por BOX, REP e ERIC-PCR, foram separados por eletroforese a 80 V, durante três horas em géis de agarose a 1,5%, corados com SybrGold (Sigma) e fotografado em fotodocumentador LPIX-HE da Loccus do Brasil (Figura 1). O perfil de bandas no gel foi transformado em uma matriz binária bidimensional, na qual 0 indica ausência e 1, presença de bandas, sendo o agrupamento realizado pelo programa NTSYS-pc 2.1, utilizando o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with arithmetic mean*).

A matriz foi computada pela similaridade dos dados quantitativos (SIMQUAL), conforme Sokal & Sneath (1963), e o algoritmo de agrupamento usado foi SAHN - Sequential agglomerative hierarical nested cluster analysis, para elaboração da árvore filogenética e a formação do gráfico (Sneath & Sokal, 1973). Utilizou-se o algoritmo Tree Plot (Rohlf, 1975), para converter a árvore matriz em um dendrograma, e o coeficiente de Simple Matching (SM), visto que são úteis para valores binários usados como geradores de informações de igualdade (simetria). A correlação expressa como porcentagem de similaridade e semelhança mínima, a um nível de 65% entre os isolados, foi utilizada como o critério para definir uma OTU (*Operational Taxonomic Unit*), segundo Yang et al. (2004).

O gene 16S rDNA foi amplificado com os seguintes oligonucleotídeos iniciadores: fD1 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') e rD1 (5'-AAG GAG GTG

ATC CAG CC-3') (Weisburg et al., 1991). A reação foi realizada para um volume final de 25,0µL, contendo: 0,5 µL de primer; 12,5 µL da Gotaq Colorless Master Mix (Promega); 9,5µL água milli-Q estéril e 2,0 µL do DNA diluído. A reação foi iniciada com 3 min. de desnaturação a 94°C, seguido de 30 ciclos com desnaturação a 94°C, por 50 seg., anelamento a 57°C por 50 segundos, extensão a 72°C por 60 seg., e extensão final a 72°C por 7 min. Uma alíquota de 5,0 µL do produto da PCR foi analisada em gel de agarose 1,4% em eletroforese a 80 V por três horas, corado com 1,5µL de SybrGold (Sigma), e 3,0µL de tampão de corrida (azul de bromofenol), utilizando como padrão de tamanho de DNA, o marcador molecular de 1kb (Promega). Os géis foram documentados através do programa "LabImagem 1D" da Locus, usando o fotodocumentador LPIX-HE.

Na preparação dos produtos de PCR para a reação de sequenciamento foi realizada uma etapa de purificação, que consistiu em adicionar aos 25 µL da amostra do produto, 2,0 µL de acetato de amônio 7,5M e 52,0 µL de etanol 100%, e centrifugar a 10.000rpm por 45min a 20°C, descartando-se o sobrenadante e vertendo-se o tubo em papel toalha por 10min. Em seguida, adicionou-se 150 µL de etanol 70% gelado, centrifugou-se novamente por 10min a 4.000rpm, descartou-se o etanol e verteu-se em papel toalha por 12h. O *pellet* contendo DNA foi ressuscitado em 30 µL de água ultrapura estéril e conservado a -20°C.

O sequenciamento da região 16S rDNA foi realizado na Plataforma de Sequenciamento de DNA – NTBIO da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) utilizando-se um MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences). Em geral, os parâmetros de eletroforese utilizados foram: 1 kVv de voltagem de injeção, 40 s de injeção da amostra, 5 kV de voltagem de corrida e 240 min de corrida.

Para a separação dos grupos genotípicos, as sequências do gene 16S rDNA dos 50 isolados, mais as seis estirpes de referência foram alinhadas entre si, utilizando-se o programa Bioedit v.7.0.9.0, e cortadas as extremidades após o alinhamento, usando-se o programa ClustalW, com um bootstrap de 1000 réplicas. Após o corte, ficaram aproximadamente 1670 pb, que deverão ser enviada para o GenBank (National Center for Biotechnology Information – NCBI) através do programa Sequin Application version 9.50. O número de taxas analisados foram 72, incluindo os acessos do NCBI. Após o alinhamento, foram cortadas o início e o fim das sequências que não foram alinhadas, para se obter sequências de tamanhos

semelhantes. Esta matriz foi convertida pelo programa MEGA v.4.1 (Beta) e as sequências de nucleotídeos foram analisadas pelo código genético padrão. A árvore filogenética foi construída pelo método de Neighbor Joining (NJ) (Saitou & Nei 1987), usando-se o teste de filogenia Bootstrap, com 1000 repetições, deleção *pairwise*, onde neste caso os gaps são frequentemente inseridos durante o alinhamento de regiões homólogas de sequências e representam deleções ou inserções. O modelo usado foi de nucleotídeo, Jukes-Cantor, no qual a taxa de substituição de nucleotídeos é a mesma para todos os pares dos quatro nucleotídeos A, T, C e G. A equação de correção para este modelo produz uma máxima estimativa da probabilidade do número de substituições de nucleotídeos entre as duas sequências. Para as frequências de nucleotídeos iguais assume-se uma igualdade das taxas de substituição entre os locais (Jukes e Cantor, 1969). O dendrograma foi construído através do programa TreeExplorer.

As sequências das duas fitas do gene 16S rDNA dos 50 isolados e as seis estirpes de referências do feijão-fava foram obtidas a partir dos produtos de PCR purificados (sem clonagem). Os oligonucleotídeos usados na reação de sequenciamento foram os mesmos da amplificação dos fragmentos (direto e reverso). O comprimento final das sequências consenso para cada uma das estirpes está mostrada no Quadro 1.

Outra técnica usada para determinar a variabilidade genética dos isolados foi a análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA-*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*), sendo utilizadas três enzimas de restrição (endonucleases): *MspI*, *DdeI* e *HhaI*. Neste procedimento, 0,5 µL do fragmento de 16S rDNA amplificado foi digerido com as endonucleases separadamente, de acordo com as recomendações do fabricante (Promega).

Após a digestão, o padrão de bandas foi visualizado por eletroforese em gel de agarose (2,5%), em tampão TBE 0,5X por 4 h a 80 V, juntamente com o corante SybrGold (Sigma) e marcador de peso molecular DNA 100 pb (Invitrogen), sendo em seguida fotografado em fotodocumentador LPIX-HE da Locus. De posse das imagens, as matrizes de similaridade foram construídas, com ajuda do programa NTSYSpc 2.1, utilizando-se o coeficiente de correlação Simple Matching (SM). Os perfis eletroforéticos obtidos com cada enzima foram usados para a construção de um dendrograma, utilizando-se o algoritmo UPGMA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Fingerprints (REP, ERIC e BOX PCR)

Os dados obtidos mostram que os oligonucleotídeos REP-PCR apresentaram maior variabilidade do que os outros dois oligonucleotídeos ERIC e BOX-PCR (Figura 1).

Os isolados isol4, isol5 e isol6 foram idênticos no *primer* BOX-PCR e parecidos no ERIC-BOX. Entretanto, estes isolados obtiveram com o *primer* BOX um padrão distinto, evidenciando o poder de discriminação da análise por estes oligonucleotídeos e a confiabilidade em diferenciar estirpes com uma excelente repetibilidade, conforme observado por Menna-Pereira (2008) e Hungria et al. (2008), avaliando a biodiversidade de rizóbios tropicais por Rep-PCR como uma ferramenta taxonômica e filogenética. Verifica-se também que os amplicons no *primer* REP apresentaram um peso molecular muito alto em relação aos outros dois *primers*, e permitiram a geração de até 16 bandas distintas, variando de 100 a 1000 pb.

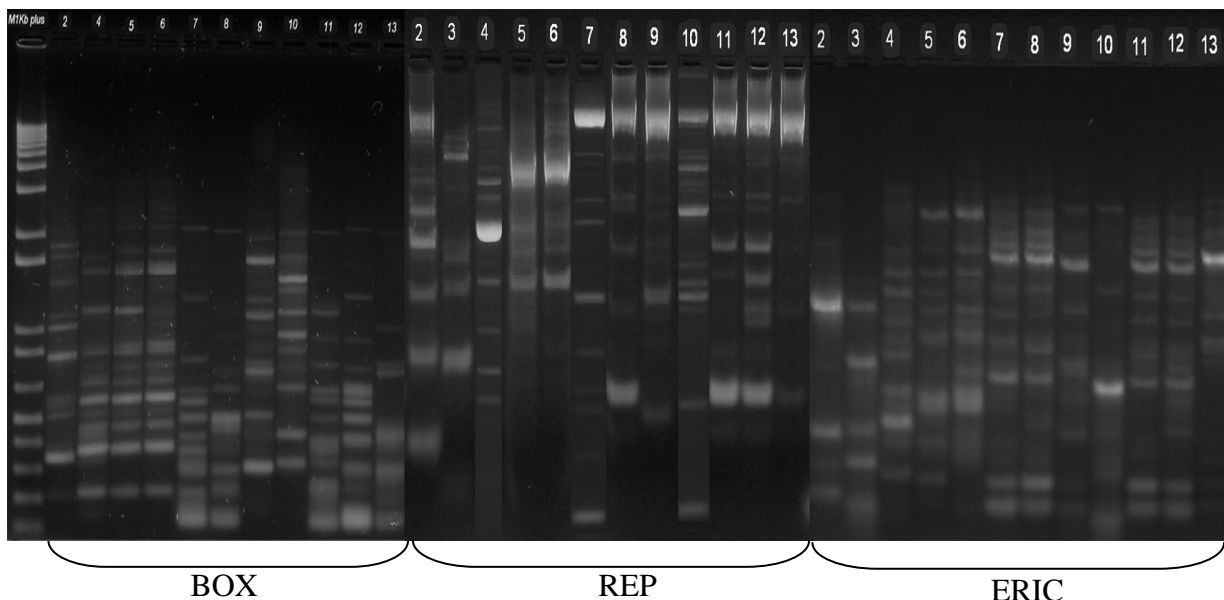


Figura 1 – Padrão de bandas dos produtos de amplificação com os oligonucleotídeos BOX, REP e ERIC-PCR de alguns isolados de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). Legenda: Marcador 1Kb Plus, 2 a 13 correspondem aos isolados (Isol2, Isol3, Isol4, Isol5, Isol6, Isol7, Isol8, Isol9, Isol10, Isol11, Isol12 e Isol13).

Analisando-se o dendrograma formado pelo *primer* REP-PCR (Figura 2) e admitindo-se um corte de 65%, os isolados formaram três grupos e três ramas monofiléticas, com os isolados: isol01, isol04 e isol07. No grupo 2, houve a formação de vários sub-grupos, sendo que todas as estirpes de referências foram englobadas neste grupo. Estes isolados apresentaram alta diversidade genética, com distância genética entre eles variando de 66 a 97%. O grupo 4 foi formado pelos isolados isol23, isol24 e isol25, sendo que o isol24 apresentou uma distância genética inferior aos demais; o grupo 5 ficou formado pelos isolados isol10 e isol30, ambos com a mesma distância genética. Estes dados concordam com os obtidos por Versalovic et al. (1991), que utilizaram os oligonucleotídeos ERIC-1 e ERIC-2 em *Escherichia Coli*, resultando em um grau de polimorfismo menor que REP e BOX. Nesse estudo, o marcador ERIC mostrou-se menos polimórfico que o REP, entretanto, mais polimórfico que o marcador BOX. Isto talvez se deva ao fato da pouca variação nas regiões flanqueadas por esses oligonucleotídeos.

O método ERIC-PCR aparentemente funciona para muitas espécies diferentes que não possuem quaisquer cópias de sequências ERIC dentro do seu genoma. Wilson & Sharp (2006) encontraram evidências que as sequências ERIC estão apenas dentro do genoma de bactérias pertencentes a família Enterobacteriaceae e algumas espécies de *Vibrio*, o que representa apenas duas famílias γ -Proteobacteria. O uso deste marcador tem sido utilizado para investigação de uma vasta gama de outras espécies de bactérias, e mesmo eucariontes, que parecem não conter cópias dessas sequências no genoma.

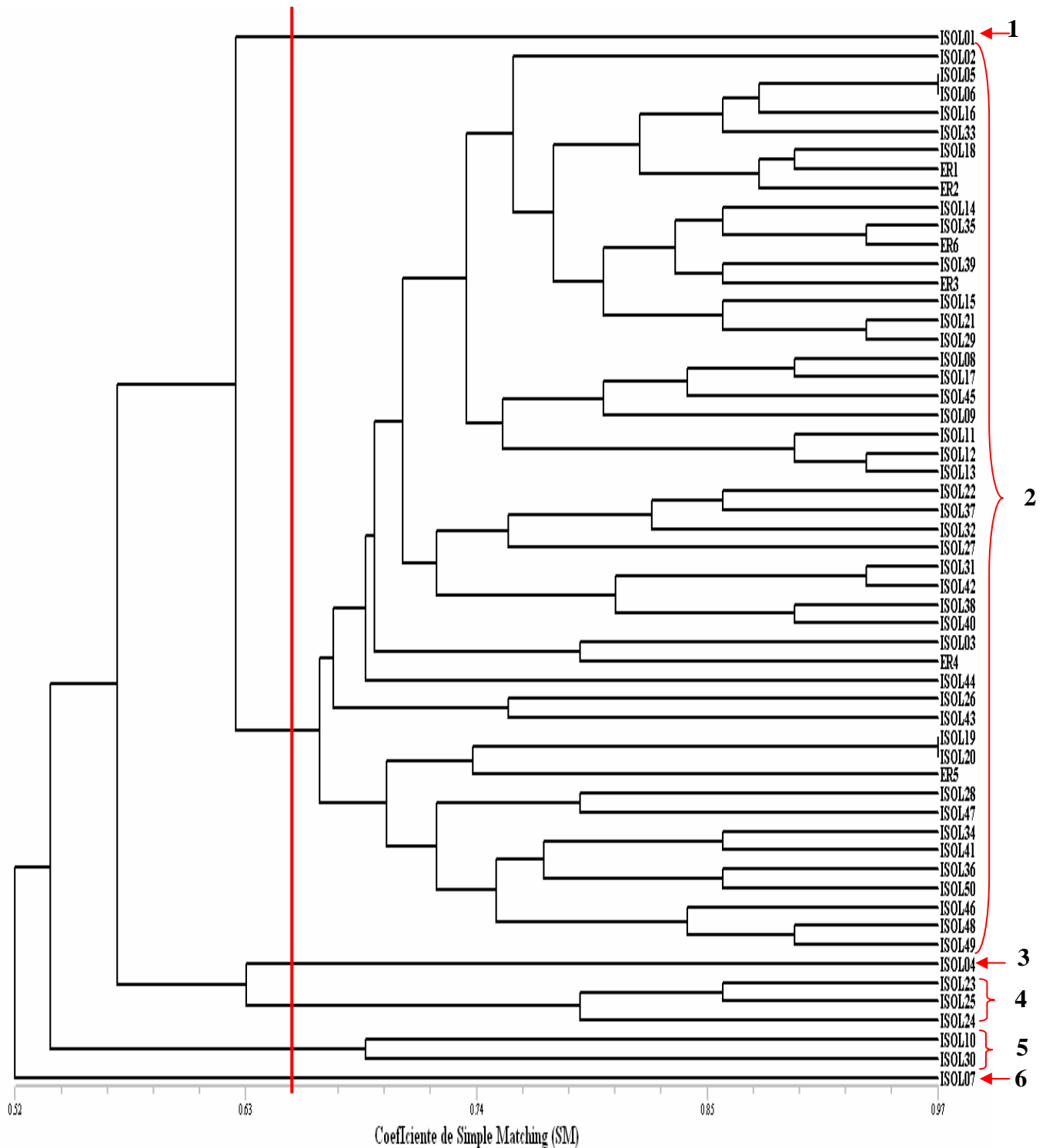


Figura 2. Dendrograma formado pelo agrupamento (UPGMA, com o coeficiente de Simple Matching (SM)) dos produtos obtidos na análise de REP-PCR dos 50 isolados, trabalhando como iniciadores arbitrários, como ocorre na técnica RAPD (Wilson & Sharp, 2006). Niemann et al. (1999) observaram o uso de oligonucleotídeos ERIC para a obtenção de um perfil *finger printing* em um isolado de *Simonizobium melloti* – *Ensifer fredii* USDA205, ER5 – *Bradyrhizobium japonicum*, BR111 e ER6 – *R. tropici*. CIAT899).

meliloti 2011, sugeriram que a técnica ERIC-PCR é baseada no anelamento dos oligonucleotídeos em sítios não específicos do genoma desse organismo, e que as sequências amplificadas são apenas semelhantes à sequência ERIC genuína. Além disso, os resultados obtidos neste estudo indicam que os elementos ERIC- repetitivo ou ERIC-like podem não ocorrer no genoma de *S. meliloti*.

Utilizando-se os oligonucleotídeos ERIC-1 e ERIC-2, observou-se a geração de até 12 bandas, com peso molecular variando de 100 a 2000 pb (Figura 1). No dendograma formado por esses oligonucleotídeos, verifica-se seis grupos (Figura 3). O grupo 1, formado pela maioria dos isolados, exibiu identidade genética com até 100% entre os seguintes isolados: isol1, isol20, isol33, isol34 e isol48; Isol9 e Isol30; Isol7 e Isol8; isol11, Isol12 e Isol13; Isol5 e Isol6; Isol25 e Isol31; Isol16 e Isol24. O grupo 2 foi formado pelos isolados: Isol2, isol17, isol18, isol39, isol41, isol4, Isol23 e isol19. O isol2 mostrou-se idêntico às duas estirpes de referência, ER3 (*Rhizobium etli* CFN42) e ER5 (*Bradyrhizobium japonicum* BR111), enquanto que a ER1 (*Rhizobium* sp. NGR234) mostrou similaridade de aproximadamente 89% com o isol23.

A comparação entre os resultados dos marcadores ERIC e REP, mostra que existem dificuldades em se usar os perfis de agrupamento ou mesmo a definição das espécies e até dos gêneros, pela complexidade destes resultados obtidos. Esta mesma dificuldade foi verificada por Menna et al. (2009), trabalhando com biodiversidade de rizóbios de soja utilizando a técnica de REP-PCR.

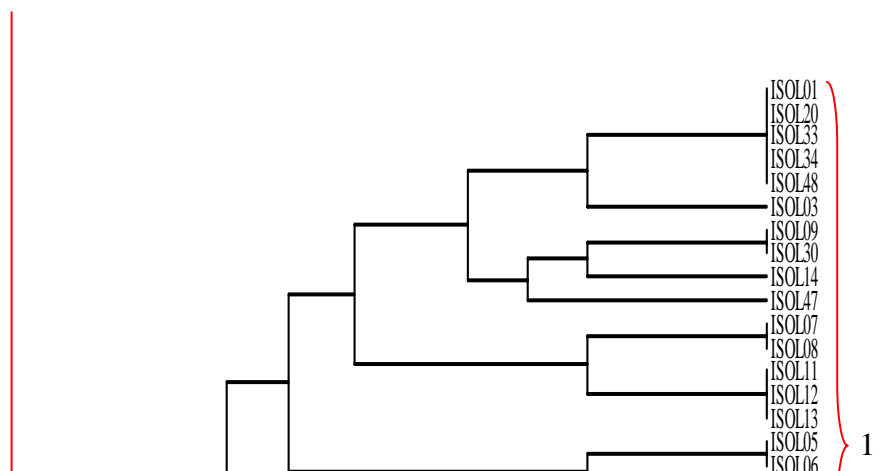


Figura 3. Dendrograma formado pelo agrupamento (UPGMA com o coeficiente de Simple Matching (SM)) dos produtos obtidos na análise de **ERIC-PCR** dos 50 isolados de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) e estirpes de referência (ER1 – *Rhizobium* SP NGR234, ER2 – *Mesorhizobium mediterraneanus* BR 523, ER3 – *R. etli* CFN42, ER4 – *Ensifer fredii* USDA205, ER5 – *Bradyrhizobium japonicum* BR111 e ER6 – *R. tropici* CIAT899).

O resultado da análise BOX-PCR para os 50 isolados de rizóbios (Figura 4), mostra perfis de bandas bastante diversificados, com um complexo agrupamento entre os isolados e as estirpes de referência. Formaram-se, a priori cinco agrupamentos, sendo que o agrupamento 1, com os subgrupos G₁, G₂ e G₃ conteve os maiores números de nodos do que os agrupamento 2, 3, 4 e 5.

Os subgrupos G_2 e G_3 apresentaram agrupamentos mais complexos, com maiores números de nodos e isolados. O G_2 , com 18 isolados e a estirpe de referência ER4 (*Ensifer freedii* USDA205 sp NGR234) de crescimento rápido, apresentou uma rama monofilética com 90% de similaridade dentro do subgrupo. Neste subgrupo, os isolados isol12, isol50, isol48, isol15, isol42, isol33 e isol49 são idênticos assim como os isolados isol14, isol24, isol47 e isol29; isol39 e isol45; isol11 e isol13; isol22 e isol38; apresentaram similaridade de 100%. Para este subgrupo, aproximadamente 67% dos isolados apresentaram similaridade genética entre si de 100%.

No subgrupo G_3 , do total de 15 isolados e uma estirpe de referência ER2, apenas 5 são diferentes. Os isolados isol20 e isol27 apresentaram rama monofilética com identidade genética variando de 90% a 95% dentro do subgrupo. Os isolados isol4, isol5, isol6, isol30 e isol37 são idênticos, entre si, o mesmo ocorrendo com os isolados isol8, isol17, isol26, isol34 e isol35. Os isolados isol28, isol31 e isol32 apresentaram similaridade de 100% com a estirpe de referência ER2. Este subgrupo, apesar de apresentar menor número de isolados que o anterior, manteve a percentagem de 67% de isolados iguais entre si.

O subgrupo G_4 apresenta-se com 5 isolados e a estirpe-tipo ER5, que é idêntica ao isolado isol19 e com 100% de similaridade dentro do subgrupo. Neste subgrupo, o isolado isol43 apresenta-se em uma rama monofilética e com similaridade de aproximadamente 85% entre os isolados.

No subgrupo G_5 , no qual não foi agrupada nenhuma das estirpes de referência, a similaridade variou entre 85% a 100%. Os isolados isol25 e isol46 são idênticos. Já os isolados isol2 e isol3 apresentaram similaridade genética de 90%.

Um agrupamento pequeno foi o do subgrupo G_6 , onde apareceram os isolados isol10 e isol34, com similaridade de aproximadamente 90%.

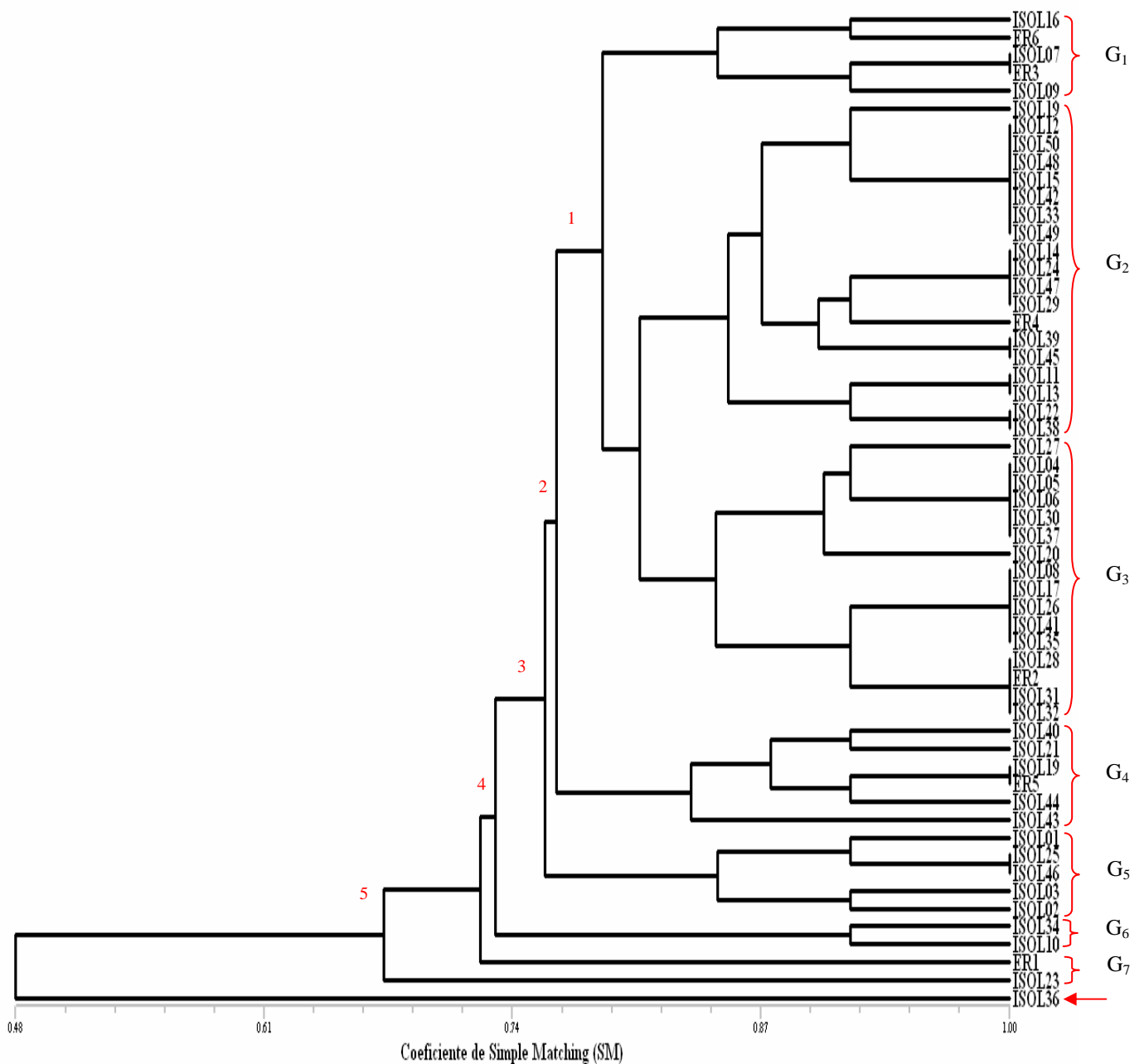


Figura 4. Dendrograma formado pelo agrupamento (UPGMA, com o coeficiente de Simple Matching (SM)) dos produtos obtidos na análise de **BOX-PCR** dos 50 isolados de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) e estirpes de referência (ER1 – *Rhizobium* SP NGR234, ER2 – *Mesorhizobium mediterraneanus* BR 523, ER3 – *R. etli* CFN42, ER4 – *Ensifer fredii* USDA205, ER5 – *Bradyrhizobium japonicum* BR111e ER6 – *R. tropici* CIAT899).

Diferentemente dos outros dois marcadores, apesar de formar mais grupos, o BOX-PCR mostrou menor variabilidade genética entre os isolados, chegando a apresentar no subgrupo G_2 (grupo 1), sete isolados com a mesma identidade genética, o mesmo acontecendo com o grupo G_3 (grupo 1). Os grupos 2 (G_4), 3 (G_5), 4 (G_6), 5 (G_7) e uma rama monofilética formada pelo isol36 foram os que mais se distanciaram geneticamente. Este isolado comportou-se como um grupo externo, podendo ser um gênero diferente de *Rhizobium*.

O subgrupo G_1 exibe isolados com identidade genética variando de 85% a 100%. Neste agrupamento estão três isolados e duas estirpes de referências, a ER6, com 90% de similaridade com o isolado isol16 e a ER3, com 90% de similaridade com o isolado isol9 e 100% de similaridade com o isolado isol7. Este resultado discorda dos relatos de Newbury et al.(1987) e Stern et al. (1984), que relacionam um maior polimorfismo dos oligonucleotídeos “REP” e “BOX” às prováveis funções dessas sequências dentro do genoma bacteriano.

Sabe-se que dado à abundância de fragmentos REP e levando-se em consideração que o DNA em procarionto é totalmente funcional devido ao espaço no cromossomo, essas sequências provavelmente desempenham importantes funções, como as atribuídas à regulação da expressão de genes intraoperônicas, que na realidade podem estar envolvidas na proteção contra a degradação do mRNA e na modulação da iniciação da tradução.

O dendrograma polifásico (Figura 5) foi o mais complexo chegando a apresentar 7 grupos e 10 sub-grupos, sendo que a maioria dos isolados possuem uma identidade genética muito baixa entre si, indicando que o uso de mais de um marcador pode aumentar a possibilidade de se encontrar novas espécies bacterianas.

A comparação entre os dendrogramas mostra que apenas os isolados isol5 e o isol6 são a mesma bactéria, já que se utilizando todos os *primers* eles comportaram-se de forma idêntica. A explicação para estes resultados é a resolução taxonômica, que segundo Rademaker et al. (2000), quando se utiliza REP, ERIC e BOX, o padrão não é sempre idêntico. Isto pode ser esperado devido aos diferentes números de bandas geradas por cada oligonucleotídeo, pela condição de anelamento e pelo fato de que a prevalência ou distribuição dos elementos repetitivos podem variar em cada isolado.

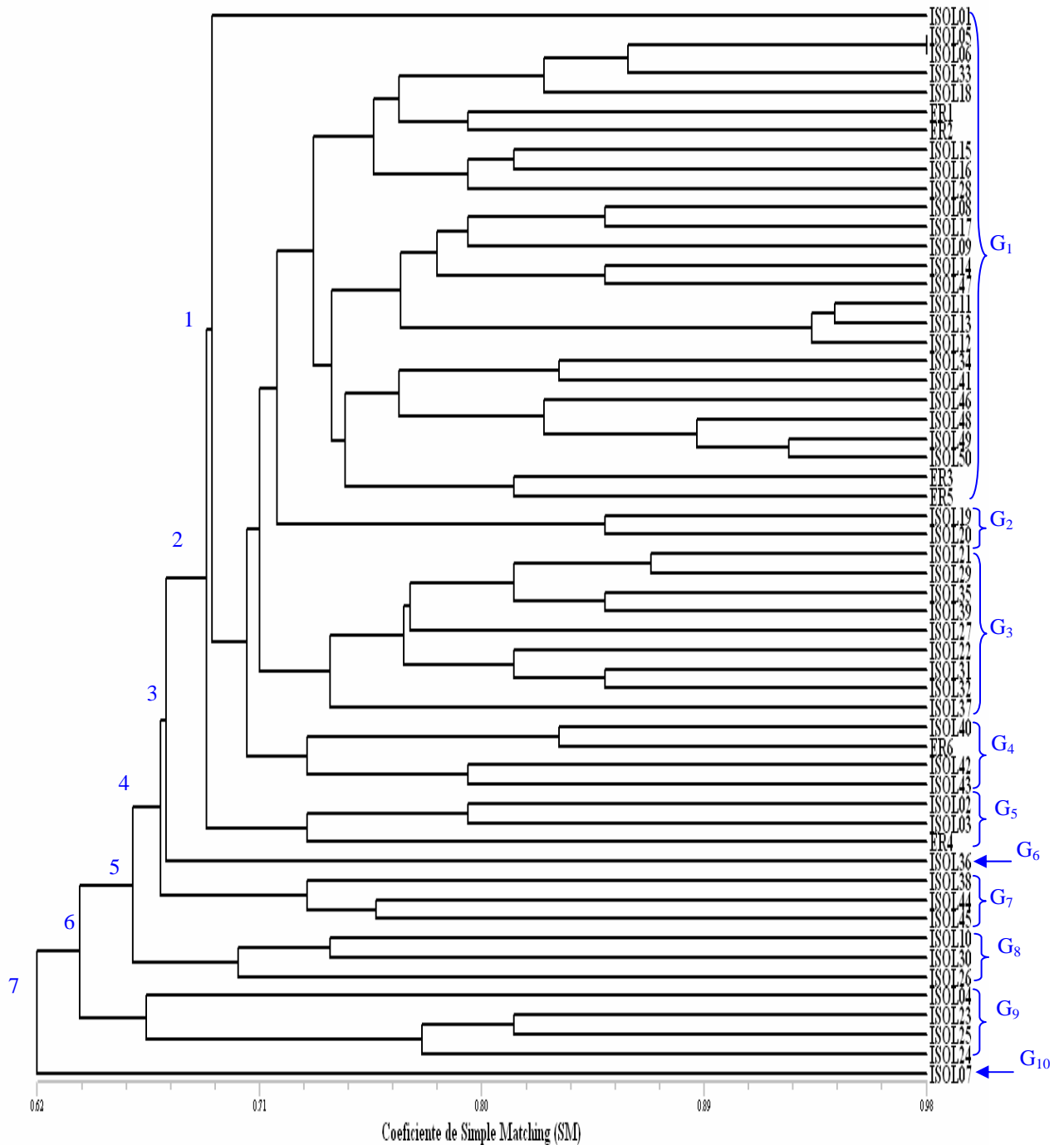


Figura 5. Dendrograma polifásico (UPGMA, com o coeficiente de Simple Matching (SM)) dos produtos obtidos nas análises de **REP, ERIC e BOX-PCR** dos 50 isolados de feijão-fava (*Phaseolus lunatus*) e estirpes de referência (ER1 – *Rhizobium* SP NGR234, ER2 – *Mesorhizobium mediterraneanus* BR 523, ER3 – *R. etli* CFN42, ER4 – *Ensifer fredii* USDA205, ER5 – *Bradyrhizobium japonicum* BR111e ER6 – *R. tropici* CIAT899

No agrupamento 1, os subgrupos G₁ e G₃ apresentaram-se mais complexos, com maiores números de nodos e isolados com a mesma identidade genética. O subgrupo G₁ exibe isolados com identidade genética variando de aproximadamente 72% a 100%. Nele estão 22 isolados e quatro estirpes de referências, sendo que ER1 (*Rhizobium* sp NGR234) e ER2 (*Mesorhizobium mediterraneus* BR523) apresentaram com aproximadamente 78% de similaridade entre si. Resultado não esperado, tendo em vista que estas bactérias possuem comportamento e características bem diferentes, sendo a NGR234 de crescimento rápido e de baixa especificidade, da família rhizobiaceae, enquanto que a BR523 é uma estirpe de crescimento intermediário, da família phylobacteriaceae. Para o subgrupo G₃, com 9 isolados, a similaridade genética foi de aproximadamente 75 a 88%. O isolado 37 apresentou similaridade genética de aproximadamente 75% em relação aos demais isolados do subgrupo.

O subgrupo G₂, formado pelos isolados isol19 e isol20, apresentou similaridade genética de aproximadamente 85% entre eles. Já o subgrupo G₄ foi formado pelos isolados isol40, isol42 e isol43 e a estirpe de referência ER6 (*Rhizobium tropici* CIAT899). A similaridade genética dentro deste grupo variou de aproximadamente 84% entre o isolado isol40 e a estirpe de referência ER6 e de aproximadamente 79% entre os isolados isol42 e isol43.

O agrupamento 2, formado pelo subgrupo G₅, apresentou 3 isolados e a estirpe de referência ER4, em uma rama monofilética de aproximadamente 72% de similaridade dentro do subgrupo. Neste subgrupo, os isolados isol2 e isol3 apresentam similaridade genética de aproximadamente 79% entre si.

A variabilidade genética dos isolados foi avaliada pelos perfis eletroforéticos obtidos da amplificação do DNA, utilizando-se os três grupos de oligonucleotídeos rep-PCR (REP, ERIC e BOX), que produziram múltiplos produtos com tamanhos diferentes (Figura 1). Segundo Versalovic et al. (1997), as sequências repetitivas estão por todo o genoma, por isso a técnica de rep-PCR tem mostrado ser potencialmente capaz de caracterizar o genoma completo, demonstrando poder de diferenciação semelhante ou melhor que outros métodos para análise de microrganismos.

No agrupamento 4, foi observado a formação do subgrupo G₇, pelos isolados isol38, isol44 e isol45. A similaridade genética entre os isolados isol44 e isol45 foi de

aproximadamente 75% e o isolado isol38 vem em uma rama monofilética com similaridade de aproximadamente 72% dentro do subgrupo.

O agrupamento 5, formado pelo subgrupo G₈, reuniu pequena quantidade de isolados, sendo eles: isol10, isol30 e isol26. Os isolados isol10 e isol30 apresentaram similaridade genética de aproximadamente 74% entre si e o isolado isol26, com aproximadamente 68% de similaridade dentro do subgrupo.

Um agrupamento pequeno foi o 6, do subgrupo G₉, onde apareceram a os isolados isol4, isol23, isol24 e isol25, com similaridade genética de aproximadamente 78%.

Foi observado que os isolados isol7 e isol36, pertencentes aos subgrupos G₆ e G₁₀, respectivamente, comportaram-se como grupos monofiléticos externos, podendo ser um gênero diferente de *Rhizobium*.

Em geral, a utilização dos oligonucleotídeos rep-PCR tem permitido a caracterização de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, devido à complexidade dos produtos gerados pela amplificação por PCR. Como a técnica é baseada na amplificação de regiões repetitivas do genoma, ela tem sido amplamente utilizada, por ser considerada de fácil execução, principalmente para análise de grandes populações bacterianas (Mehta et al., 2002).

No presente trabalho foi possível observar que dos três oligonucleotídeos utilizados, os oligos “REP” e “BOX” apresentaram um maior número de amplicons do que os de “ERIC”. Isso remete ao alto grau de polimorfismo entre os isolados aqui analisados. Em geral, sabe-se que as sequências palindrômicas extragênicas repetitivas (REP) constituem-se de uma família de sequências repetitivas com cerca de 35 nucleotídeos que apresentam simetria (Gilson et al., 1984; Gilson et al., 1990).

A presença de polimorfismo dentro de uma população pode ser explicada, principalmente, pelos vários mecanismos moleculares que podem promover essa diversidade genética. Dentre eles incluem-se mutações espontâneas decorrentes da replicação infiel do DNA, reparo inadequado do DNA, transposição, recombinação de sítios específicos e transferência horizontal (Arber, 2000).

Ainda com relação à variabilidade e segundo Rademaker et al. (2000), os resultados obtidos pela combinação dos dados de REP, ERIC e BOX-PCR evidentemente são mais significantes e consistentes, uma vez que o número total

de amplicons são consideravelmente aumentados. Além disso, o genoma é mais amplamente coberto, uma vez que algumas regiões podem ter mais cópias de um determinado elemento do que outros.

ARDRA

Neste estudo, os perfis de restrição obtidos com as endonucleases *Ddel*, *HhaI* e *MspI* apresentaram variabilidade suficiente para discriminação dos isolados.

A endonuclease *Ddel*, com sítios de reconhecimento para corte nas regiões 5'...C[¶]TNAG...3' e 3'...GANT[¶]C...5, foi a que obteve mais discriminação entre os isolados, com padrão de bandas bem distinto entre os mesmos (Figura 6).

Considerando o coeficiente de Simple Matching (SM), a 65% de similaridade genética entre todos os dendrogramas formados, observou-se 3 agrupamentos. O agrupamento 1, reuniu 41 isolados e cinco estirpes de referências ER1, ER2, ER3, ER5 e ER6; no agrupamento 2, cinco isolados e no agrupamento 3, quatro isolados e uma estirpe de referência ER4.

A endonuclease *HhaI*, com sítios de corte 5'...CGG[¶]C...3' e 3'...C[¶]GCG...5' , apresentou menor poder de discriminação entre os isolados do que a *Ddel* (Figura 7). Observou-se a formação de 2 agrupamentos, sendo o agrupamento 1 formado pela grande maioria dos isolados e todas as estirpes de referência, e o agrupamento 2, com os isolados isol4, isol11 e isol12.

A endonuclease *MspI*, com sítios de reconhecimento de 5'...C[¶]CGG...3' e 3'...GGC[¶]C...5', apresentou comportamento semelhante a enzima *HhaI* (Figura 8). Observou-se a formação de 2 agrupamentos; o agrupamento 1, contendo 100% dos isolados e cinco estirpe estirpes de referência e o agrupamento 2, com a estirpe de referência ER5 comportando-se como rama monofilética externa.

Na análise do dendrograma com as três endonucleases, observa-se dois agrupamentos (Figura 12). No primeiro, onde estão todos os isolados considerando uma similaridade maior que 65%, verifica-se variação na distância genética entre estes isolados, sendo que, apenas o isolado isol27 e a estirpe referência ER2 apresentaram distância genética de 100%. No segundo agrupamento, formado apenas pelos isolados isol11 e isol12, a distância foi de 93%. Conclui-se que a técnica de ARDRA, pelo gene 16S rDNA foi capaz de diferenciar bem a similaridade desses isolados.

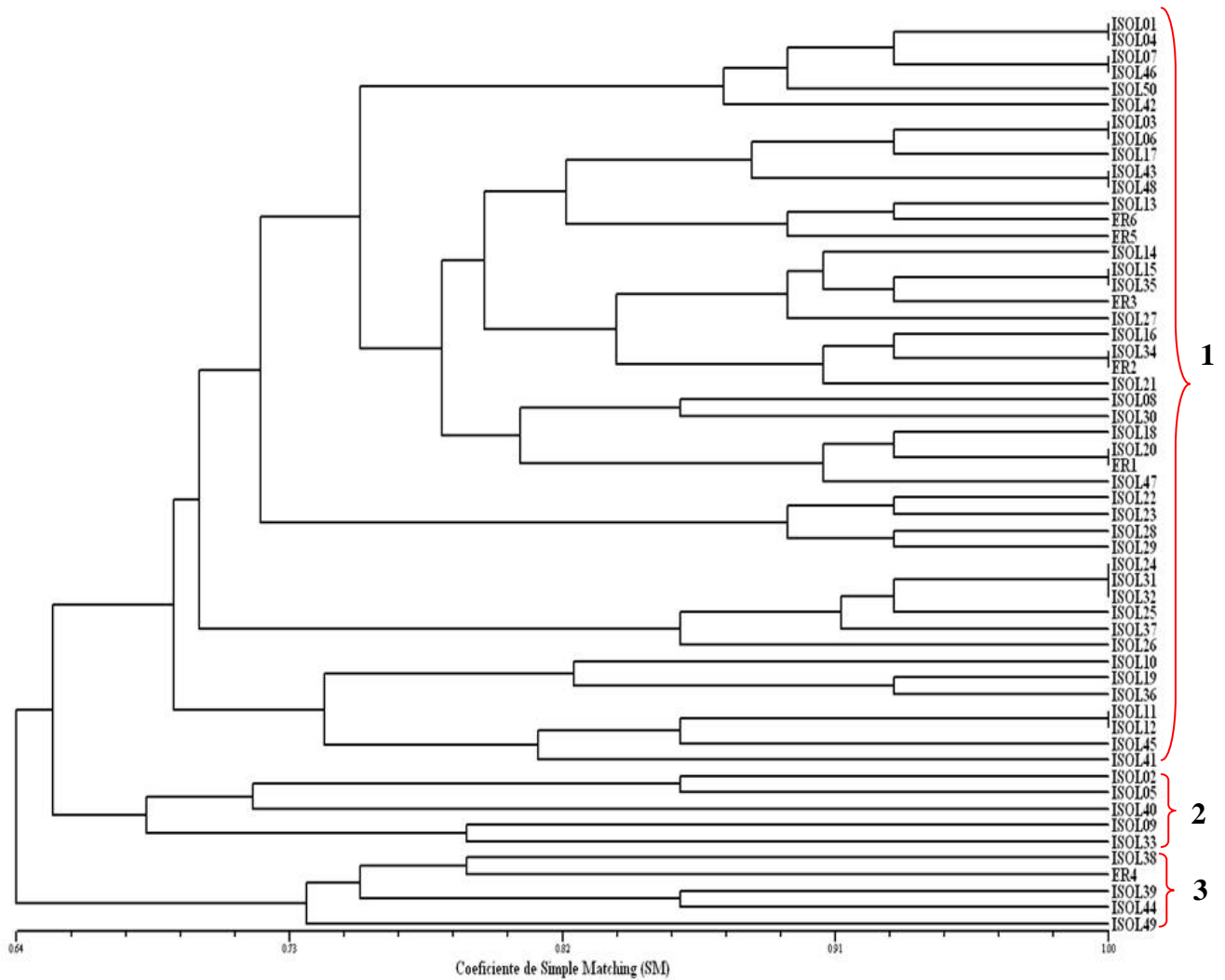


Figura 6. Dendrograma de similaridade dos 50 isolados de rizóbio provenientes de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) e 6 estirpes de referência pela análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA) usando a endonuclease *Ddel*.
 Legenda: ER1- *Rhizobium* sp NGR234; ER2- *Mesorhizobium mediterraneus* BR523; ER3-*Rhizobium etli* CFN42; ER4 - *Ensifer fredii* USDA205; ER5 - *Bradyrhizobium japonicum* BR11e ER6 - *Rhizobium tropici* CIAT899.

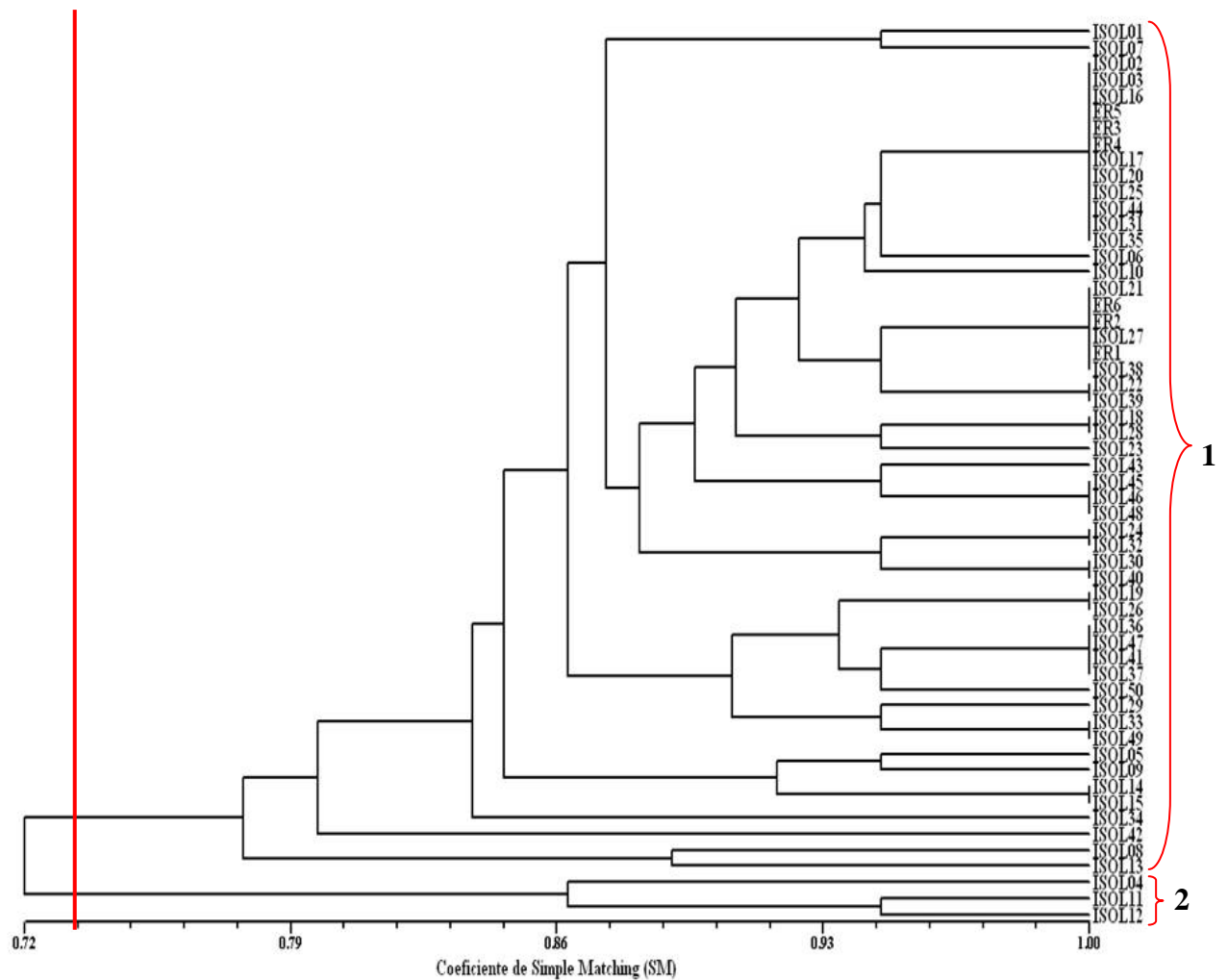


Figura 7. Dendrograma de similaridade dos 50 isolados de rizóbio provenientes de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) e 6 estirpes de referência na análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA) usando a endonuclease *HhaI*. Legenda: ER1- *Rhizobium* sp NGR234; ER2- *Mesorhizobium mediterraneus* BR523; ER3- *Rhizobium etli* CFN42; ER4 - *Ensifer fredii* USDA205; ER5 - *Bradyrhizobium japonicum* BR11e ER6 - *Rhizobium tropici* CIAT899.

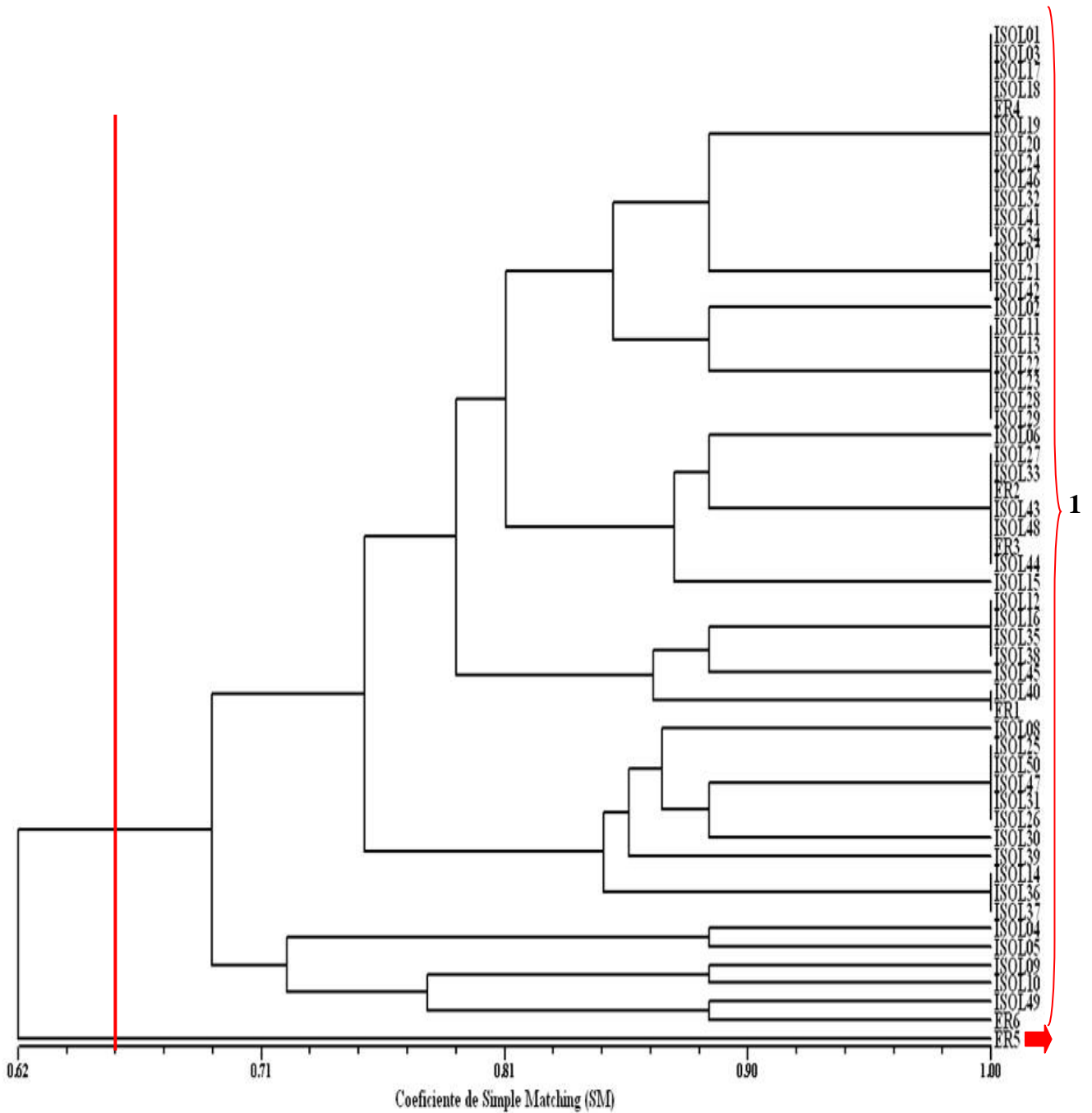


Figura 8. Dendrograma de similaridade dos 50 isolados de rizóbio provenientes de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) e 6 estirpes de referência pela análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA) usando a endonuclease *MspI*. Legenda: ER1- *Rhizobium* sp NGR234; ER2- *Mesorhizobium mediterraneus* BR523; ER3- *Rhizobium etli* CFN42; ER4 - *Ensifer fredii* USDA205; ER5 - *Bradyrhizobium japonicum* BR11e ER6 - *Rhizobium tropici* CIAT899.

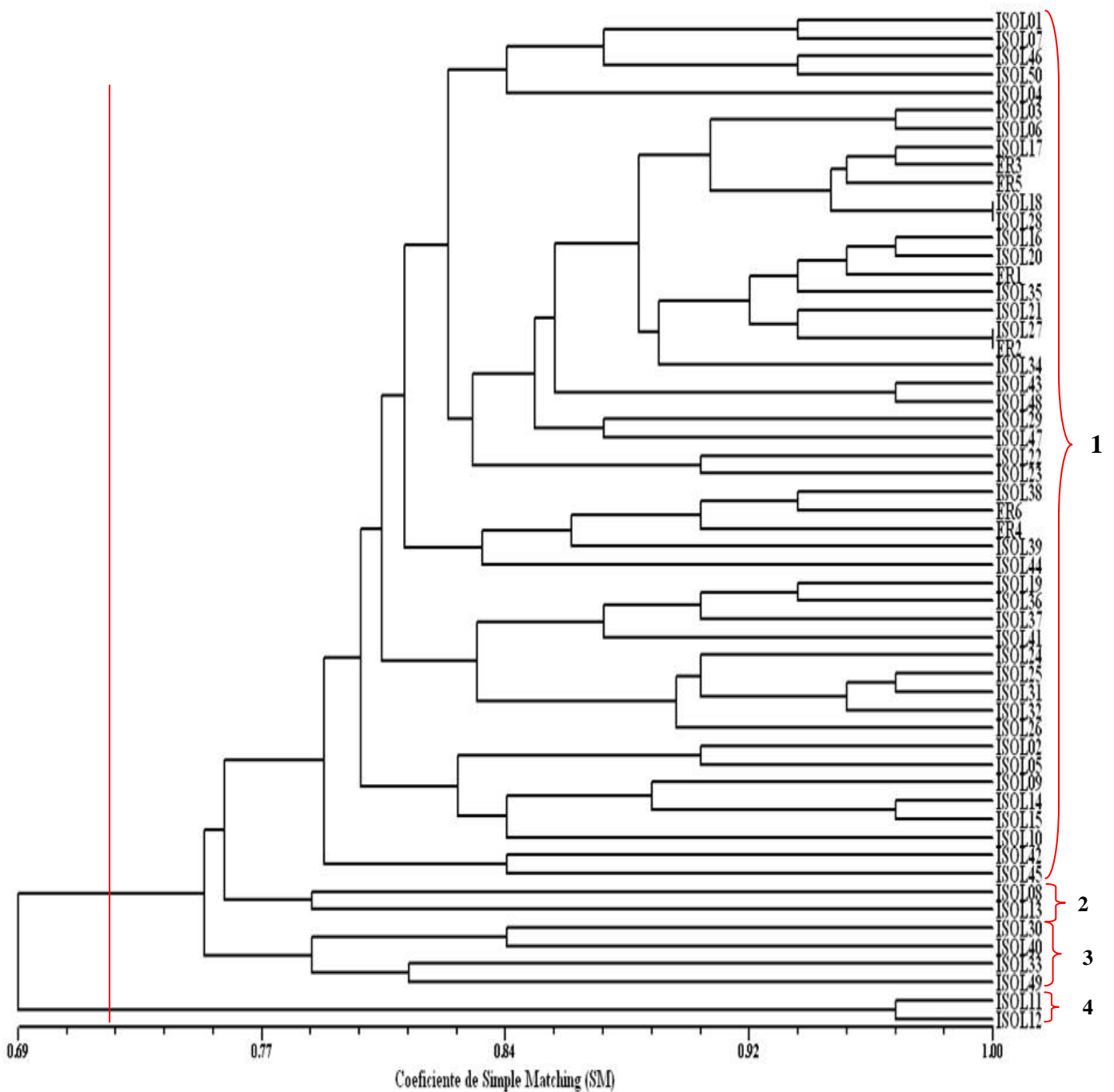


Figura 9. Dendrograma de similaridade dos 50 isolados de rizóbio provenientes de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) e 6 estirpes de referência na análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA), usando as endonucleases; *Ddel* e *Hhal*.
 Legenda: ER1- *Rhizobium* sp NGR234; ER2- *Mesorhizobium mediterraneus* BR523; ER3-*Rhizobium etli* CFN42; ER4 - *Ensifer fredii* USDA205; ER5 - *Bradyrhizobium japonicum* BR11e ER6 - *Rhizobium tropici* CIAT899.

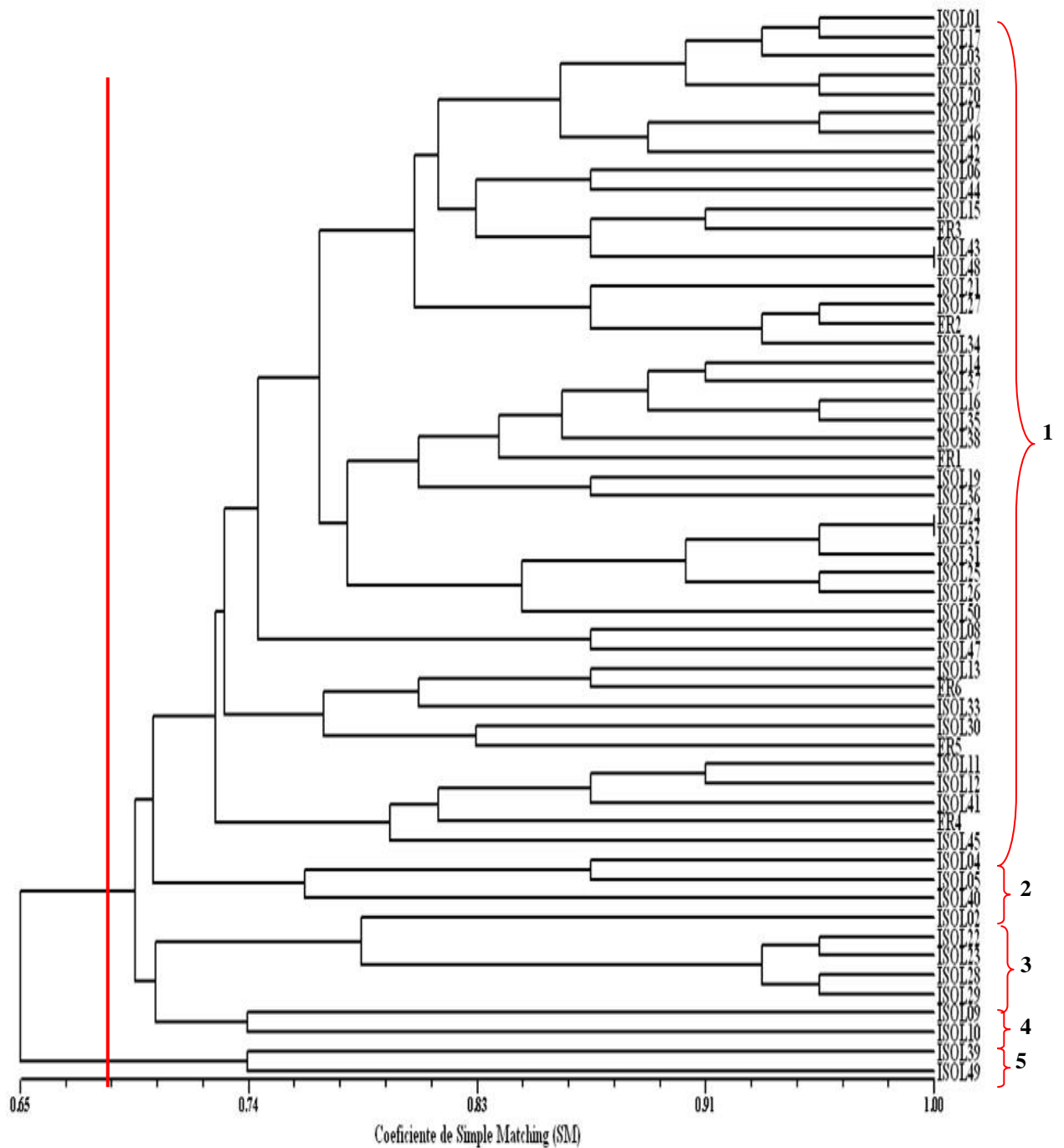


Figura 10. Dendrograma de similaridade dos 50 isolados de rizóbio provenientes de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) e 6 estirpes de referência na análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA), usando as endonucleases: ***DdeI*** e ***MspI***.
 Legenda: ER1- *Rhizobium* sp NGR234; ER2- *Mesorhizobium mediterraneus* BR523; ER3-*Rhizobium etli* CFN42; ER4 - *Ensifer fredii* USDA205; ER5 - *Bradyrhizobium japonicum* BR11e ER6 - *Rhizobium tropici* CIAT899.

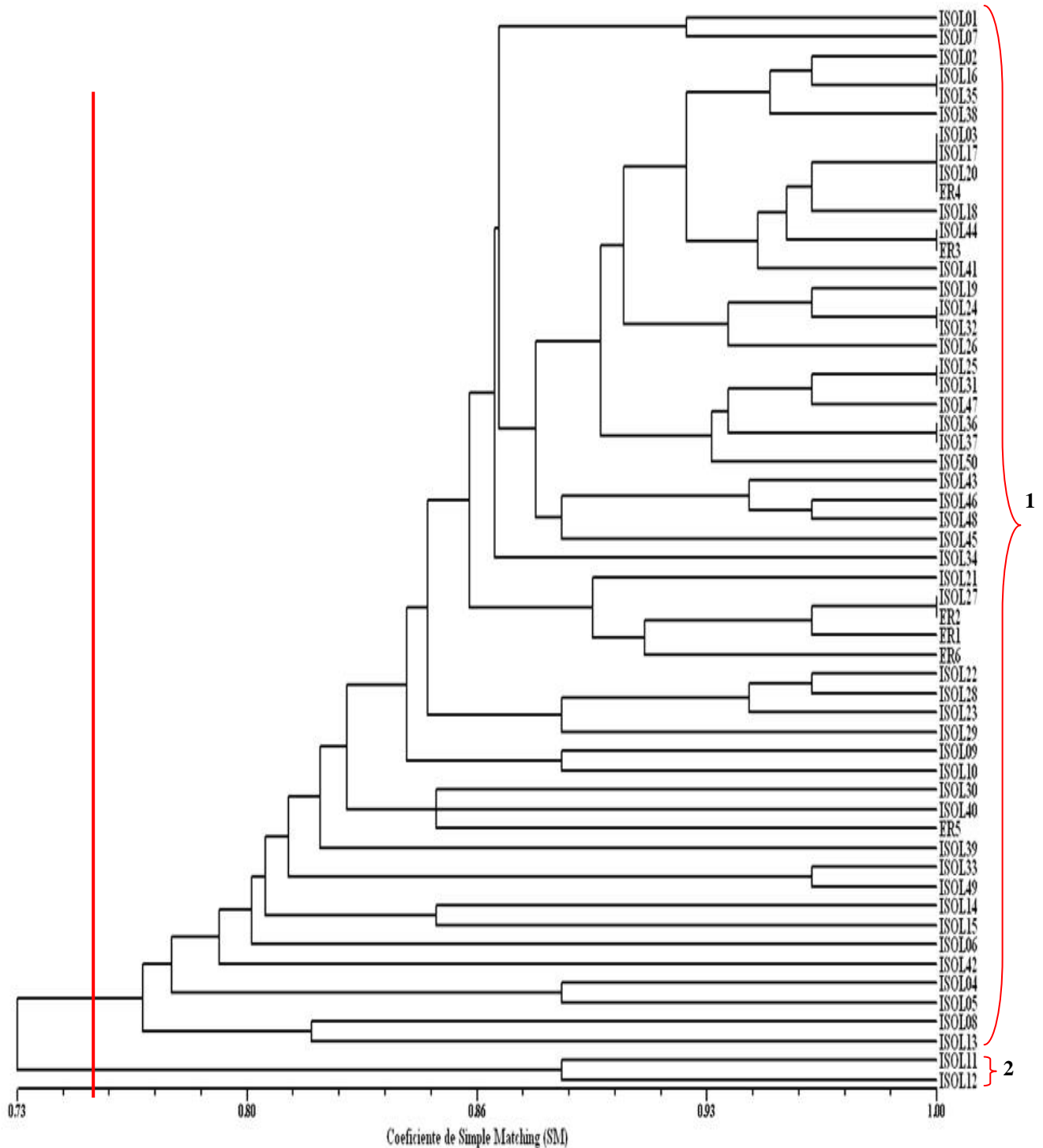


Figura 11. Dendrograma de similaridade dos 50 isolados de rizóbio provenientes de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) e 6 estirpes de referência na análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (ARDRA) usando a endonuclease *HhaI* e *MspI*.
 Legenda: ER1- *Rhizobium* sp NGR234; ER2- *Mesorhizobium mediterraneus* BR523; ER3-*Rhizobium etli* CFN42; ER4 - *Ensifer fredii* USDA205; ER5 - *Bradyrhizobium japonicum* BR11e ER6 - *Rhizobium tropici* CIAT899.

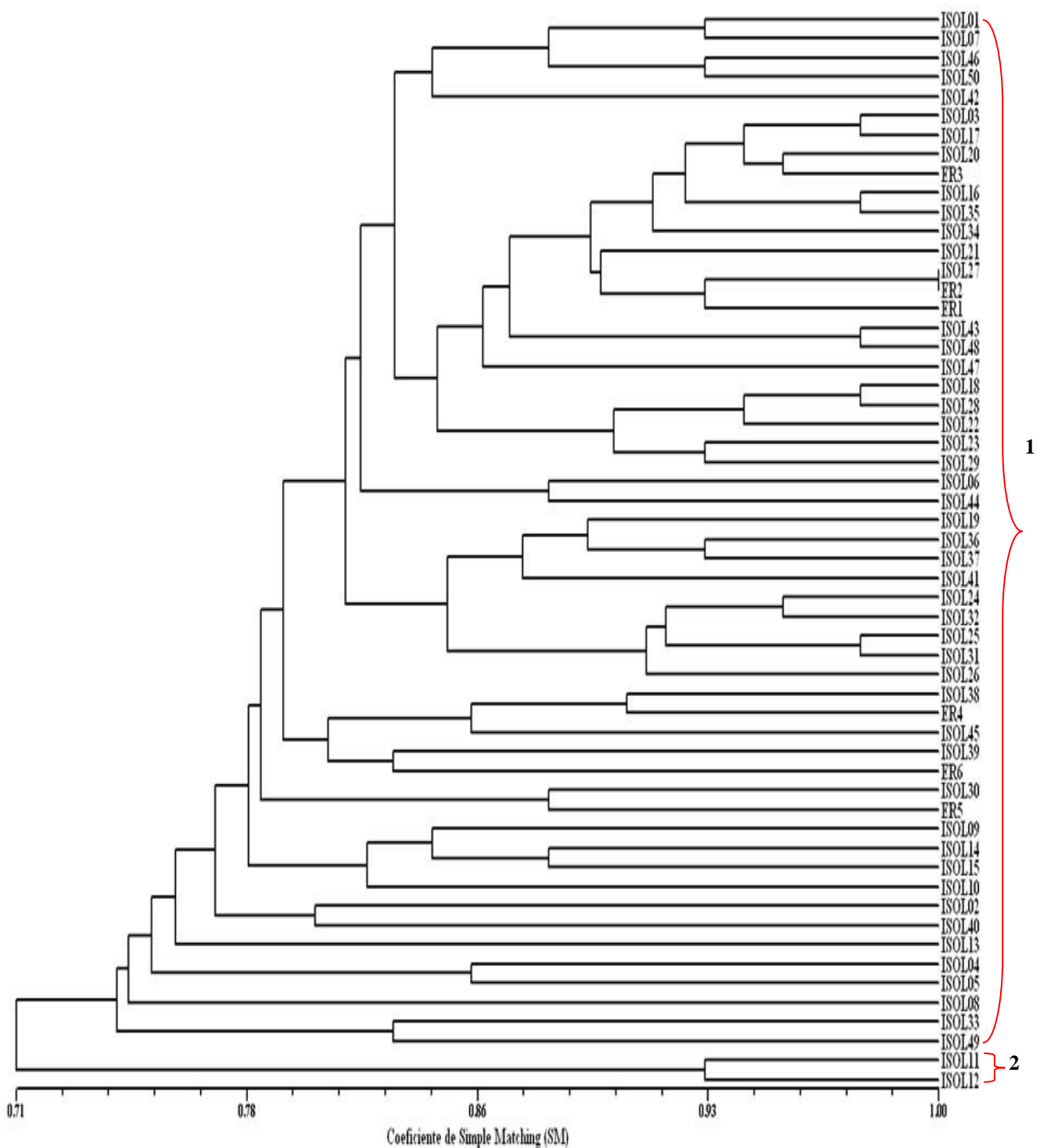


Figura 12. Dendrograma de similaridade genética compilado entre os 50 isolados obtidos por UPGMA com base na análise do DNA ribossômico amplificado (ARDRA), usando as enzimas *DdeI*, *HhaI* e *MspI*. Legenda: ER1- *Rhizobium* sp NGR234; ER2- *Mesorhizobium mediterraneus* BR523; ER3-*Rhizobium etli* CFN42; ER4 - *Ensifer fredii* USDA205; ER5 - *Bradyrhizobium japonicum* BR11e ER6 - *Rhizobium tropici* CIAT899.

Sequenciamento do gene 16S rDNA

Na árvore filogenética (Figura 13), os resultados obtidos do seqüenciamento do gene 16S rDNA dos isolados estão na cor negra, às estirpes de referência estão na cor azul e as estirpes (acessos) em vermelho foram retiradas do NCBI. Em seguida encontra-se o resultado do Blast mais o número de bases e suas identidades para cada organismo encontrado no GenBank.

Os isolados isol22, isol29, isol39, isol23, isol28, isol4, isol5, isol48 e isol49 apresentaram identidade com o gênero *Sinorhizobium*, variando de 81 a 84% (Figura 13). A estirpe de referência ER4 (*Ensifer fredii* USDA205) também se agrupou com 99% de réplicas no bootstrap. Os isolados isol40, isol2, isol3, isol10 e isol24 mostraram-se como rama monofilética e identidade muito baixa, já que apenas poucos pares de bases foram alinhados com os organismos *Mesorhizobium loti*, *Rhizobium etli*, *Leifsonia xyli*, *Burkholderia glumae* e *Beijerinckia indica*, respectivamente.

Um segundo grupo bem diferenciado foram das *burkholderias* (Figura 13), composto pelos isolados isol45, isol11, isol8, isol12 e isol13. O isolado isol11, apresentou identidade de 86%, mas em apenas 501pb; e o isol7 mostrou-se como um *Rhizobium etli*, com baixa homologia em pares de bases (546 pb) e identidade de 82%. Inferi-se que estes isolados podem ser potenciais bactérias dos grupos das β -proteobactérias, precisando, contudo de mais estudos como hibridização DNA-DNA e também autenticação das mesmas em plantas.

Um terceiro grupo bem caracterizado foi dos *Rhizobium* NGR234 e *Rhizobium* CIAT 899. No final da árvore agrupou-se a maioria dos *Bradyrhizobium*, sendo que os isolados isol18, isol19, isol37, isol17, isol35, isol26, isol6 e isol20 praticamente se comportaram como bactérias muito semelhantes geneticamente.

Os resultados da árvore filogenética juntamente com os dados de *fingerprinting* e ARDRA devem ser comparados com dados de outros genes, conforme sugere Martens et al. (2007), estudando um grupo de genes de filogenia. Tais comparações podem minimizar o impacto de eventos de recombinação ao se analisar as relações filogenéticas para finalidades taxonômicas.

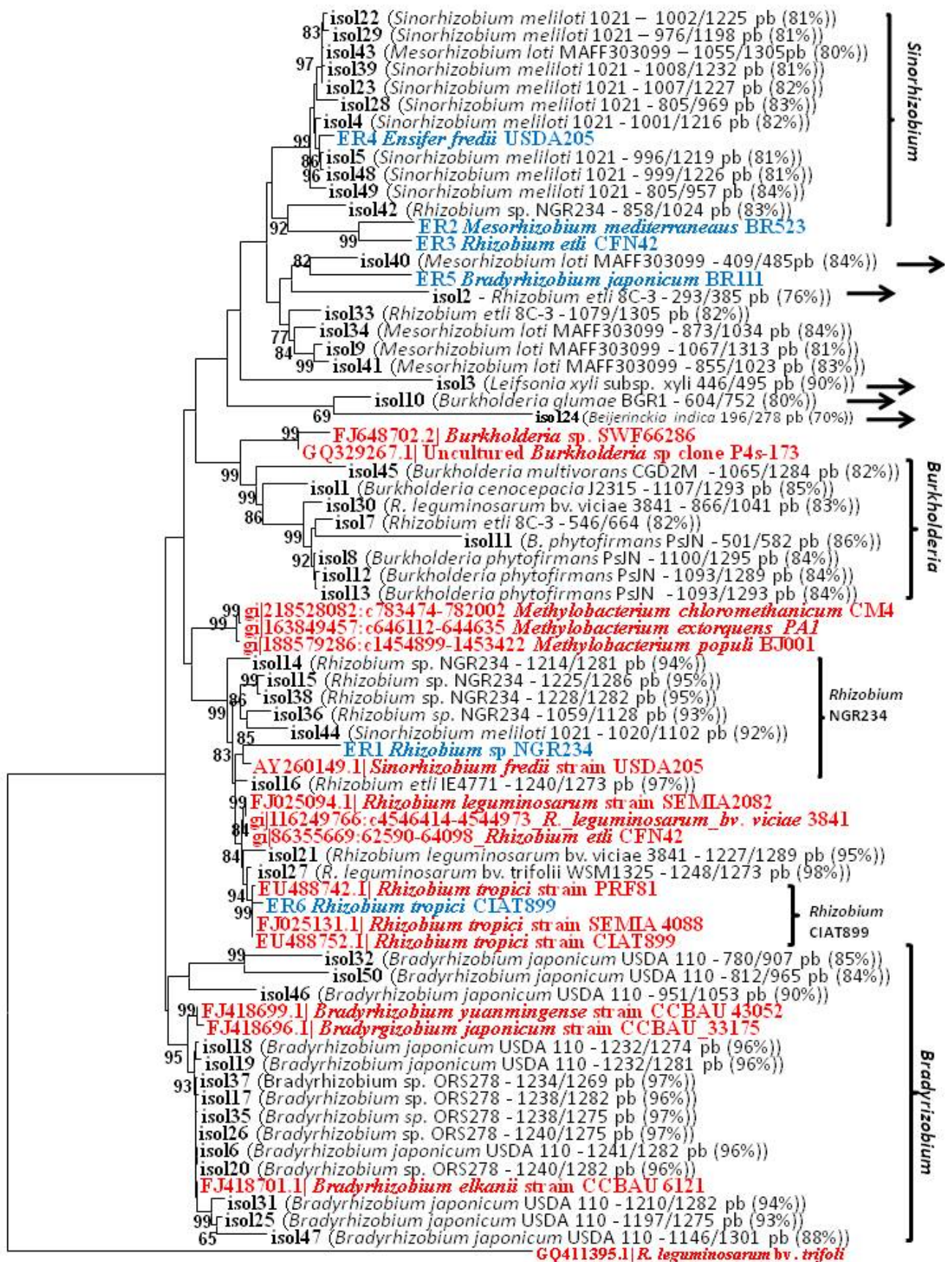


Figura 13. Arvore filogenética reconstruída a partir de sequências do gene 16S rDNA dos isolados de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) utilizando-se o método de Neighbor-Joining, com distâncias calculadas pelo método de Jukes-Cantor. Os valores de cada rama representam as porcentagens de 1000 réplicas bootstrap. Ramas com valores de bootstrap abaixo de 55% são como não resolvidas.

Verifica-se que o estudo dos isolados deve ser realizado por mais de um método, visto que alguns táxons dominantes não podem ser estudados por uma abordagem tradicional. A taxonomia polifásica deve ser aplicada a estes microrganismos permitindo a melhor compreensão das mudanças dinâmicas durante o processo de isolamento em planta, diferenciar os locais de coleta, visto que novos genes poderiam ajudar na conclusão de uma filogenia molecular segura.

CONCLUSÕES

1. Os marcadores REP, ERIC e BOX-PCR isoladamente apresentaram uma alta diversidade genética entre os isolados estudados, sendo que o BOX-PCR apresentou menor polimorfismo.
2. A árvore consenso dos marcadores *fingerprinting* demonstrou que os isolados oriundos do feijão-fava apresentam alto polimorfismo.
3. Na análise de ARDRA, a endonuclease *Ddel* apresentou maior grau de polimorfismo, com a endonuclease *HhaI*, este polimorfismo foi menor e a enzima *MspI* apresentou menor diversidade para diferenciar os isolados.
4. A enzima *Ddel* interferiu na forma de atuação das enzimas *HhaI* e *MspI*, de tal forma que apresentaram alta diversidade genética.
5. As análises das sequências de nucleotídeos da região 16S rDNA permitiram separar os 50 isolados e as seis estirpes de referência em grupos bem distintos. Os grupos mais bem caracterizados foram: *Sinorhizobium* ou *Ensifer*, *Rhizobium* sp NGR234, *Rhizobium tropici* CIAT899 e *Bradyrhizobium*
6. O grupo formado pelos isolados isol8, isol11, isol12, isol13 e isol45, apresentou identidade com bactérias do gênero *Burkholderia* da classe das β -proteobactérias.

AGRADECIMENTOS

A CAPES pela concessão de bolsa de mestrado ao primeiro Autor, ao CNPq pelo auxílio às pesquisas com *Phaseolus lunatus*, ao Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA.

REFERÊNCIAS

ARBER, W. Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution. **FEMS Microbiol Rev**, v. 24, p. 1-7, 2000.

BERINGER, J. E. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. **Journal Gen. Microbiol**, v. 84, p. 188-198, 1974.

BOIVIN, C.; N'DOYE, I.; MOLOUBA, F. et al. Stem nodulation in legumes: diversity, mechanisms, and unusual characteristics. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.16, p. 1-30, 1997.

DAVIS, M. J.; GILLASPIE JR. A. G.; VIDAVER, A. K. et al. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov. subsp. nov and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp.nov.; pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and Bermuda grass stunting disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.34, p.107-117, 1984.

EARDLY, B.D.; YOUNG, J.P.W.; SELANDER, R.K. Phylogenetic position of *Rhizobium* sp. strain Or 191, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, based on partial sequences of the 16S rRNA and *nifH* genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p.1809-1815, 1992.

FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, C. L.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N.P.; LYRA, M. C. C. P. Caracterização de rizóbios isolados de Jacatupé cultivado em solo salino no Estado de Pernambuco, **Bragantia**. v. 66, n.3, p. 481-490, 2007.

GILSON, E.; CLEMENT, J. M.; BRUTLAG, D.; HOFNUNG, M. A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA sequences in *E. coli*. **EMBO Journal**, v. 3, p. 1417-1421, 1984.

GILSON, E.; PERRIN, D.; HOFNUNG, M. DNA polymerase I and protein complex bind specifically to. *Escherichia coli* palindromic unit highly repetitive DNA: implications for bacterial chromosome organization. **Nucleic Acids Research**, v. 18, p. 3941-3952, 1990.

HARRISON, S.P.; MYTTON, L.R.; SKOT, L.; DYE, M.; CRESSWELL, A. Characterization of *Rhizobium* isolates by amplification of DNA polymorphisms using random primers. **Canadian Journal of Microbiology**, v.38, p.1009-1015, 1992.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L. M. O.; MENNA, P.; BANGEL, E.. V. **Caracterização Genética de Rizóbios e outras Bactérias Diazotróficas e Promotoras do Crescimento de Plantas por BOX-PCR**. Londrina, 2008. 12p. (Embrapa Soja: Comunicado Técnico, 79).

JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. **Evolution of protein molecules**. In Munro HN, editor, Mammalian Protein Metabolism, p. 21-132, Academic Press, New York, 1969.

KOEUTH, T.; VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J.R. Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. **Genome Research**, v.5, p.408-418, 1995.

LADHA, J.K.; PAREEK, R.P.; BECKER, M. Stem-nodulating legume-Rhizobium symbiosis and its agronomic use in lowland rice. **Advances in Soil Science**, New York, v.20, p. 148-192, 1992.

LAGUERRE, G.; ALLARD, M.R.; REVOY, F.; AMARGER, N. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.56-63, 1994.

MARTENS, M.; DELAERE, M.; COOPMAN, R.; DE VOS, P.; GILLIS, M.; WILLEMS, A. Multilocus sequence analysis of *Ensifer* and related taxa. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 489-503, 2007.

MARTIN B.; HUMBERT O.; CAMARA M.; GUENZI E.; WALKER J.; MITCHELL T.; ANDREW P.; PRUDHOMME M.; ALLOING G.; HAKENBECK R.; MORRISON D.A.; BOULNOIS G.J.; CLAVERYS J.P. 1992. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, v.20, p.3479–3483, 1992.

MEHTA, A; GONÇALVES, E. R.; ROSATO, Y. B. Classificação das bactérias fitopatogênicas utilizando técnicas baseadas em DNA. In: SERAFINI, L. A.; BARROS, N. M.; AZEVEDO, J. L.(edo). **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul: EDUCS, 2002. p. 133-163.

MENNA, P.; PEREIRA, A. A.; BARCELLOS, F. G.; BANGEL, E. V.; HESS, P. N.; MARTINEZ-ROMERO, E. rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. **Symbiosis**, v. 48, p. 120-130, 2009.

MENNA-PEREIRA, P. **Taxonomia e diversidade genética de rizóbios microssimbiontes de distintas leguminosas com base na análise polifásica (BOX-PCR e 16S RNAr) e na metodologia de MLSA**. 2008. 89f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2008.

MOREIRA, F.M. DE S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do solo**, 2. ed. Lavras, MG, p.449-471, 2006.

NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. **Ecologia do rizóbio em solos tropicais**. Seropédica: EMBRAPA/CNPAB, 1996. 27p. (EMBRAPA/CNPAB, Documentos, 23).

NIEMANN, S.; DAMMANN-KALINOWSKI, T.; NAGAL, A.; PÜHLER, A.; SELBITSCHKA, W.; Genetic basis of enterobacterial repetitive intergenomic consensus (ERIC)-PCR fingerprint pattern in *S. meliloti* and identification of *S. meliloti* employing PCR primers derived from an ERIC-PCR fragment. **Arch. Microbial**, v. 172, p. 22-30, 1999.

ORMEÑO-ORRILLO, E.; TORRES, R.; MAYO, J.; RIVAS, R.; PEIX, A.; VELÁZQUEZ, E. Z. *Phaseolus lunatus* is nodulated by a phosphate solubilizing strain of *Sinorhizobium meliloti* in a Peruvian soil. In: Velázquez, E.; Rodríguez-Barrueco, C. (Eds) **Developments in Plant and Soil Sciences**. Springer, Netherland, p.243-247, 2007.

ORMEÑO-ORRILLO, E.; VINUESA, P.; ZUNIGA-DAVILA, D.; MARTINEZ-ROMERO E. Molecular diversity of native bradyrhizobia isolated from (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 29, 253-226, 2006.

RADEMAKER, J. L. W.; HOSTE, B.; LOUWS, F. J.; KERSTERS, K.; SWINGS J.; VAUTERIN, P.; BRUIJN, F. J. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 665-677, 2000.

ROHLF, F. J. Note on Algorithm 81: **Dendrogram plot**. **Computer J.**, v. 18, p. 90-92, 1975.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406-425, 1987.

SANTOS, D.; CORLETT, F.M.F.; MENDES, J.E.M.F.; WANDERLEY JÚNIOR, J.S.A. Produtividade e morfologia de vagens e sementes de variedades de fava no estado da Paraíba. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.10, p.1407-1412, 2002.

SANTOS, J. O. **Divergência genética em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.):** Diversidade genética entre isolados nativos de rizóbios noduladores do feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). 2008. 97f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2008.

SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F.J. rep-PCR mediated genomic fingerprinting of rhizobia and computer-assisted phylogenetic patterns analysis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** , v.12, p.163-174, 1996.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical Taxonomy**. Freeman. San Francisco. 1973, 573 p.

SOKAL, R. R.; SNEATH, P. H. A. **Principles of Numerical Taxonomy**. Freeman. San Francisco, 1963. 359 p.

STERN, M. J.; AMES, G. F.; MITH, N. H.; ROBINSON, E. C.; HIGGINS, C. F. Repetitive extragenic Palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. **Cell**, v. 37, p. 1015-1026, 1984.

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

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res**, n. 11, v. 22, p. 46773-46780, 1994.

TRIPLETT, E.W.; HEITHOLT J.J.; EVENSEN, K.B.; BLEVINS D.G. Increase in internode length of *Phaseolus lunatus* caused by inoculation with a nitrate reductase-deficient strain of *Rhizobium* sp. **Plant physiology**, v.67, p.1-4, 1981.

UEDA, T.; SUGA, Y.; YAHIRO, N.; MATSUGUCHI, T. Phylogeny of sym plasmids of rhizobia by PCR-based sequencing of a *nodC* segment. **Journal of Bacteriology**, v. 177, p.468-472, 1995.

VAN BERKUM, P. Short sequence repeats in microbial pathogenesis and evolution. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.56, p.729-734, 1999.

VERSALOVIC, J.; DE BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R. In: DE BRUIJN, F. J.; LUPSKI, J. R.; WEINSTOCK, G. M. (eds) **Bacterial Genomes: Physical Structure and Analysis** Chapman and Hall, New York, 1997.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 6823-6831, 1991.

VERSALOVIC, J.; SCNEIDER, M.; De BRUIJN, F.J.; LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cell Biology**, v.5, p.25-40, 1994.

VIEIRA, R. F. A cultura do feijão-fava. **Informe Agropecuário**, v.16, n. 174, p.30-37, 1992.

VINUESA, P.; SILVA, C.; LORITE, M. J.; IZAGUIRRE-MAYORAL, M. L.; BEDMAR, E. J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from *rrs*, *atpD*, *recA* and *nifH* sequences, and their use in the classification of *Sesbania* microsymbionts from Venezuelan wetlands. **Syst Appl Microbiol**, v. 28, p. 702-716, 2005.

WATSON, R.J.; HAITAS-CROCKETT, C.; MARTIN, T.; HEYS, R. Detection of *Rhizobium meliloti* cells in field soil and nodules by polymerase chain reaction. **Canadian Journal of Microbiology**, v.41, p.815-825, 1995.

WEISBURG, W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study.

WILSON, L. A.; SHARP, P. M. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) Sequences in *Escherichia coli*: Evolution and Implication for Eric-PCR. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 6, p. 1156-1168, 2006.

YANG, H. H.; VINOPAL, R. T.; GRASSO, D.; SMETS, B. F. High diversity among environmental *Escherichia coli* isolates from a bovine feedlot. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.1528-1536, 2004.

YOUNG, J. M.; KUYKENDALL, L. D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; KERR, A.; SAWADA, H. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int. Journal Syst. Environmental Microbiology*, v.51, p. 89-103, 2001.

Tabela 1 - Características morfológicas e fisiológicas dos isolados de rizóbios, oriundos dos solos de Nova Esperança e Santa Rita, município de Água Branca, PI noduladores de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). (Santos, 2008).

Isolados	Origem ¹	Cultivar ²	FC ³	EL ⁴	CC ⁵	TC ⁶	FAA ⁷	FM ⁸	VM ⁹	EM ¹⁰	PB ¹¹
ISOL-1	NE	BM	R	C	BL	I	Ac	A	S	A	P
ISOL-2	NE	BM	R	C	T	R	Ac	P	P	P	A
ISOL-3	NE	BM	R	C	T	R	Ac	P	MU	P	P
ISOL-4	NE	BM	R	C	BL	R	Ac	P	M	A	P
ISOL-5	NE	BM	R	C	BL	R	Ac	P	MU	A	P
ISOL-6	NE	BM	R	C	BL	I	Al	P	M	A	P
ISOL-7	NE	BM	R	C	BL	I	Ac	P	M	P	P
ISOL-8	NE	BM	R	C	BL	R	Al	P	P	P	P
ISOL-9	NE	BM	R	C	BL	R	Ac	P	P	P	P
ISOL-10	NE	BM	R	C	BL	I	Ac	P	MU	A	P
ISOL-11	NE	BM	R	C	T	R	Ac	P	M	P	P
ISOL-12	NE	BM	R	C	BL	I	Al	P	P	P	P
ISOL-13	NE	BM	R	C	T	R	Al	P	P	A	P
ISOL-14	SR	BM	R	C	BL	I	Ac	P	MU	A	P
ISOL-15	SR	BM	E	C	BL	I	Ac	P	MU	A	P
ISOL-16	SR	BM	R	C	T	I	Ac	P	MU	P	P
ISOL-17	SR	FM	R	C	BL	I	Al	P	P	A	P
ISOL-18	SR	FM	R	C	T	I	Al	P	MU	A	P
ISOL-19	SR	FM	R	C	BL	I	Al	P	M	A	P
ISOL-20	SR	FM	R	C	T	I	Al	P	M	A	P
ISOL-21	SR	FM	R	C	BL	R	Ac	P	MU	P	P
ISOL-22	SR	FM	R	C	BL	I	Ac	P	MU	A	P
ISOL-23	SR	FM	R	C	BL	I	Al	P	MU	A	P
ISOL-24	SR	FM	R	C	BL	I	Al	P	M	A	P
ISOL-25	SR	FM	R	C	BL	I	Al	P	MU	A	P
ISOL-26	SR	FM	R	C	BL	R	Al	P	P	A	P
ISOL-27	SR	FM	E	C	BL	I	Ac	P	MU	A	P
ISOL-28	SR	FM	R	C	BL	R	Al	P	M	A	P
ISOL-29	SR	FM	R	C	BL	I	Al	P	M	A	P
ISOL-30	SR	FM	R	A	BL	R	Al	P	M	A	P
ISOL-31	SR	FM	R	A	BL	R	Al	P	M	A	P
ISOL-32	NE	FM	R	C	BL	I	Al	P	MU	A	P
ISOL-33	NE	FM	R	C	BL	I	Ac	P	MU	A	P
ISOL-34	NE	FM	R	C	BL	I	Ac	P	M	A	P
ISOL-35	NE	FM	R	C	BL	I	Al	P	MU	A	P
ISOL-36	NE	FM	R	C	BL	R	Ac	P	M	A	P
ISOL-37	NE	FM	R	C	BL	I	Al	P	MU	A	P
ISOL-38	NE	FM	R	A	BL	R	Ac	P	MU	A	P

Continua....

Tabela 1 - Características morfológicas e fisiológicas dos isolados de rizóbios, oriundos dos solos de Nova Esperança e Santa Rita, município de Água Branca, PI noduladores de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). (Santos, 2008). (Continuação).

Isolados	Origem ¹	Cultivar ²	FC ³	EL ⁴	CC ⁵	TC ⁶	FAA ⁷	FM ⁸	VM ⁹	EM ¹⁰	PB ¹¹
---ISOL-39	NE	FM	R	C	BL	R	Ac	P	MU	A	P
ISOL-40	NE	FM	R	A	BL	R	Ac	P	MU	A	P
ISOL-41	NE	FM	R	C	BL	R	Ac	P	MU	A	P
ISOL-42	NE	FM	R	C	BL	R	Al	P	MU	A	P
ISOL-43	NE	FM	R	C	BL	R	Al	P	P	A	P
ISOL-44	NE	FM	R	C	BL	R	Ac	P	MU	A	P
ISOL-45	NE	FM	R	A	BL	I	Ac	P	MU	A	P
ISOL-46	NE	FM	R	C	BL	I	Al	P	M	A	P
ISOL-47	NE	FM	R	C	BL	I	Ac	P	MU	A	A
ISOL-48	NE	FM	R	C	BL	R	Ac	P	MU	A	P
ISOL-49	NE	FM	R	A	BL	I	Ac	P	MU	A	A
ISOL-50	NE	FM	R	C	BL	I	Ac	P	UM	A	P

¹Localidade(NE:Nova Esperança-PI, SR:Santa Rita-PI); ²cultivar (BM:Boca de Moça (UFPI-491), FM:Fava Miúda (UFPI-468)); ³forma da colônia(R:redondas,E:elipsóide); ⁴elevação (C:convexa, A: achatada); ⁵cor (BL:Branca/leitosa,T:transparente); ⁶tempo de crescimento(R:rápido, I:intermediário); ⁷formação de ácido e álcalis (Ac: ácida, Al: alcalina); ⁸formação de muco (A: ausente, P: presente); ⁹volume do muco (S: seca, P: pouco, M: médio e MU: muito), ¹⁰elasticidade do muco (P: presença de fio, A: ausência de fio); ¹¹produção de bolhas (A: ausente, P: presente).

Quadro 1. Resultados da busca por similaridade no GENBANK com o programa BLAST dos 50 isolados de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.).

Isolados	Pares de Bases	Identidade	Gaps	e-value	Alinhamento mais significativo pelo NCBI
Isol1	1294	1107/1293 (85%)	66/1293 (5%)	0.0	<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315 chromosome 1, complete genome Length=3870082
Isol2	1319	293/385 (76%)	50/385 (12%)	1e-35	<i>Rhizobium etli</i> 8C-3 Cont2625, whole genome shotgun sequence.Length=2336
Isol3	1117	446/495 (90%)	15/495 (3%)	4e-178	<i>Leifsonia xyli</i> subsp. xyli str. CTCB07
Isol4	1297	1001/1216 (82%)	67/1216 (5%)	0.0	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021, complete genome.Length=3654135
Isol5	1295	996/1219 (81%)	72/1219 (5%)	0.0	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021, complete genome. Length=3654135
Isol6	1274	1241/1282 (96%)	24/1282 (1%)	0.0	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110, complete genome Length=9105828
Isol7	1212	546/664 (82%)	49/664 (7%)	2e-147	<i>Rhizobium etli</i> 8C-3 Cont2625, whole genome shotgun sequence Length=2336
Isol8	1297	1100/1295 (84%)	67/1295 (5%)	0.0	<i>Burkholderia phytofirmans</i> PsJN chromosome 2, complete sequence Length=3625999
Isol9	1301	1067/1313 (81%)	88/1313 (6%)	0.0	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099, complete genome.Length=7036071
Isol10	870	604/752 (80%)	59/752 (7%)	9e-144	<i>Burkholderia glumae</i> BGR1 chromosome 2, complete genome. Length=2827355
Isol11	983	501/582 (86%)	26/582 (4%)	2e-170	<i>Burkholderia phytofirmans</i> PsJN chromosome 1, complete genome Length=4467537
Isol12	1298	1093/1289 (84%)	65/1289 (5%)	0.0	<i>Burkholderia phytofirmans</i> PsJN chromosome 2, complete sequence Length=3625999
Isol13	1300	1093/1293 (84%)	72/1293 (5%)	0.0	<i>Burkholderia phytofirmans</i> PsJN chromosome 2, complete sequence Length=3625999
Isol14	1269	1214/1281 (94%)	27/1281 (2%)	0.0	<i>Rhizobium</i> sp. NGR234, complete genome Length=3925702
Isol15	1278	1225/1286 (95%)	24/1286 (1%)	0.0	<i>Rhizobium</i> sp. NGR234, complete genome Length=3925702
Isol16	1265	1240/1273 (97%)	16/1273 (1%)	0.0	<i>Rhizobium etli</i> IE4771 Cont2898, whole genome shotgun sequence Length=6526
Isol17	1273	1238/1282 (96%)	22/1282 (1%)	0.0	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278, complete genome. Length=7456587
Isol18	1272	1232/1274 (96%)	22/1274 (1%)	0.0	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110, complete genome. Length=9105828
Isol19	1265	1232/1281 (96%)	31/1281 (2%)	0.0	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110, complete genome Length=9105828
Isol20	1277	1240/1282 (96%)	21/1282 (1%)	0.0	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278, complete genome. Length=7456587
Isol21	1278	1227/1289 (95%)	37/1289 (2%)	0.0	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae 3841, complete genome Length=5057142
Isol22	1294	1002/1225 (81%)	68/1225 (5%)	0.0	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021, complete genome. Length=3654135
Isol23	1297	1007/1227 (82%)	68/1227 (5%)	0.0	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021, complete genome. Length=3654135
Isol25	1270	1197/1275 (93%)	25/1275 (1%)	0.0	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110, complete genome. Length=9105828

Continua na página seguinte

Isolados	Pares de Bases	Identidade	Gaps	e-value	Alinhamento mais significativo pelo NCBI
Isol26	1269	1240/1275 (97%)	15/1275 (1%)	0.0	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278, complete genome. Length=7456587
Isol27	1266	1248/1273 (98%)	16/1273 (1%)	0.0	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii WSM1325, complete genome Length=4767043
Isol28	1171	805/969 (83%)	51/969 (5%)	0.0	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021, complete genome. Length=3654135
Isol29	1300	976/1198 (81%)	66/1198 (5%)	0.0	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021, complete genome. Length=3654135
Isol30	1300	866/1041 (83%)	56/1041 (5%)	0.0	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae 3841, complete genome. Length=5057142
Isol31	1279	1210/1282 (94%)	33/1282 (2%)	0.0	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110, complete genome. Length=9105828
Isol32	1104	780/907 (85%)	56/907 (6%)	0.0	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110, complete genome Length=9105828
Isol33	1294	1079/1305 (82%)	82/1305 (6%)	0.0	<i>Rhizobium etli</i> 8C-3 Cont2625, whole genome shotgun sequence. Length=2336
Isol34	1297	873/1034 (84%)	50/1034 (4%)	0.0	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099, complete genome. Length=7036071
Isol35	1268	1238/1275 (97%)	16/1275 (1%)	0.0	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278, complete genome. Length=7456587
Isol36	1158	1059/1128 (93%)	36/1128 (3%)	0.0	<i>Rhizobium</i> sp. NGR234, complete genome Length=3925702
Isol37	1271	1234/1269 (97%)	13/1269 (1%)	0.0	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278, complete genome. Length=7456587
Isol38	1277	1228/1282 (95%)	19/1282 (1%)	0.0	<i>Rhizobium</i> sp. NGR234, complete genome Length=3925702
Isol39	1301	1008/1232 (81%)	75/1232 (6%)	0.0	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021, complete genome. Length=3654135
Isol40	1123	409/485 (84%)	29/485 (5%)	1e-123	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099, complete genome. Length=7036071
Isol41	1164	855/1023 (83%)	55/1023 (5%)	0.0	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099, complete genome. Length=7036071
Isol42	1209	858/1024 (83%)	43/1024 (4%)	0.0	<i>Rhizobium</i> sp. NGR234, complete genome Length=3925702
Isol43	1303	1055/1305 (80%)	83/1305 (6%)	0.0	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099, complete genome. Length=7036071
Isol44	1124	1020/1102 (92%)	46/1102 (4%)	0.0	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021, complete genome. Length=3654135
Isol45	1293	1065/1284 (82%)	60/1284 (4%)	0.0	<i>Burkholderia multivorans</i> CGD2M gcontig_1113105072100, whole genome shotgun sequence
Isol46	1132	951/1053 (90%)	61/1053 (5%)	0.0	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110, complete genome. Length=9105828
Isol47	1279	1146/1301 (88%)	71/1301 (5%)	0.0	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110, complete genome Length=9105828
Isol48	1306	999/1226 (81%)	76/1226 (6%)	0.0	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021, complete genome. Length=3654135
Isol49	1182	805/957 (84%)	38/957 (3%)	0.0	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021, complete genome. Length=3654135
Isol50	1126	812/965 (84%)	65/965 (6%)	0.0	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110, complete genome. Length=9105828

Isolados	Pares de Bases	Identidade	Gaps	e-value	Alinhamento mais significativo pelo NCBI
ER1	1310	1140/1322 (86%)	79/1322 (5%)	0.0	<i>Rhizobium</i> sp. NGR234, complete genome Length=3925702
ER2	1275	805/982 (81%)	67/982 (6%)	0.0	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021, complete genome Length=3654135
ER3	1078	650/783 (83%),	45/783 (5%)	0.0	<i>Rhizobium etli</i> CFN 42, complete genome Length=438160
ER4	1307	804/972 (82%)	54/972 (5%)	0.0	<i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419, complete genome Length=3781904
ER5	1132	358/435 (82%)	7e-96	0.0	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099, complete genome Length=7036071
ER6	1269	1237/1280 (96%)	27/1280 (2%)	0.0	<i>Rhizobium etli</i> CIAT 894 Cont2848, whole genome shotgun sequence Length=5841

5. CAPÍTULO II

EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ISOLADOS DE RIZÓBIO NODULADORES DE FEIJÃO-FAVA (*PHASEOLUS LUNATUS* L.)⁽¹⁾

Jadson Emanuel Lopes Antunes⁽²⁾ , Regina Lucia Ferreira Gomes⁽³⁾ , Ângela Celis de Almeida Lopes⁽⁴⁾ , Ademir Sérgio Ferreira de Araújo⁽⁵⁾ , Maria do Carmo Catanho Pereira de Lyra⁽⁶⁾ & Márcia do Vale Barreto Figueiredo⁽⁷⁾

RESUMO

Em leguminosas tropicais, a cuidadosa seleção de estirpes de rizóbio, entre outros fatores, é fundamental para a eficiência da fixação biológica de nitrogênio (FBN). Esta seleção deve ser feita para leguminosas de interesse social e econômico, entre elas o feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência simbiótica de rizóbios nativos de duas regiões do Piauí produtoras de feijão-fava. Foram avaliados 17 isolados e duas estirpes de referência, CIAT899 (*Rhizobium tropici*) e NGR234 (*R. sp.*), em casa de vegetação, utilizando-se vasos de

¹ Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA), Centro de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal do Piauí (UFPI).

² Mestrando do PPGA da Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Petrônio Portela, s/n, Bairro Ininga, 64049-550, Teresina, PI, Brasil. E-mail: jadsonemanuel@gmail.com

³ Departamento de Fitotecnia, CCA, UFPI, Teresina, PI, Brasil. E-mail: rifgomes@ufpi.edu.br

⁴ Departamento de Biologia, Centro de Ciências da Natureza (CCN), UFPI, Teresina, PI, Brasil. Bolsista de Produtividade de Pesquisa do CNPq. E-mail: acalopes@ufpi.edu.br

⁵ Departamento de Engenharia Agrícola e Solos. CCA, UFPI, Teresina, PI, Brasil. Bolsista de Produtividade de Pesquisa do CNPq. E-mail: asfaruaj@yahoo.com.br

⁶ Laboratório de Genômica, Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA), Av. San Martin, 1331, CEP: 50761-000, Bonji, Recife, PE. E-mail: maria.catanho@ipa.br

⁷ Laboratório de Biologia do Solo, Instituto Agronômico de Pernambuco / CARHP. Bolsista de Produtividade de Pesquisa do CNPq. E-mail: marcia.figueiredo@ipa.br

Leonard autoclavados, no delineamento experimental inteiramente ao acaso, com três repetições. A sub-amostra de feijão-fava utilizada foi a “UFPI-468”, cuja inoculação foi realizada por ocasião do plantio. Na coleta, realizada aos 34 dias após o plantio, foram avaliadas as seguintes características: massa seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e dos nódulos (MSN), relação MSPA/MSR, nitrogênio acumulado (Nac) na MSPA, pelo método de Kjeldahl segundo Bremner (1965), e a eficiência da fixação de N₂. Foi observado diferença significativa entre os isolados para todas as características, exceto para MSR. Em geral os isolados ISOL-18, ISOL-21, ISOL-23, ISOL-24, ISOL-25, ISOL-30, ISOL-32, ISOL-35, ISOL-36, ISOL-43, ISOL-45 e ISOL-50 apresentaram os melhores índices de MSPA, MSR, MSPA/MSR, Nac e eficiência da fixação de N₂ em relação aos isolados ISOL-2, ISOL-9, ISOL-16, ISOL-40 e testemunha absoluta. Os dados dos testes de eficiência mostraram que houve diferenças entre os isolados na FBN com o feijão-fava. As características avaliadas foram suficientes para discriminar e selecionar isolados eficientes na nodulação em feijão-fava, contribuindo para a efetividade da FBN. A maioria dos isolados avaliados, apresentaram bom desempenho no fornecimento do nitrogênio ao desenvolvimento das plantas, podendo ser recomendados para testes de eficiência agronômica.

Termos para indexação: fixação biológica do nitrogênio, nodulação, simbiose, *Bradyrhizobium* sp.

SYMBIOTIC EFFICIENCY OF RHIZOBIA ISOLATED FROM NODULES OF LIMA BEAN (*PHASEOLUS LUNATUS* L.)

SUMMARY

In tropical legumes, the careful selection of rhizobia strains, among other factors, is essential for the efficiency of biological nitrogen fixation (BNF). This selection should be made to the pulses of social and economic including the lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). The aim of this study was to evaluate the symbiotic effectiveness of rhizobia from two regions of Piauí producing lima bean. We evaluated 17 isolates and

two reference strains, CIAT899 (*Rhizobium tropici*) and NGR234 (*R. sp*) in a greenhouse, using autoclaved Leonard jars in a fully randomized experimental design with three replications. The sub-sample of lima bean used was the UFPI-468. Inoculation was done at time of planting. The collection was performed 34 days after planting, whereas the following characteristics: dry mass of shoot (SDM), root (MSR) and nodules (MSN), ratio DMAP / MSR, nitrogen accumulated (Nac) in ADM, Kjeldahl second Bremner (1965), and the efficiency of N₂ fixation. Significant difference was observed among the isolates for all characteristics except for MSR. In general isolates ISOL-18, ISOL-21, ISOL-23, ISOL-24, ISOL-25, ISOL-30, ISOL-32, ISOL-35, ISOL-36, ISOL-43, ISOL-45 and ISOL-50 showed the highest indices of DMAP, MSR, DMAP / MSR, Nac and efficiency of N₂ fixation in relation to isolated ISOL-2, ISOL-9, ISOL-16, ISOL-40 and absolute control. Data from the efficiency tests showed that there were differences among the isolates in BNF with the lima bean. The characteristics were sufficient to discriminate and select strains efficient nodulation in lima bean, contributing to the effectiveness of the BNF. Most isolates showed good performance in the supply of nitrogen in plant development can be recommended for testing agronomic efficiency.

Index Terms: biological nitrogen fixation, nodulation, symbiosis, *Bradyrhizobium sp.*

INTRODUÇÃO

Dentre os sistemas biológicos envolvendo plantas e microrganismos, a simbiose rizóbio-leguminosa é a de maior expressão econômica (Franco et al., 2002), trazendo benefícios para a sustentabilidade agrícola (Xavier et al., 2006) através do processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN).

Um grande número de espécies de leguminosas é capaz de se associar, simbioticamente, com bactérias fixadoras de nitrogênio denominadas, coletivamente, de rizóbio. Entretanto, a eficiência da fixação é variável, principalmente influenciada pela especificidade hospedeira. Na seleção de estirpes de rizóbios eficientes, várias etapas são necessárias, tais como a verificação da capacidade de nodulação da espécie, isolamento das bactérias, purificação das colônias e a avaliação da

eficiência em vasos com substratos esterilizados e solo não esterilizado (Faria & Franco, 2002).

A seleção de estirpes de rizóbio para diferentes leguminosas tem sido objeto de vários estudos (Neves et al., 1998a,b; Hungria et al., 2001; Hara & Oliveira, 2005; Zaman-Hallah et al., 2007). A seleção de estirpes eficientes para a FBN em feijão-fava deve considerar, além da eficiência da estirpe, características como habilidade de competição e sobrevivência no solo, capacidade de formação de nódulos, estabilidade genética e fixação na espécie alvo (Lima et al., 2005; Moreira & Siqueira, 2006; Zilli et al., 2006).

O número, a biomassa e o tamanho dos nódulos são indicadores usuais de nodulação (Ferreira & Castro, 1995) e constituem critérios utilizados para avaliação da simbiose rizóbios-leguminosas, fazendo parte, inclusive, do protocolo para avaliação da eficiência agrônômica de estirpes no Brasil pela Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola (RELARE) (Xavier et al., 2006). Além disso, Souza et al. (2008) definiram um conjunto mínimo de dados para avaliação da FBN, tais como, massa dos nódulos e da parte aérea e o total de N acumulado pela planta.

O feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) é das espécies do gênero *Phaseolus* com importância econômica para a região Nordeste do Brasil e apresenta a capacidade de realizar a FBN. Entretanto, os estudos sobre FBN, nesse gênero, têm focado principalmente o *P. vulgaris*, havendo, inclusive, estirpes de rizóbio recomendadas para uso comercial. Para o *P. lunatus* não há isolados ou estirpes selecionadas para a inoculação, devido, principalmente, a inexistência de trabalhos com isolamento, caracterização e seleção das bactérias nativas capazes de nodular a espécie (Santos, 2008).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência simbiótica de rizóbios nativos noduladores de feijão-fava.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido em casa de vegetação do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), de julho a agosto de 2009, sendo utilizados 17 isolados e duas estirpes de referencia, *Rhizobium tropici* IIB CIAT899 (BR322) e *Rhizobium* sp. NGR234 (BR2406). A CIAT 899 foi utilizada por ser atualmente recomendada pela RELARE para produção de inoculante comercial para a cultura do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) (Hungria et al., 1997; Chueire et al., 2003), que pertence ao mesmo gênero do feijão-fava. A NGR 234 foi utilizada por ser descrita como sendo uma estirpe que nodula mais de 112 gêneros de leguminosas (Trinick, 1980; Giller & Wilson, 1993). Tais estirpes foram cedidas pelo Laboratório de Genoma do IPA.

As classificações morfológicas e fisiológicas dos isolados utilizados neste estudo foram realizadas por Santos (2008) (Quadro 01). Os isolados de crescimento rápido e as estirpes de referência foram crescidos em duplicatas, em frascos de erlenmeyers de 125 mL, contendo 50 mL de meio líquido (YEM – manitol e extrato de levedura, Vincent, 1970) a 250 rpm e 28 °C por 72h. Os isolados de crescimento intermediário permaneceram nas mesmas condições por 120h. A concentração de bactérias utilizada foi de aproximadamente 10^9 UFC mL⁻¹, na fase de crescimento exponencial.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente ao acaso, com 20 tratamentos (17 isolados, duas estirpes de referência e uma testemunha absoluta (TA), sem nitrogênio e sem inoculação) e três repetições. Utilizou-se sementes de feijão-fava sub-amostra “UFPI-468”, de tegumento bege claro, oriunda do Banco Ativo de Germoplasma de Feijão-Fava (BAG de Feijão-Fava) da UFPI, como planta isca. As sementes foram desinfestadas com álcool a 70% por 30s, depois com hipoclorito de sódio a 2% por 60s, seguido de sete lavagens sucessivas com H₂O destilada autoclavada (Vincent, 1970). Para o cultivo das plantas foram utilizados vasos de Leonard contendo areia + vermiculita (pH 6,8), na proporção 2:1 (v:v), autoclavado por 1 hora, à temperatura de 120 °C, a 101kPa.

Quadro 1 - Características morfológicas e fisiológicas dos isolados de rizóbios, noduladores de feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.), oriundos dos solos de Nova Esperança e Santa Rita, município de Água Branca, PI. (Santos, 2008).

¹Localidade(NE:Nova Esperança-PI, SR:Santa Rita-PI); ²cultivar (BM:Boca de Moça (UFPI-

Isolados	Origem ¹	Cultivar ²	FC ³	EL ⁴	CC ⁵	TC ⁶	FAA ⁷	FM ⁸	VM ⁹	EM ¹⁰	PB ¹¹
ISOL-2	NE	BM	R	C	T	R	Ac	P	P	P	A
ISOL-9	NE	BM	R	C	BL	R	Ac	P	P	P	P
ISOL-16	SR	BM	R	C	T	I	Ac	P	MU	P	P
ISOL-18	SR	FM	R	C	T	I	Al	P	MU	A	P
ISOL-21	SR	FM	R	C	BL	R	Ac	P	MU	P	P
ISOL-23	SR	FM	R	C	BL	I	Al	P	MU	A	P
ISOL-24	SR	FM	R	C	BL	I	Al	P	M	A	P
ISOL-25	SR	FM	R	C	BL	I	Al	P	MU	A	P
ISOL-27	SR	FM	E	C	BL	I	Ac	P	MU	A	P
ISOL-30	SR	FM	R	A	BL	R	Al	P	M	A	P
ISOL-32	NE	FM	R	C	BL	I	Al	P	MU	A	P
ISOL-35	NE	FM	R	C	BL	I	Al	P	MU	A	P
ISOL-36	NE	FM	R	C	BL	R	Ac	P	M	A	P
ISOL-40	NE	FM	R	A	BL	R	Ac	P	MU	A	P
ISOL-43	NE	FM	R	C	BL	R	Al	P	P	A	P
ISOL-45	NE	FM	R	A	BL	I	Ac	P	MU	A	P
ISOL-50	NE	FM	R	C	BL	I	Ac	P	UM	A	P

491), FM:Fava Miúda (UFPI-468); ³forma da colônia(R:redondas,E:elipsóide); ⁴elevação (C:convexa, A: achatada); ⁵cor (BL:Branca/leitosa,T:transparente); ⁶tempo de crescimento(R:rápido, I:intermediário); ⁷formação de ácido e álcalis (Ac: ácida, Al: alcalina); ⁸formação de muco (A: ausente, P: presente); ⁹volume do muco (S: seca, P: pouco, M: médio e MU: muito), ¹⁰elasticidade do muco (P: presença de fio, A: ausência de fio); ¹¹produção de bolhas (A: ausente, P: presente).

As sementes foram inoculadas com 1 mL do meio de cultura e semeadas, efetuando-se o desbaste seis dias após, deixando-se duas plantas por vaso. O fornecimento de nutrientes às plantas foi realizado por capilaridade, utilizando-se a solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950), modificada conforme Silveira et al. (1998). Aos 12 dias após a semeadura, foi verificada a presença de larvas de trips, e

adultos de mosca branca causando danos às plantas. Como medida de controle, as plantas foram pulverizadas com óleo de Neem indiano, a 1% da NEEMSETO.

A coleta foi realizada aos 34 dias após plantio, sendo avaliadas as seguintes características: massa seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e dos nódulos (MSN), relação MSPA/MSR, nitrogênio acumulado (Nac) na MSPA, pelo método de Kjeldahl segundo Bremner (1965), e a eficiência da fixação de N₂. A parte aérea das plantas foi acondicionada em sacos de papel, deixados em estufa de circulação forçada a 65°C, durante 72 horas, para proceder à avaliação da massa seca da parte aérea (MSPA). Os nódulos foram secos nas mesmas condições anteriores e pesados, e as raízes, após coleta dos nódulos e limpeza de todos os resquícios de substrato, foram secas também em estufa a 65°C.

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F (P<0,05), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey (P<0,05), utilizando-se o programa estatístico SAEG, versão 8,0 (SAEG, 2000),

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maioria dos isolados (ISOL-18, ISOL-21, ISOL-23, ISOL-24, ISOL-25, ISOL-30, ISOL-32, ISOL-35, ISOL-36, ISOL-43, ISOL-45 e ISOL-50) apresentaram valores de massa seca da parte aérea (MSPA) semelhantes às estirpes de referência CIAT899 (*Rhizobium tropici*) e NGR234 (*R. sp.*) (Quadro 2). Os isolados ISOL-18, ISOL-30 e ISOL-32 destacaram-se por apresentar os maiores valores de MSPA do que os isolados ISOL-2, ISOL-9, ISOL-16, ISOL-40 e a testemunha absoluta (TA). Em comparação a TA, os isolados ISOL-18, ISOL-30 e ISOL-32 apresentaram valores aproximadamente duas vezes superiores.

A avaliação da MSPA representa um forte indicativo do estado nutricional das plantas, sendo importante por proporcionar à cultura grande potencial de produção (Souza et al., 2008, Xavier et al., 2006). Esta característica vem sendo utilizada na seleção de estirpes para composição de inoculantes (Zilli et al., 2006, Souza et al., 2008). Os resultados encontrados para a MSPA mostram que a maioria dos isolados proporcionaram um desenvolvimento adequado à cultura. Além disso, os valores de MSPA do feijão-fava com estes isolados foram semelhantes aos apresentados com a inoculação das estirpes de referência, indicando que os isolados apresentam

potencial para inoculação do feijão-fava, uma vez que as estirpes consideradas referências são utilizadas na maioria das pesquisas; sendo recomendadas para a produção de inoculante rizobiano em leguminosas, no Brasil (Chueire, 2000; Chueire et al., 2003; Hungria et al., 1997).

Para a massa seca das raízes (MSR), não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (Quadro 2), sugerindo que os isolados não exerceram influência sobre o crescimento radicular do feijão-fava.

Quadro 2 – Médias da massa seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MRS) e do nódulo (MNS), dos diferentes isolados de rizóbios inoculados em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.), sub-amostra UFPI-468.

Tratamentos	MSPA (g.vaso ⁻¹)	MRS (g.vaso ⁻¹)	MNS (g.vaso ⁻¹)
ISOL-2	2,58 cde	0,76 a	0,13 cde
ISOL-9	2,30 de	0,73 a	0,21 bcde
ISOL-16	2,00 e	0,65 a	0,06 de
ISOL-18	6,57 ab	0,75 a	0,63 abc
ISOL-21	5,66 abcd	0,75 a	0,48 abcde
ISOL-23	5,26 abcde	0,64 a	0,65 ab
ISOL-24	4,98 abcde	0,67 a	0,57 abc
ISOL-25	5,91 abc	0,77 a	0,65 ab
ISOL-27	3,70 bcde	0,83 a	0,51 abcd
ISOL-30	7,29 a	0,91 a	0,72 ab
ISOL-32	6,61ab	0,80 a	0,58 abc
ISOL-35	5,91 abc	0,89 a	0,54 abcd
ISOL-36	5,91 abc	0,76 a	0,66 ab
ISOL-40	2,81 cde	0,75 a	0,13 cde
ISOL-43	5,95 abc	0,77 a	0,66 ab
ISOL-45	5,97 abc	0,84 a	0,77 a
ISOL-50	5,25 abcde	0,78 a	0,70 ab
CIAT 899	5,15 abcde	0,70 a	0,63 abc
NGR 234	5,87 abc	0,78 a	0,66 ab
TA	2,90 cde	0,83 a	0,00 e
CV (%)	22,83	18,63	28,45

Na coluna, médias seguida pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Quanto à massa dos nódulos secos (MSN), observou-se diferença entre os tratamentos (Quadro 2), evidenciando que os isolados estudados diferem com relação à capacidade de formar nódulos no feijão-fava. Estes resultados discordam dos obtidos por Nogueira (2005), em feijão comum, que observou pequena variação

para a massa seca dos nódulos entre rizóbios. Tal diferença é em virtude dos longos estudos sobre avaliação de estripes em feijão comum e mostra a necessidade de se intensificar os estudos com isolados em feijão-fava.

As maiores médias para a MSN foram observados nos isolados ISOL-18, ISOL-21, ISOL-23, ISOL-24, ISOL-25, ISOL-27, ISOL-30, ISOL-32, ISOL-35, ISOL-36, ISOL-43, ISOL-45 e ISOL-50 e nas estirpes de referência (Quadro 2). As menores médias foram observados nos isolados ISOL-2, ISOL-16 e ISOL-40. Em TA, não foram encontrados nódulos, indicando que não houve contaminação pelos isolados avaliados.

O número e a massa dos nódulos são indicativos de nodulação (Ferreira & Castro, 1995; Araújo et al. 2007). Entretanto, a massa dos nódulos é mais útil na avaliação da nodulação por rizóbio em virtude da melhor correlação com o desempenho simbiótico (Döbereiner, 1966; Bohrer & Hungria, 1998; Hungria & Bohrer, 2000). Neste sentido, os isolados ISOL-23, ISOL-25, ISOL-30, ISOL-36, ISOL-43, ISOL-45 e ISOL-50 apresentaram melhor desempenho simbiótico com o feijão-fava.

O baixo valor de MSN dos tratamentos com os isolados ISOL-2, ISOL-16 e ISOL-40 pode ter ocorrido devido à baixa interação entre os isolados e o genótipo do feijão-fava utilizado. Moreira & Siqueira (2006) reportam que a formação dos nódulos varia em função dos genótipos das plantas e das estirpes ou isolados envolvidos nesta interação, além dos fatores ambientais. Provavelmente, o tamanho das sementes do genótipo de feijão-fava utilizado neste estudo pode ter sido um dos motivos para a baixa nodulação dos isolados ISOL-2, ISOL-16 e ISOL-40, conforme observado por Dobert & Blevins (1993) em *Phaseolus lunatus*.

As plantas de feijão-fava inoculadas com os isolados ISOL-18, ISOL-21, ISOL-23, ISOL-24, ISOL-25, ISOL-30, ISOL-32, ISOL-35, ISOL-36, ISOL-43, ISOL-45 e ISOL-50 mostraram maior relação MSPA/MSR do que os valores observados para os isolados ISOL-2, ISOL-9, ISOL-16, ISOL-27 e ISOL-40 (Quadro 3). Além disso, aqueles isolados apresentaram valores semelhantes às estirpes de referência. Em comparação com a testemunha, os isolados ISOL-18, ISOL-23, ISOL-30 e ISOL-32 apresentaram valores médios aproximadamente 2,5 superiores.

Quadro 3 – Médias da relação massa seca da parte aérea e da raiz (MSPA/MSR), nitrogênio acumulado na MSPA (Nac) e eficiência da fixação do nitrogênio dos diferentes isolados de rizóbios inoculados em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.), sub-amostra UFPI-468.

Tratamentos	MSPA/MSR (g.g ⁻¹)	Nac (mg.N.vaso ⁻¹)	Eficiência ⁽¹⁾ (%)
ISOL-2	3,20 def	28,94 de	89
ISOL-9	3,41 ef	41,11 cde	79
ISOL-16	3,06 f	20,17 e	69
ISOL-18	9,06 a	227,95 a	226
ISOL-21	7,49 abcde	162,87 abcd	195
ISOL-23	8,21 ab	223,86 a	181
ISOL-24	7,49 abcde	195,14 a	172
ISOL-25	7,82 abcd	205,16 a	204
ISOL-27	4,52 bcdef	97,21 abcde	127
ISOL-30	8,29 ab	219,04 a	251
ISOL-32	8,41 ab	205,63 a	229
ISOL-35	6,82 abcdef	201,48 a	204
ISOL-36	7,92 abc	177,56 abc	204
ISOL-40	3,77 cdef	44,22 bcde	97
ISOL-43	7,75 abcd	224,24 a	205
ISOL-45	7,07 abcdef	186,69 ab	206
ISOL-50	6,84 abcdef	170,56 abcd	181
CIAT 899	7,37 abcdef	193,40 a	177
NGR 234	7,36 abcdef	147,87 abcde	202
TA	3,47 def	29,95 de	100
CV (%)	21,80	30,34	

Na coluna, médias seguida pelas mesmas letras não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P < 0,05). ⁽¹⁾ Eficiência (MSPA trat/MSPA da testemunha absoluta x 100) (Faria & Franco, 2002).

Os isolados ISOL-18, ISOL-23, ISOL-24, ISOL-25, ISOL-30, ISOL-32, ISOL-35, ISOL-43 e as estirpes de referência CIAT899 e NGR234 proporcionaram maior acúmulo de N (Nac) nas plantas (Quadro 3), com valores superiores a 190mg.N.vaso⁻¹. Este aumento no Nac foi da ordem de sete vezes superior ao valor

obtido pela testemunha. Por outro lado, os isolados ISOL-2, ISOL-9, ISOL-16 e ISOL-40 proporcionaram o menor acúmulo de N para as plantas, com valores inferiores a 45 mg.N.vaso⁻¹.

Os resultados observados para o Nac indicam que os isolados ISOL-18, ISOL-21, ISOL-23, ISOL-24, ISOL-25, ISOL-27, ISOL-30, ISOL-32, ISOL-35, ISOL-36, ISOL-43, ISOL-45 e ISOL-50 apresentaram satisfatória capacidade de fixação de N, uma vez que não houve fertilização nitrogenada para a planta. Além disso, como o Nac nos tratamentos com estes isolados foi superior ao valor observado na testemunha absoluta, considera-se que a maior proporção de N encontrado nas plantas foi proveniente da fixação biológica do nitrogênio e uma pequena parte da reserva da semente (Fernandes et al., 2003).

A maioria dos isolados apresentaram eficiência simbiótica superior a testemunha (Quadro 3), com exceção dos isolados ISOL-2, ISOL-9, ISOL-16 e ISOL-40. Em relação à estirpe de referência NGR234, os isolados ISOL-18, ISOL-30 e ISOL-32 obtiveram os maiores índices de eficiência. Os isolados ISOL-18, ISOL-25, ISOL-30, ISOL-32, ISOL-35, ISOL-36, ISOL-43, ISOL-45 e a estirpe de referência NGR234 foram eficientes em fixar nitrogênio no feijão-fava, apresentando valores superiores em média duas vezes ao valor apresentado pela TA. O isolado ISOL-30 apresentou eficiência superior 2,5 vezes maior que a TA, 1,4 e 1,2 vezes maior que as estipes de referência CIAT899 e NGR234, respectivamente.

A maioria das características avaliadas correlacionou-se significativamente entre si (Quadro 4). A MSPA apresentou alta correlação com MSN, MSPA/MSR, Nac e eficiência. Epstein & Bloom (2006) relatam que o nutriente mais diretamente relacionado ao aumento da biomassa vegetal é o N. Dessa maneira, a presença de MSN satisfatória indica que os isolados acima descritos favoreceram uma maior eficiência na FBN, na medida em que disponibilizaram maiores quantidades de N as plantas de feijão-fava. Resultados semelhantes em feijão-caupi foram observados por Gualter et al.(2008) e Xavier et al. (2008).

Quanto à correlação entre a MSPA e MSN, os resultados foram semelhantes aos observados por Hungria & Bohrer (2000), em soja, que observaram alta correlação avaliando mais de 150 cultivares.

Quadro 4. Matriz de correlação entre a massa seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR), do nódulo (MSN), da relação (MSPA/MSR), nitrogênio acumulado na MSPA (Nac) e eficiência da fixação do nitrogênio avaliada nos isolados de rizóbios inoculados em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.), sub-amostra UFPI-468.

	MSR	MSN	MSPA/MSR	NAC	Eficiência
MSPA	0.3544	0.8891**	0.9504**	0,9369**	0.9999 **
MSR		0.1944	0.0635	0.1255	0.3550
MSN			0.8875**	0.9133**	0.8886**
MSPA/MSR				0.9614**	0.9501**
NAC					0.9369**

** Significativo a 5% de probabilidade.

Os isolados ISOL-18, ISOL-21, ISOL-23, ISOL-24, ISOL-25, ISOL-30, ISOL-32, ISOL-35, ISOL-36, ISOL-43, ISOL-45 e ISOL-50 (Figura 1), além de apresentarem os melhores índices para o Nac, foram superiores quanto aos acúmulos de MSPA e MSN, refletindo a correlação positiva entre estas características (Quadro 4). Correlações positivas e significativas entre a massa nodular e a quantidade de N fixado biologicamente foram relatadas também por Döbereiner et al. (1966), Santos (1987), Bohrer & Hungria (1998) e Fernandes & Fernandes (2000).

CONCLUSÕES

Os isolados ISOL-18, ISOL-21, ISOL-23, ISOL-24, ISOL-25, ISOL-30, ISOL-32, ISOL-35, ISOL-36, ISOL-43, ISOL-45 e ISOL-50 apresentam capacidade e eficiência na nodulação e fixação de N₂ em feijão-fava, sob condições estéreis. Estes isolados têm potencial para uso na composição de inoculantes para a cultura. Entretanto, estudos futuros devem ser conduzidos para avaliar a capacidade de fixação de N₂ dos isolados em condições de campo.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pela concessão de bolsa de mestrado ao primeiro autor; ao CNPq, pelo auxílio às pesquisas com *Phaseolus lunatus*; ao Instituto Agrônomo de Pernambuco - IPA.



Fotos: Jadson E. L. Antunes

Figura 1: Nodulação em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) por rizóbio: a)ISOL-18; b)ISOL-21; c)ISOL-23; d)ISOL-24; e)ISOL-25; f) ISOL-30; g)ISOL-32; h)ISOL-35; i)ISOL-36; j)ISOL-43; k) ISOL-45 e l) ISOL-50.

LITERATURA CITADA

- ARAUJO, F. F.; CARMONA, F. G.; TIRITAN, C. S. & CRESTE, J. E. Fixação biológica de N₂ no feijoeiro submetido a dosagens de inoculante e tratamento químico na semente comparado à adubação nitrogenada. *Acta Scientiarum Agronomy*, v.29, n.4, p.535-540, 2007.
- BOHRER, T.R.J. & HUNGRIA, M. Avaliação de cultivares de soja quanto à fixação biológica do nitrogênio. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.33, p.937-952, 1998.
- BREMNER, J. M. Total nitrogen. In: Black, C.A. (Ed.), *Methods of soil analysis chemical and microbiological properties, Part 2*. American Society of Agronomy, Madison, 1965. p.1149-1178.
- CHUEIRE, L. M. O.; NISHI, C. Y. M., LOUREIRO, M. F. & HUNGRIA, M. Identificação das estirpes de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* utilizadas em inoculantes comerciais para as culturas da soja e do feijoeiro pela técnica de PCR com “primers” aleatórios ou específicos. *Agric.Trop.*, 4: 80-95, 2000.
- CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E. V.; MOSTASSO, R. J.; PEDROSA, F. O. & HUNGRIA, M. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no seqüenciamento do gene 16S rRNA. *R. Bras. Ci. Solo*, 27:833-840, 2003.
- DÖBEREINER, J. Evaluation of nitrogen fixation in legumes by the regression of total plant nitrogen with nodule weight. *Nature*, v.210, p.850-852, 1966.
- DOBERT, R. C. & BLEVINS, D. G. Effect of seed size and plant growth on nodulation and nodule development in lima bean (*Phaseolus lunatus* L.). *Plant and Soil*, v. 148, p. 11-19, 1993.
- EPSTEIN, E. & BLOOM, A. J. Nutrição e crescimento. In: EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J. (Ed.) *Nutrição mineral de plantas*. Londrina: Planta, 2006. p. 251-286.
- FARIA, S. M. de & FRANCO, A. A. Identificação de bactérias eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies leguminosas arbóreas. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2002. 16 p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 158).

FERNANDES, M. F. & FERNANDES, R. P. M. Seleção inicial e caracterização parcial de rizóbios de tabuleiros costeiros quando associados ao guandu. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 24, p. 321-327, 2000.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M. & HUNGRIA, M. Seleção de rizóbios nativos para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros de Sergipe. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 38, n. 7, p. 835-842, 2003.

FERREIRA, E.M. & CASTRO, I.V. Nodulation and growth of subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) in soils previously treated with sewage sludge. *Soil Biology & Biochemistry*, v.27, p.1177–1183, 1995.

FRANCO, M. C.; CASSINI, S. T. A.; OLIVEIRA, V. R.; VIEIRA, C. & TSAI, S. M. Nodulação em cultivares de feijão dos conjuntos gênicos andino e meso-americano. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.37, n.8, p.1145-1150, 2002.

GILLER, K. E. & WILSON, K. J. Nitrogen fixation in tropical cropping systems. Wallingford, England: CAB, 1993. 313p.

GUALTER, R. M. R.; LEITE, L. F. C.; ARAÚJO, A. S. F.; ALCÂNTARA, R. M. C. M. & COSTA, D. B. Inoculação e adubação mineral em feijão-caupi: efeitos na nodulação, crescimento e produtividade. *Scientia agraria*, v. 9, n. 4, p.469-474, 2008.

HARA, F. A. S. & OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.40, n.7, p.667-672, 2005.

HOAGLAND, D.R. & ARNON, D.I. The water culture method of growing plants without soil. University of California, Berkeley, 1.ed, 32p, 1950.

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

HUNGRIA, M. & BOHRER, T.R.J. Variability of nodulation and dinitrogen fixation capacity among soybean cultivars. *Biology and Fertility of Soils*, v.31, p.45-52, 2000.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.; CHUEIRE, L.; GRANGE, L. & MEGÍAS, M. Symbiotic effectiveness of fast-growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brazil. *Biol. Fert. Soils*, v.35, n.5, p.387-394, 2001.

LIMA, A. S.; PEREIRA, J. P. A. R. & MOREIRA, F. M. S. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. de solos da Amazônia. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 40, n. 11, p. 1095-1104, 2005.

MOREIRA, F. M. S. & SIQUEIRA, J.O. Fixação Biológica do Nitrogênio, capítulo 9, p. 501-529. In: Microbiologia e Bioquímica do Solo. Editora UFLA, 2006. 729 p.

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

NEVES, M.C.P.; MARTINS, L.M.; XAVIER, G.R. & RUMJANEK, N.G. 1998b. Levantamento de estirpes de rizóbio capazes de nodular caupi (*Vigna unguiculata*) em solos do Nordeste do Brasil. II. Zona da Mata. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1998b, 8p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 47).

NEVES, M.C.P.; MARTINS, L.M.; XAVIER, G.R. & RUMJANEK, N.G. Levantamento de estirpes de rizóbio capazes de nodular caupi (*Vigna unguiculata*) em solos do Nordeste do Brasil. I. Sertão. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1998a, 10p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 46).

NOGUEIRA, C. O. N. Eficiência Agronômica de Rizóbios Selecionados e diversidade das Populações Nativas que Nodulam o Feijoeiro-comum em Formiga- MG. 2005. 84p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.

SAEG. Sistema para análises estatísticas e genéticas, versão 8.0, Viçosa-MG: Fundação Arthur Bernardes, 2000.

SANTOS, D. R. Seleção de estirpes de *Bradyrhizobium* sp. para fixação de dinitrogênio em caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), em solos salinizados do semiárido. 1987. 98 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Ciência do Solo) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 1987.

SANTOS, J. O. Divergência genética em feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.): Diversidade genética entre isolados nativos de rizóbios noduladores do feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.). 2008. 97f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2008.

SILVEIRA, J.A.G.; CONTADO, J.L.; MAZZA, J.L.M. & OLIVEIRA, J.T.A. Phosphoenolpyruvate carboxylase and glutamine synthetase activities in relation to

nitrogen fixation in cowpea nodules. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v.10, n.9, p.9–23, 1998.

SOUZA, R.A.; HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; MACIEL, C.D.; CAMPO, R.J. & ZAIA, D.A.M. Conjunto mínimo de parâmetros para avaliação da microbiota do solo e da fixação biológica do nitrogênio pela soja. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.43, n.1, p. 83-91, 2008.

TRINICK, M. J. Relationships amongst the fast-growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobial groups. *Journal of Applied Bacteriology*, 49:39-53, 1980.

VINCENT, J.M. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. *Oxford: Blackwell Scientific*, 1970. 164p. (*International Biological Programme Handbook*, 15).

WADISIRISUK, P. & WEAVER, R.W. Importance of bacteroid number in nodules and effective nodule mass to dinitrogen fixation by cowpeas. *Plant and Soil*, v.87, p.223-231, 1985.

XAVIER, G.R.; MARTINS, L.M.V.; RIBEIRO, J.R. de A. & RUMJANEK, N.G. Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. *Caatinga*, v.19, n.1, p.25–33, 2006.

XAVIER, T. F.; ARAÚJO, A. S. F.; SANTOS, V. B. & CAMPOS, F. L. Influência da inoculação e adubação nitrogenada sobre a nodulação e produtividade de grãos de feijão-caupi. *Ciência Rural*, v. 38, 2008.

ZAMAN-ALLAH, M.; SIFI, B.; L`TAIEF, B.; EL AOUNI, M. H. & DREVON, J. J. Rhizobial inoculation and P fertilization response in common bean (*Phaseolus vulgaris*) under glasshouse and field conditions. *Experimental Agriculture*, v. 43, n. 1, p. 67-77, 2007.

ZILLI, J.E. et al. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas do solo de cerrado em caupi. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.41, n.5, p. 811-818, 2006.