

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
Programa de Pós-graduação em Agricultura Tropical

CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE
NÓDULOS DE LEGUMINOSAS PARA
ESTABELECIMENTO DA COLEÇÃO DE CULTURAS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

LÍZIA LENZA CAMPOS

CUIABÁ - MT
2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
Programa de Pós-graduação em Agricultura Tropical

CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE
NÓDULOS DE LEGUMINOSAS PARA
ESTABELECIMENTO DA COLEÇÃO DE CULTURAS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

LÍZIA LENZA CAMPOS

Bióloga

Orientadora: Prof^a. Ph.D. MARIA DE FÁTIMA LOUREIRO

Co-Orientadora: Ph.D. MARIANGELA HUNGRIA

Tese apresentada à Faculdade de
Agronomia e Medicina Veterinária da
Universidade Federal de Mato Grosso,
para obtenção do título de Doutor em
Agricultura Tropical.

CUIABÁ - MT

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

C198c Campos, Lília Lenza
Caracterização de bactérias isoladas de nódulos de leguminosas para estabelecimento da coleção de culturas da Universidade Federal de Mato Grosso / Lília Lenza Campos. – 2008.
125p. : il. ; color. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Pós-graduação em Agricultura Tropical, 2008.

“Orientação: Profª. Ph.D. Maria de Fátima Loureiro”. “Co-orientação: Ph.D. Mariangela Hungria.”

CDU – 633.31/37-2.35

Ficha elaborada por: Rosângela Aparecida Vicente
Söhn – CRB 1/931

Índice para Catálogo Sistemático

1. Leguminosas – Plantas forrageiras – Agricultura
2. Leguminosas – Bactérias isoladas
3. Nódulos de leguminosas
4. Leguminosas tropicais
5. Leguminosas nativas – Pantanal – Poconé (MT)
6. Soja – Bactérias noduladoras
7. Solo - Rizóbios
8. Banco de germoplasma

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
Programa de Pós-graduação em Agricultura Tropical

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**Título: CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS
DE LEGUMINOSAS PARA ESTABELECIMENTO DA COLEÇÃO DE
CULTURAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO**

Autora: LÍZIA LENZA CAMPOS

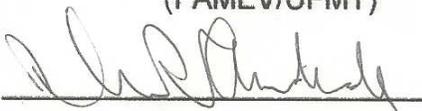
Orientadora: Ph.D. MARIA DE FÁTIMA LOUREIRO

Aprovada em 12 de DEZEMBRO de 2008.

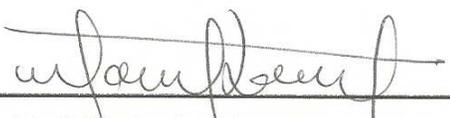
Comissão Examinadora:


Prof.^a. Dr.^a. Daniela T. da Silva Campos
(FAMEV/UFMT)


Prof.^a. Dr.^a. Márcia Matsuoka Rosa
(IUNMAT/UFMT)


Prof.^a. Dr.^a. Diva de Souza Andrade
(IAPAR)


Prof. Dr. Fábio Bueno dos Reis Júnior
(EMBRAPA/CPAC)


Prof.^a. Ph.D. Maria de Fátima Loureiro
(FAMEV/UFMT) (Orientadora)

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERIZAÇÃO DO PANTANAL

As áreas úmidas de regiões tropicais são de grande importância principalmente em relação aos ciclos hidrológicos e biogeoquímicos, bem como produtividade, diversidade e preservação de espécies ameaçadas de extinção (Embrapa-CPAP, 1991). A planície Pantaneira representa a maior planície fértil e irrigável do mundo (Amaral, 1986).

Segundo Adámoli (1987) o Pantanal é um conjunto de grandes planícies deprimidas, situadas na alta bacia do Paraguai. Ao longo dos séculos, essa depressão vem sendo preenchida com depósitos aluviais, aportados pelos diversos rios que formam o rio Paraguai. As particularidades fluviomorfológicas dos diversos rios determinam especificidades no que se refere ao modelo resultante influenciando diferentemente as características dos solos e da vegetação (Loureiro, 1994).

Devido a essas particularidades, estudos efetuados pela Embrapa Pantanal sugerem a existência de 11 pantanais (Silva, 1992) que são subdivisões do Pantanal em áreas individualizadas cada um com características próprias de solo, vegetação e clima: Cáceres, Poconé, Barão de Melgaço, Paraguai, Paiaguás, Nhecolândia, Abobral, Aquidauana, Miranda, Nabileque e Porto Murtinho (Amaral e Silva, 2007).

Como exemplo, o pantanal de Poconé é formado a quase totalidade dos aportes fluviais pelo rio Cuiabá que modela um leque assimétrico, evoluído sobre a sua margem direita. Com exceção do rio Bento Gomes, os outros rios da área são braços derivados da margem direita do Cuiabá, com relações funcionais mais ou menos ativas. Os solos de grande parte do pantanal de Poconé são argilosos, com um grau de fertilidade natural relativamente maior ao dos outros pantanais (Loureiro, 1994).

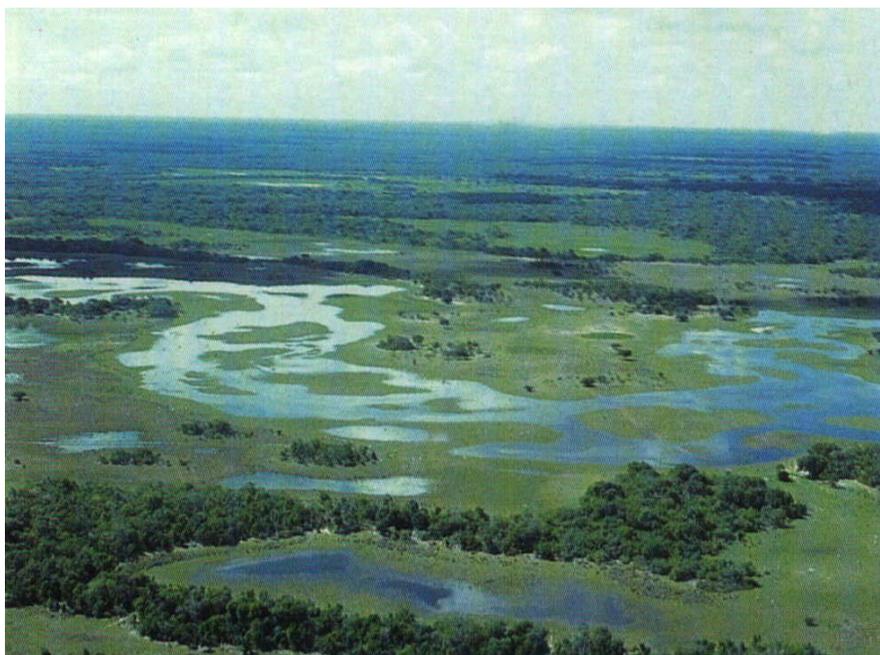


Fig. 1 - Pantanal de Poconé (Fonte: Google imagens)

Os solos, de modo geral, apresentam limitações à lavoura. Nas planícies pantaneiras sobressaem solos inférteis (lateritas) em áreas úmidas (hidromórficas) e planossolos, além de várias outras classes, todos alagáveis, em maior ou menor grau, e de baixa fertilidade. Nos planaltos, embora predominem também solos com diversas limitações à agricultura, sobretudo à fertilidade, topografia ou escassez de água, existem situações favoráveis (Amaral e Silva, 2007).

O pantanal de Nhecolândia ocupa a parte sul do gigantesco leque do rio Taquari, sendo a porção situada à esquerda do leito do rio. A grande particularidade deste pantanal é a ocorrência de depressões subcirculares com dimensões que variam desde poucas dezenas de metros até 1 a 2 km de diâmetro, localmente chamadas de baías quando são de água doce e de salinas quando são de água salgada (Loureiro, 1994).



Fig.2 - Pantanal Nhecolândia (Fonte: Google imagens)

1.1.1 Leguminosas nativas

Gênero *Discolobium*

Entre as leguminosas do gênero *Discolobium*, podemos citar: *D. pulchellum* (Allen e Valls, 1987; Pott, 1988; Loureiro, 1994; Loureiro et al., 1996), *D. psoraleaefolium* (Loureiro, 1994; EMBRAPA/CPAP, 1996) e *D. leptophyllum* (Pott, 1988). São espécies hidrófitas, pertencente à família *Leguminosae*, subfamília *Papilionoideae*, tribo *Aeschynomeneae* (Allen e Allen, 1981). São arbustos aquáticos emergentes, perenes. A parte aérea é renovada na estação chuvosa, 1 a 4 metros de altura, parte basal do caule engrossada e esponjosa. Apresenta floração quase todo o ano, mas em geral poucos frutos. É conhecida popularmente como cortiça ou pau-fofo. *D. pulchellum* apresenta ampla distribuição no Pantanal, ocorrendo com grande abundância nas planícies de inundação dos rios Paraguai, Negro, Abobral e Nabileque. Pode ser encontrada também no Paraguai e Argentina.

Destacam-se por suas vistosas flores amarelas, sendo consumidos por peixes, animais silvestres e pelos bovinos, onde o nível de alagamento

permite o acesso dos animais (Allen e Allen, 1981; Allen e Valls, 1987; EMBRAPA/CPAP, 1996; Loureiro et al., 1996).

Sua importância está relacionada com seu aproveitamento como adubo verde ou forragem (Allen e Valls, 1987) e, juntamente com *Arachis*, *Dolichopsis*, *Galactia*, *Rhynchosia*, *Teramnus* e *Vigna*, constitui uma das principais forrageiras das áreas argilosas (Pott, 1988) e apresenta alto teor de proteína bruta (Pott, 1988).

As plantas dessas espécies são capazes de formar nódulos em raiz e caule, sendo que os nódulos de caule têm necessidade obrigatória de estarem submersos e senescem muito rapidamente quando expostos ao ar (Loureiro, 1994). *Discolobium pulchellum* e *D. psoraleaefolium* formam nódulos verdadeiros de caule, pois os nódulos estão conectados com o sistema vascular do caule e não com o sistema de raízes adventícias originadas no caule. Os nódulos são esféricos, com ramificações no sistema vascular e apresentam cordão de infecção similar ao de *Aeschynomene fluminensis* (Loureiro et al., 1995). Os nódulos de caule e raiz de *Discolobium pulchellum* apresentam tecido infectado do tipo aesquinomenóide desmodióide (Corby, 1988), isto é, sem células não infectadas. As células infectadas nos nódulos de caule são vacuoladas, com cordões de infecção visíveis (Loureiro, 1994).

Gênero *Aeschynomene*

Pertence à família *Leguminosae*, subfamília *Papilionoideae*, tribo *Aeschynomene* (Faria et al., 1989). As espécies deste gênero são, essencialmente, tropicais, numerosas nas Américas, menos comuns na África, Ásia, Austrália e áreas do Pacífico. Aproximadamente a metade das espécies são hidrófitas tropicais, ocorrendo em cultivos de arroz inundado, pântanos e ao longo de lagos e margens de rios. São plantas dominantes e pioneiras em lagos e florestas alagadas tropicais e locais inundados (Allen e Allen, 1981). São registradas como nodulantes, 44 espécies (Faria et al., 1989) as quais 21 (Ladha et al., 1992) apresentam também a característica de formar nódulos no caule. Podem ocorrer em solo arenoso, siltoso ou

argiloso e em regime hidrológico seco, pouco alagado, muito alagado e aquático (Pott, 1988). Algumas espécies são utilizadas para o artesanato e outras para produção de balsas, material de pesca e canoas além do uso como forrageiras (Allen e Allen, 1981).

1.2 SISTEMAS DE PLANTIO

A implantação da cultura da soja pode ser realizada via Plantio Direto (PD) ou via Plantio Convencional (PC), porém, verifica-se que o Plantio Direto tem inúmeras vantagens sobre o Plantio Convencional, principalmente no que se refere a custos e produtividade (Vieira, 2002).

Nas regiões dos cerrados do Centro-Oeste do Brasil, o sistema plantio direto foi introduzido nos agroecossistemas em que a soja era a cultura principal, a partir dos anos 80, por produtores rurais pioneiros que já conheciam o sistema na Região Sul do Brasil (Vieira, 2002).

Procedeu-se a adoção do sistema plantio direto em substituição ao plantio convencional de preparo do solo, o qual demandava aração e gradagem superficial. Um dos maiores benefícios do arado é o controle de plantas daninhas, onde, por possibilitar o revolvimento do solo, ele permite a eliminação de plantas que cobrem uma área e, assim, possibilitar a semeadura e o crescimento de uma determinada planta de interesse para o cultivo (ex. milho, trigo), livre de concorrência por água e nutrientes com outra planta não desejável (como planta daninha, erva daninha, inço ou mato) (Guedes, 2008).

O solo arado fica livre de plantas daninhas, mas, ao mesmo tempo, ele fica livre de qualquer cobertura vegetal. Numa região tropical, onde se tem chuvas fortes e concentradas num período do ano, essa situação é ideal para a ocorrência da erosão, pois o impacto da gota da chuva num solo descoberto resulta num encrostamento ou selamento da superfície do solo. A fina crosta que se forma é suficiente para diminuir a infiltração de água no solo. Assim, a água da chuva se acumula e forma a enxurrada que carrega solo, semente e adubo para rios e lagos (Guedes, 2008).

Essas operações realizadas com frequência causam degradação do solo, tendo como consequência a erosão hídrica e eólica, o assoreamento das microbacias hidrográficas e o desequilíbrio ambiental como um todo, culminando com a progressiva queda do potencial produtivo dos agroecossistemas, principalmente na região do cerrado que apresenta clima com estação seca prolongada, altas temperaturas, e luminosidade; assim o revolvimento constante do solo e sua não cobertura permanente com palha acarretam acelerada decomposição e queima da matéria orgânica. A erosão eólica na estação seca também é intensificada, o que favorece a degradação do meio ambiente e as perdas de recursos financeiros (Vieira, 2002).

O sistema plantio direto, quando adotado seguindo os seus fundamentos de não-revolvimento do solo, rotação de culturas e coberturas permanente do solo, constitui-se em um meio de manter a diversidade e, por conseguinte, a estabilidade dos agroecossistemas. Esses sistemas melhoram o balanço energético do sistema de produção, reduz o risco de infestação de pragas e doenças, diminui a infestação de plantas daninhas e, em relação aos recursos disponíveis, como água, nutrientes e luz, são utilizados de forma mais eficiente (Vieira, 2002).

O plantio direto teve seu início na década de 60 com os trabalhos de Shirley H. Phillips e Harry M. Young Jr., em Kentucky- EUA (Saturnino, 2001). Todavia, o seu desenvolvimento ocorreu a partir da década de 70, com o surgimento do herbicida paraquat que veio substituir o preparo do solo no controle de plantas daninhas. Nessa mesma década o plantio direto foi introduzido no Brasil, na Região Sul (Rio Grande do Sul e Paraná).

A partir do final da década de 80, ocorreu grande evolução na indústria de máquinas e de herbicidas, o que proporcionou a expansão do uso do sistema de plantio direto, no Brasil, superou os 12 milhões de hectares com culturas anuais, sendo mais de 5 milhões somente nos cerrados (Saturnino, 2001).

Segundo Lombardi Neto et al. (1980) as principais razões para se adotar o sistema plantio direto na palha são: controle da erosão; menor

dependência do clima; menor desgaste de máquinas e equipamentos; maior agilidade e utilização do tempo; melhor equilíbrio biodinâmico do solo; maior produtividade das culturas; e melhor qualidade ambiental.

Uma das condições para se implantar o sistema plantio direto é o solo estar coberto com plantas que, quando mortas, produzam uma camada de palha na superfície do solo. Essa camada de palha sobre o solo proporciona ambiente extremamente favorável às condições físicas, químicas e biológica deste, contribuindo para controle de plantas daninhas, estabilização da produção e recuperação ou manutenção da qualidade do solo (Heckler et al, 1998; Alvarenga et al., 2001).

As principais fontes de palha são as gramíneas, como milho, sorgo, granífero, e forrageiro, milheto, aveia preta, aveia branca, arroz, trigo, centeio, triticale e as braquiárias. Outras espécies também podem ser utilizadas, porém de forma secundária ou durante o processo de desenvolvimento do sistema de rotação de culturas escolhido, podendo-se citar nabo forrageiro, crotalarias, mucuna, guandu, gergelim, niger, colza, girassol, quinoa e amaranto (Alvarenga et al., 2001).

A sustentabilidade das atividades agrícolas dependem, entre outros fatores, do potencial de impacto das tecnologias sobre os agroecossistemas em seus vários aspectos sociais, ambientais e econômicos (Carvalho, 1993; Kitamura, 1994).

Os agroecossistemas conduzidos de forma sustentável funcionam como um conjunto de processo em equilíbrio dinâmico, no qual seus mecanismos homeostáticos ativos funcionam como poder-tampão diante das agressões permitindo o autocontrole ou a rearmonização automática (Andrade, 1995).

Portanto, a sustentabilidade de agroecossistemas devem contemplar dimensões ecológicas, econômicas e sociais, envolvendo os aspectos de equidade estabilidade, resiliência e produtividade.

1.2.1 Soja (*Glycine max*)

O uso da soja como alimento humano é bastante antigo. Referências sobre essa cultura foram encontradas no ano de 3 mil a.C. na China. Essa cultura foi tão importante para o povo chinês, que se tornou a base da alimentação e por muitos anos se restringiu àquele país. No século XVII começou a se espalhar por outras regiões da Ásia, tais como Índia, Ceilão, Malásia, etc. (Campos e Canéchio Filho, 1987).

A soja chegou ao Brasil via Estados Unidos e a primeira experiência que se tem registro foi feita na Bahia em 1882, por Gustavo Dutra, então professor da Escola de Agronomia da Bahia (Campos e Canéchio Filho, 1987). Em 1891, testes de adaptação de cultivares semelhantes aos conduzidos por Dutra foram realizados no Instituto Agrônomo de Campinas, Estado de São Paulo (SP). Assim como nos EUA, a soja no Brasil dessa época era estudada mais como cultura forrageira - eventualmente também produzindo grãos para consumo de animais da propriedade - do que como planta produtora de grãos para a indústria de farelos e óleos vegetais. Foi no Rio Grande do Sul (RS), onde a cultura encontrou efetivas condições para se desenvolver e expandir, dadas as semelhanças climáticas do ecossistema de origem (sul dos EUA) dos materiais genéticos existentes no País, com as condições climáticas predominantes no extremo sul do Brasil (EMBRAPA/SOJA, 2004).

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) que hoje é cultivada mundo afora, é muito diferente dos ancestrais que lhe deram origem: espécies de plantas rasteiras que se desenvolviam na costa leste da Ásia, principalmente ao longo do Rio Amarelo, na China. Sua evolução começou com o aparecimento de plantas oriundas de cruzamentos naturais, entre duas espécies de soja selvagem, que foram domesticadas e melhoradas por cientistas da antiga China (EMBRAPA/SOJA, 2004).

Em Mato Grosso a soja foi introduzida no município de Rondonópolis, em 1972, por Adão Salles e teve seu lançamento oficial através do Dia de Campo de Soja realizado pela EMATER (Empresa de Assistência Técnica e

Extensão Rural) na Fazenda Ouro Verde, de propriedade do Sr° Hugo Krusner no município de Itiquira, às margens da BR 163, em 19 de março de 1977 (Paro, 1998).

Com a soja adaptada ao clima tropical e subtropical foi possível seu desenvolvimento em quase todo o Brasil em larga escala no início da década de 60, pois é uma cultura pouco exigente em relação ao solo, requerendo pouca humidade e baixa acidez. Trata-se de uma planta leguminosa que varia de 60 cm a 1,5 m de altura, herbácea, anual, ereta, pubescente de pelos brancos, pardo-queimados ou tostados. As folhas são geralmente ovais com três folíolos grandes e os frutos do tipo vagem, achatados curtos de cor cinzenta, amarelo-palha ou preta possuindo de 2 a 5 sementes. O sistema radicular se apresenta como raiz pivotante com ramificações ricas em nódulos de bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico (Campos e Canéchio Filho, 1987).

O nitrogênio (N) é o nutriente requerido em maior quantidade pela cultura, pois seus grãos são muito ricos em proteínas. As fontes de fornecimento dessas doses elevadas de N podem ser o solo, pela decomposição da matéria orgânica; a fixação não biológica, resultante das descargas elétricas e combustão; os fertilizantes nitrogenados; e o processo de fixação biológica de nitrogênio atmosférico (Hungria et al., 2001).

O reservatório de N presente na matéria orgânica do solo é limitado podendo ser esgotado em alguns anos de cultivo e ainda deve-se levar em consideração que a preservação da matéria orgânica com uma relação C(carbono)/N adequada é desejável para a sustentabilidade dos sistemas agrícolas; os fertilizantes nitrogenados, representam uma forma assimilada com maior rapidez, mas os custos são elevados, pois o processo industrial para obtê-los é dependente de petróleo e altas temperaturas (Hungria et al., 2001).

Portanto, para que a fixação biológica de nitrogênio na soja fosse possível, foi necessária a adição de rizóbios capazes de fixar o nitrogênio e ainda de tolerar as condições ácidas dos solos brasileiros, pois, assim como a planta, os rizóbios não ocorrem naturalmente nos solos brasileiros. Em

1960 inoculantes contendo essas estirpes, foram trazidos dos Estados Unidos e introduzidos nos solos brasileiros. Com o passar dos anos, programas de melhoramento desses rizóbios geraram estirpes (*Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkani*) que são recomendadas pelo Ministério da Agricultura (MAPA) trazendo grande produtividade por hectare produzido (Hungria et al., 2005).

De acordo com o exposto e considerando que a soja é uma das principais culturas de importância econômica sendo cultivada em grande parte do Brasil, o estudo da diversidade microbiana entre os fixadores de nitrogênio em leguminosas é de grande interesse para manutenção do sistema de cultivo sustentável.

1.3 DIVERSIDADE MICROBIANA

A biodiversidade pode ser definida como a variedade e variabilidade entre organismos vivos e os complexos ecológicos em uma dada área e compreende a diversidade de espécies, diversidade genética e diversidade de ecossistemas (Melo, 2002). Ou ainda pode se referir a todos os organismos na comunidade, porém é mais freqüentemente usada para se referir a um tipo ou grupo de organismos, dessa forma pode-se falar da diversidade de plantas, pássaros, mamíferos, fauna do solo.

Segundo Ferreira (2004), biodiversidade é a existência de uma grande variedade de espécies animais, vegetais e de microrganismos em determinado habitat natural, e de acordo com estudos baseados em árvores filogenéticas, a maior extensão de biodiversidade no mundo é microbiana (Hugenholtz et al., 1998).

Sendo os microrganismos os colonizadores pioneiros do planeta, se estabeleceram em associações compatíveis com organismos superiores, podendo estar presentes em habitats extremos de temperatura, pH, água e salinidade e em formas únicas de organismos microbianos e animais, o que aponta a versatilidade e importância dos microrganismos na sustentabilidade da vida (Johri et al., 2005) afetando a sociedade humana em diferentes maneiras (Sahin, 2006).

Estudos fisiológicos e de diversidade funcional dos microrganismos apontam inúmeras aplicações na agricultura, indústria, medicina e ambiente (Johri et al., 2005) e em especial para o desenvolvimento da biotecnologia, trazendo benefícios econômicos e estratégicos relacionados com a descoberta de microrganismos potencialmente úteis nos processos biotecnológicos (Canhos et al., 1998).

Apesar dos microrganismos por um lado, atuarem como agentes de doenças em animais, plantas e deterioração de produtos, por outro, são promissores como agentes de biocontrole e biorremediação (Shiomi et al., 2006).

Exercem papel relevante em associações mutualísticas na fixação biológica de nitrogênio atmosférico e micorrízicas, como também matéria-prima para enzimas, ácidos orgânicos, entre muitos outros produtos inexplorados (Melo e Azevedo, 1998).

Desempenham funções importantes na sobrevivência de outras espécies e na manutenção do equilíbrio entre elas, assim, a ocorrência de um microrganismo em determinado habitat é a expressão de sua reação às condições ambientais, dentro dos limites da bagagem genética possuída pelo microrganismo (Aquino e Assis, 2005).

Assim, os benefícios científicos esperados de um maior conhecimento sobre a diversidade microbiana incluem, entre outros, a melhor compreensão das funções exercidas pelas comunidades microbianas nos ambientes terrestres e suas interações. Fato que pode ser comprovado por diferentes estudos realizados por Maila et al. (2006), Yao et al. (2006), Drissner et al. (2007) e Elfstrand et al. (2007) que observaram mudança na diversidade das comunidades microbianas no solo quando este foi submetido a diferentes manejos, inferindo que o manejo adequado favorece a diversidade microbiana.

A compreensão do papel de microrganismos no ambiente também fornece subsídios para o estabelecimento de políticas de biossegurança, de projetos em agricultura sustentável e de programas de desenvolvimento industrial (Canhos, 1994).

Outro ponto a ser considerado é a atividade sócio-econômica como observado por Griffith (2003), Diniz-Filho et al.(2005) e Rangel et al. (2007) que encontraram correlações positivas da diversidade de espécies de plantas entre as variáveis socioeconômicas e atividades de agricultura e pecuária realçando que as ameaças à biodiversidade relacionadas à agricultura moderna estão concentradas nas regiões que são também importantes locais de conservação.

Apesar de exercer tanta influência sobre a humanidade, menos de 5% dos microrganismos do mundo são conhecidos, destes, em torno de um por cento foi efetivamente cultivados enquanto o restante (95%) ainda não foi sequer explorado (Manfio, 2003).

Em nível global, a diversidade de microrganismos excede, em algumas ordens de magnitude, a diversidade de plantas e animais sendo que todos os biomas terrestres dependem direta ou indiretamente da atividade dos microrganismos (Johri et al., 2005).

O Pantanal, o Semi-árido, os Cerrados e a Amazônia, por exemplo, são verdadeiros bancos naturais de recursos genéticos, que ainda estão sendo descobertos. Dado à sua grande importância, a caracterização e o estudo de espécies vegetais e de microrganismos em um contexto ecológico e evolucionário (Kassen e Rainey, 2004), deve se intensificar, especialmente quando as espécies estão em perigo de extinção (Valois, 1998).

Os avanços nas áreas de genômica e proteômica, em instrumentação e robótica, por meio de estudos de bioprospecção, seleção e triagem em larga escala, estão gerando novos materiais biológicos, variando de genes a organismos, visando à obtenção da síntese do conhecimento existente e propiciando novas aplicações biotecnológicas de microrganismos (Canhos, 2003).

Existem milhares de companhias voltadas para a biotecnologia que fazem grande progresso nos setores farmacêutico e agropecuário com centenas de compostos novos produzidos por células microbianas, mamíferos ou insetos geneticamente modificados e muitos desses produtos, já foram introduzidos no mercado (Hill e Sendashonga, 2006).

1.3.1 Modelos de Avaliação da Biodiversidade

A diversidade pode ser medida por intermédio de índices matemáticos, que levam em consideração informações taxonômicas na definição das unidades de medida (taxa). Alguns índices fornecem informações importantes a cerca do padrão de distribuição de espécies microbianas dentro do ecossistema (Zilli et al., 2003).

Embora as populações microbianas sejam extensas e geneticamente diversas, tanto o nível de diversidade quanto a extensão ecológica das populações relevantes, ainda são desconhecidos. Por esse motivo, os índices e simuladores são utilizados para ajudar a identificar o processo de evolução da diversidade microbiana e acabam por indicar mutações adaptativas e mesmo as não-adaptativas que foram disseminadas entre os grupos ou ficaram restritas a pequenos grupos genéticos. De acordo com esses índices, é possível encontrar altos níveis de diversidade microbiana nos ambientes (Mes, 2008).

Os índices de diversidade são a forma mais clássica de se fazer avaliações ecológicas. Pois, acredita-se que a diversidade de espécies é um indicador do status de um ecossistema ou comunidade microbiana (Fernandez-Alaez et al., 2002; Salas et al., 2005) e, em uma visão mais ampla, indicadores da qualidade biológica do ambiente (Gaston e Spicer, 2004). Além disso, quanto maior a diversidade maior a contribuição para estabilidade do ecossistema em questão (KieSSLing, 2005; Moore, 2005).

O índice de Shannon-Wiener (1949), já tradicionalmente designado como índice de Shannon, é a medida de diversidade mais consagrada (Rosso, 1996). Para Wihlm (1972), esta equação é a mais satisfatória dentre as desenvolvidas para diversidade específica e de dominância, pois expressa a importância relativa de cada espécie e não apenas a proporção entre espécies e indivíduos. Odum (1988) reportou que este é o índice que atribui um maior peso a espécies raras, prevalecendo, desta forma, o componente de riqueza de espécies (Peet, 1974).

O índice de Shannon-Wiener assume, também, que os indivíduos são amostrados ao acaso de uma população indefinidamente grande (Pielou, 1983) e que todas as espécies estão representadas na amostra coletada, sendo relativamente independente do tamanho da amostra. Segundo Hutcheson (1970) os dados obtidos se enquadram numa distribuição normal, desde que N seja um número inteiro, de modo que os métodos estatísticos podem ser empregados para testar a significância das diferenças entre as médias.

O índice de Simpson foi o primeiro a ser usado em estudos ecológicos e mostra a “concentração” de dominância, uma vez que, quanto maior o valor, maior a dominância por uma ou poucas espécies. Este índice exprime, basicamente, a abundância das espécies mais comuns, sendo, conseqüentemente, mais sensível a mudanças que ocorrem nestas espécies (Magurran, 1988).

Alguns autores sugerem o uso de índices mais sensíveis às mudanças na faixa de média a pequena abundância microbiana. Esses índices podem ser encontrados, por exemplo, na família dos índices de Hill e Hurlbert, que por sua vez, podem se associar ao índice de Shannon (Izsa'k, 2007.)

Esses índices ilustram as interações entre a diversidade microbiana e genética de populações microbianas, sendo cruciais para o complexo entendimento da genética nas comunidades microbianas (Mes, 2008).

1.4 RIZÓBIOS

Um dos mais importantes processos conhecidos na natureza e realizados apenas por microrganismos procariotos é o da fixação biológica de nitrogênio (FBN). A primeira publicação sobre a capacidade das bactérias realizarem a FBN e o produto deste processo ser absorvido pelas plantas foi descrita em 1888 sendo a primeira bactéria fixadora de nitrogênio atmosférico, também conhecida como diazotrófica, descrita em 1893.

Desde o começo essa descoberta gerou grande impacto e vasta literatura sobre o tema, sendo até hoje os rizóbios mais estudados. O uso de técnicas moleculares possibilitou a reclassificação e o conhecimento da grande diversidade nesse grupo de bactérias (Reis et al., 2006).

O termo rizóbio em senso estrito refere-se aos membros do gênero *Rhizobium*. Através dos anos, entretanto, o termo passou a ser usado para todas as bactérias capazes de nodular e fixar nitrogênio em associação com leguminosas (Moulin et al., 2001; Sy et al., 2001; Sadowsky e Graham, 1998; Sawada et al., 2003). Porém alguns estudos mostram que esses nódulos podem ser formados por outros gêneros bacterianos (Reis et al., 2006).

Os rizóbios não são todos iguais, em geral cada espécie leguminosa requer uma estirpe específica. A característica fenotípica que os distingue de outras bactérias é sua habilidade de infectar e permitir a formação de órgãos fixadores de nitrogênio principalmente nas raízes conhecidos como nódulos (Long, 1989; van Rhijn e Vyerleyden, 1995; Sadowsky e Graham, 2002) não sendo, porém, exclusividade das raízes, mas também podem ocorrer nos caules de plantas que passam por períodos de alagamento (Reis et al. 2006).

Apesar da simbiose estabelecida entre rizóbios e leguminosas ser a interação planta-hospedeiro mais estudada (Spaink et al., 1998; Sadowsky e Graham, 2002), o conhecimento a cerca da ecologia dos rizóbios é limitado e fragmentado (Sadowsky e Graham, 1998).

Os rizóbios cobrem um aspecto ecológico muito amplo: podem ser encontrados como saprófagos no solo, na água doce, vivem como rizobactérias na rizosfera de leguminosas e outras plantas, e em simbiose, se diferenciando em bacteróides (Brewin, 1998; Sadowsky e Graham, 1998).

De acordo com a descrição no Bergey's Manual (Garrity e Holt, 2001) a maioria dos rizóbios está assim classificada:

Domínio: Bactéria

Filo: Proteobactéria

Classe: α -proteobactéria

Ordem: Rhizobiales

Família: *Rhizobiaceae*; *Bartonellaceae*; *Brucellaceae*; *Phyllobacteriaceae*; *Methylocystaceae*; *Beijerinckiaceae*; *Bradyrhizobiaceae*; *Hyphomicrobiaceae*; *Methylobacteriaceae*; *Rhodobiaceae*.

Gênero: *Rhizobium*; *Agrobacterium*; *Allorhizobium*; *Carbophilus*; *Chelatobacter*; *Ensifer*; *Sinorhizobium*; *Bartonella*; *Brucella*; *Mycoplana*; *Ochrobactrum*; *Phyllobacterium*; *Aminobacter*; *Aquamicrobium*; *Delfuvibacter*; *Mesorhizobium*; *Pseudoaminobacter*; *Methylocystis*; *Albibacter*; *Methylosinus*; *Beijerinckia*; *Chelatococcus*; *Methylocella*; *Bradyrhizobium*; *Afipia*; *Agromonas*; *Blastobacter*; *Bosea*; *Nitrobacter*; *Oligotropha*; *Rhodoblastus*; *Rhodopseudomonas*; *Hyphomicrobium*; *Ancalomicrobium*; *Ancylobacter*; *Angulomicrobium*; *Aquabacter*; *Azorhizobium*; *Blastochloris*; *Devosia*; *Dichotomicrobium*; *Filomicrobium*; *Gemmiger*; *Labrys*; *Methylorhabdus*; *Pedomicrobium*; *Posthecomicrobium*; *Rodomicrobium*; *Rhodoplanes*; *Seliberia*; *Starkeya*; *Xanthobacter*; *Methylobacterium*; *Rhodobium*.

Um grande número de isolados tem sido observado como sendo capazes de nodular e fixar nitrogênio em leguminosas que estão filogeneticamente fora do grupo tradicional das α -proteobactérias. Esse grupo possui os genes *nod* que foram provavelmente obtidos por meio de transferência lateral (Moulin et al., 2001; Sy et al., 2001).

Informações recentes confirmam que muito mais bactérias capazes de nodular e fixar nitrogênio serão descobertas fora do grupo dos rizóbios. (Barret e Parker, 2005).

1.4.1 Fixação Biológica de Nitrogênio

O nitrogênio (N) é um elemento essencial para as plantas e limitante à produtividade agrícola. O grande reservatório de N é representado pelo gás atmosférico (cerca de 80%). Contudo, as plantas não possuem aparato enzimático para quebrar a tripla ligação da molécula e utilizá-la como fonte de proteína.

Entretanto, a fixação biológica do nitrogênio (FBN) é um processo bioquímico em que o nitrogênio atmosférico é incorporado diretamente às plantas após a quebra da tripla ligação do N por meio de um complexo enzimático, denominado nitrogenase.

Este processo ocorre no interior de estruturas específicas, denominadas de nódulos, onde os rizóbios convertem o N atmosférico em amônia, que é incorporada em diversas formas de N orgânico.

Por ser uma enzima redutora, a presença de oxigênio reprime a expressão da nitrogenase, por isso, os rizóbios possuem mecanismos de proteção para atuar no momento em que esse complexo está ativo. Além da presença de oxigênio, o excesso de N, presença de alguns aminoácidos essenciais, idade fisiológica e disponibilidade energética são fatores que inibem a atividade da nitrogenase (Reis et al., 2006).

A formação de um nódulo é resultante de um processo complexo, envolvendo diversos estádios. Inicialmente as sementes em germinação e as raízes exsudam moléculas que atraem quimicamente os rizóbios, outras que estimulam o crescimento das bactérias na rizosfera da planta hospedeira e outras que desencadeiam a expressão de diversos genes, tanto da bactéria como da planta hospedeira.

A seguir, as bactérias penetram na raiz e provocam o crescimento de células específicas da planta hospedeira, formando os nódulos onde ficarão alojadas. Quando os nódulos estão em plena atividade apresentam, em sua parte interna, coloração rósea intensa, devido à atividade da leghemoglobina, cuja função é o transporte do oxigênio essencial às funções vitais desses microrganismos aeróbios (Hungria et al., 2001).

A principal vantagem da FBN, no caso da soja, é do ponto de vista econômico. A inoculação das sementes com a bactéria específica substitui totalmente a adubação nitrogenada proporcionando uma economia para o país de 3 bilhões de dólares. Outras vantagens no caso de leguminosas nativas é o total aproveitamento do N fixado, não existindo perdas como podem ocorrer quando se empregam fertilizantes e o enriquecimento do solo com o nitrogênio (Araújo e Carvalho, 2006).

Portanto, a FBN é um processo que não polui o ambiente e, geralmente, promove um maior crescimento e desenvolvimento das plantas.

1.5 PRESERVAÇÃO MICROBIANA

1.5.1 Preservação *in situ* e *ex situ*

A conservação dos recursos naturais é uma prioridade nacional e a busca por um sistema de plantio que resulta em danos reduzidos ao ambiente cultivável como um todo é desejável. A adoção difundida dos sistemas de produção da soja em plantio direto, por exemplo, conseguiu grande sucesso por realçar a qualidade e a dinâmica da população microbiana no solo (Christoffoleti et al., 2007).

Considerando que grande parte das terras no Brasil está sob algum sistema de plantio, essas observações se tornam relevantes inclusive sob aspecto da conservação e exploração racional dos recursos naturais remanescentes. Práticas conservacionistas diminuem a necessidade de ampliação de áreas de cultivo ou pastoreio, que pressionam os ecossistemas envolvidos (Odalía-Rímoli et al., 2000).

Além da conservação dos recursos naturais, a conservação dos recursos genéticos, ganha espaço cada vez maior quando se trata de preservação do ambiente. Dentre as técnicas utilizadas para preservar recursos genéticos, pode-se ressaltar a conservação *in situ* (conservação das espécies na comunidade a que pertencem dentro do ambiente que estão adaptadas) e a *ex situ* que diz respeito à conservação das espécies fora do seu local de origem.

Na conservação *in situ*, praticam-se as modalidades de áreas protegidas, reservas genéticas, áreas de produtores tradicionais e áreas de populações indígenas (Valois, 1998).

Para o caso da conservação *ex situ*, as principais modalidades empregadas são: coleção de base, coleção ativa, coleção de trabalho, coleção a campo, coleção *in vitro*, coleção em criopreservação, coleção nuclear e banco genômico (Valois, 1998).

Essas coleções biológicas adquiriram crescente importância na atuação do Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT), pois sendo centros depositários de material biológico, as coleções abrigam não só os espécimes coletados e estudados, mas também as informações associadas aos indivíduos e às populações de cada espécie (Manfio, 2003).

Esses dados biológicos, quando relacionados a dados climáticos, meteorológicos, edáficos, entre outros, são essenciais tanto para a compreensão da vida no planeta (no passado e no presente) quanto para a projeção de cenários futuros, assim como para o entendimento de padrões de mudanças da biodiversidade e de seus impactos na sociedade, decorrentes da dinâmica dos sistemas naturais ou de intervenções humanas sobre o ambiente, a exemplo do entendimento do potencial impacto de queimadas e da liberação de organismos geneticamente modificados (Manfio, 2003).

Apesar desse tema só recentemente ter adquirido importância no cenário brasileiro, a primeira coleção de serviço microbiana que se tem registro, é a Coleção Kral, estabelecida em Praga, em 1890, com a finalidade de fornecer culturas puras para estudos comparativos e identificação de bactérias patogênicas. No início do século 20, outras coleções de serviço foram estabelecidas na Europa, Estados Unidos e Japão, com a finalidade de conservar e fornecer material de referência para estudos taxonômicos (Canhos, 2003).

Essas coleções passaram por um contínuo processo de evolução, visando atender demandas especializadas decorrentes dos avanços na microbiologia industrial (década de 60), biotecnologia (década de 80), engenharia genética e genômica (década de 90). Existem cerca de 470 coleções de culturas de microrganismos e células registradas no Centro Internacional de Dados da Federação Mundial de Coleções de Culturas (WFCC). Destas, cerca de 20 coleções abrangentes podem ser enquadradas como coleções de serviço e contam com forte respaldo governamental. As demais, cerca de 450, são classificadas como coleções

especializadas de trabalho ou coleções institucionais de acesso restrito (Valois, 1998; Canhos, 2003).

A Europa e a América do Norte juntas detêm 56% das coleções e 71% dos microrganismos depositados, enquanto que a maior diversidade se encontra fora dessas regiões. Há muitos exemplos de países ricos em biodiversidade podendo ainda ser encontrados, facilmente, de 20 a 30% de isolados novos para a ciência (Smith, 2003), porém sem políticas de preservação.

Essas coleções podem também servir de subsídio para montagem de bibliotecas metagenômicas, uma vez que têm importância reconhecida na descoberta de funções metabólicas de microrganismos não-cultiváveis (Stein et al., 1996; Rondon et al., 2000) e, em análises filogenéticas, além de diferentes tipos de metabólitos do solo já terem sido alvo desse tipo de técnica envolvendo oxidoredutases (Knietsch et al., 2003), lipases, amilases e nucleases (Rondon et al., 2000), clones com produção de antibióticos (Gillespie et al., 2002) e com propriedades hemolíticas (Rondon et al., 2000).

Neste sentido, as Coleções de culturas contribuem para o desenvolvimento científico e tecnológico, através da realização de atividades especializadas de serviço e suporte científico em microbiologia básica e aplicada entre outros.

Contudo, há necessidade de alternativas para subsidiar os centros de pesquisas (Koziell e Swingland, 2002) e políticas comuns devem ser adotadas para regulamentar as coleções de todo o mundo, facilitando a construção de novos centros de pesquisas nos países que ainda possuem riquezas de recursos genéticos ainda não exploradas (Smith, 2003).

1.5.2 – Agentes de Preservação

A preservação microbiana é o objetivo de pesquisadores. Muitos esquemas de preservação de culturas puras foram ensaiados e mais de 40 anos se passaram, desde a primeira demonstração de uma efetiva criopreservação. A partir de então, o potencial de estocagem de células

vivas, por longos períodos, rapidamente se tornou alvo de estudos em diversas áreas (McLellan e Day, 1995).

Métodos ideais de armazenamento de microrganismos necessitam promover a sobrevivência das células, bem como a pureza da cultura e a estabilidade de suas características. Alguns pesquisadores, no entanto, têm mencionado a ocorrência de alterações fenotípicas e/ou genotípicas em amostras mantidas em laboratório, as quais podem influenciar estudos, tipagem e a aplicabilidade destes organismos nos diversos setores (Takagi et al., 1997).

Para que seja preservado, o microrganismo deve ser isolado e cultivado, porém está provado que não é possível cultivar a maioria (99%) dos microrganismos conhecidos devido a um conhecimento limitado com relação à fisiologia do microrganismo, meio requerido e de outros fatores físico-químicos necessários para cultivo de microrganismos de diferentes nichos ambientais. Há uma necessidade de encontrar maneiras e técnicas novas para cultivo de microrganismos até então não-cultiváveis e de preservar os já cultiváveis (Cameotra, 2007).

A manutenção de culturas puras em longo prazo tanto da viabilidade quanto da atividade dos microrganismos é requerida para o desenvolvimento de técnicas tendo como base a célula para monitoramento ambiental. Para alcançar esses objetivos, várias técnicas como congelamento a -20° , congelamento a -80° , água destilada, nitrogênio líquido, liofilização, culturas contínuas e imobilização em polímeros orgânicos ou inorgânicos são utilizadas. Técnicas envolvendo sistemas com biosensores que podem ser aplicados em biochips ou fibras óticas são promissores para um futuro próximo (Bjerketorp, 2006; Ryan et al., 2000).

Culturas puras obtidas de coleções de referência são utilizadas em atividades de ensino, estudos taxonômicos, identificação de patógenos e testes de controle de qualidade de produtos e materiais (Canhos e Manfio, 2000).

Portanto, o material biológico conservado por métodos adequados nessas coleções mantém o microrganismo vivo podendo enfim, atender a

diferentes áreas como saúde, agropecuária, indústria, ambiente além de uma gama de conhecimentos associados, como procedimentos de isolamento, cultivo e manutenção dos organismos (Rodriguez - Valera, 2002).

A escolha da técnica a ser empregada na preservação deve ser definida a partir do objetivo e do microrganismo. Para curtos períodos de manutenção, quando se pretende o uso diário, meios enriquecidos e de formulação indefinida, como o meio extrato de levedura-peptona-dextrose (YEPD) e o ágar extrato de malte, ou ainda ágar nutriente, são comumente utilizados (Spencer e Spencer, 1996).

Para períodos longos de preservação, como em coleções de culturas, onde o acesso imediato é menos importante, devem-se buscar métodos que promovam melhor manutenção das características das espécies e das cepas, quando este é o objetivo primário (Spencer e Spencer, 1996).

O processo de liofilização de microrganismos envolve seu congelamento prévio a baixíssimas temperaturas seguido da secagem da amostra a vácuo. Para se obter bons resultados com a liofilização, alguns fatores devem ser observados, como a escolha do meio de crescimento da cultura inicial, do meio de reativação e a temperatura de pré-congelamento, entre outros (Rose, 1970).

Este processo é bastante agressivo e apresenta alguns efeitos indesejáveis, tais como a desnaturação de proteínas e o decréscimo da viabilidade de diversos tipos celulares. Mesmo assim, já foi utilizado com sucesso em diferentes isolados de nódulos de soja, caupi, alfafa, feijão e trevo e outras leguminosas de cobertura preservados por períodos de 3 a 4 anos e ainda mostraram habilidade em crescer, nodular e fixar nitrogênio em seus respectivos hospedeiros equivalente aos estoques padrões (Appleman e Sears, 1946).

Para se prevenir e reduzir estes efeitos adversos, substâncias protetoras tais como leite desnatado, sacarose, glicerol, dimetil sulfóxido,

entre outras, são comumente adicionados às amostras antes de serem congeladas ou liofilizadas (Diniz-Mendes et al., 1999).

O meio com leite desnatado pode ser utilizado como agente protetor e também na re-hidratação das células, com significativa melhora dos resultados (Abadias et al., 2001), porém, de acordo com Allievi e Salardi (1993) teste utilizando leite desnatado adicionado diretamente à cultura líquida de rizóbios utilizando duas temperaturas, mostrou que à -20°C o uso do leite desnatado foi de eficiência limitada; já a -80°C com ou sem leite desnatado a preservação foi eficiente, demonstrando que a temperatura sozinha é eficiente. Os resultados também demonstraram que a infectividade dos rizóbios foi mantida depois de estocado.

O dissacarídeo trealose foi mencionado como uma substância que apresenta um papel de reserva de carboidrato e como protetor da membrana citoplasmática contra secagem, congelamento e tensão de calor. Este carboidrato tem sido utilizado com sucesso na preservação de diferentes tipos celulares ao serem submetidos a tratamentos em baixas temperaturas.

Carvalho et al. (2004) e Streeter (2003), ressaltam que meios padrões, contendo glicose como fonte de carbono, não são eficientes na proteção do microrganismo contra a dessecação; sendo o uso de trealose mais recomendado, pois possibilita ao microrganismo o acúmulo do referido açúcar no interior do citoplasma, favorecendo a proteção.

O uso eficiente da trealose na preservação bacteriana foi comprovada por Pereira et al. (2002) para estirpes de *Rhizobium tropici* e *Rhizobium etli* após a liofilização utilizando 100 mM de trealose, e ainda sobreviveram por 12 horas mesmo sob condições não ideais para estoque, mostrando que o uso de trealose foi superior à combinação de sacarose e peptona como proteção para armazenamento.

Porém, essa estratégia só é possível, segundo Jules et al. (2004), se o microrganismo não utilizar o açúcar escolhido como fonte de energia. Essas recomendações são especialmente importantes para o congelamento rápido, forma preferida entre os métodos de conservação de coleções de cultura (Morgan et al., 2006).

A preservação em água destilada purificada é um método menos utilizado, porém com eficiência comprovada. Crist et al. (1984) observaram viabilidade e capacidade de nodular em 3 estirpes de *Rhizobium japonicum* e 2 estirpes de crescimento lento de caupi depois de estocados em água purificada em temperatura ambiente por um ano ou mais enquanto que 3 espécies de *Rhizobium* de crescimento rápido sob as mesmas condições não se mostraram viáveis. Avaliações em microscopia eletrônica indicaram que não houve grandes mudanças na morfologia durante o período de estocagem (Crist et al., 1984).

1.6 CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA

O conceito de espécie bacteriana é feito com base no quadro de origem vegetal e animal associadas as α -proteobactérias, levando em consideração as avaliações filogenéticas, taxonômicas, bem como a percepção dos microbiologistas. A abordagem filogenética é que dá uma perspectiva evolutiva da linhagem bacteriana; em nível individual, as características qualitativas biológicas utilizadas para a definição das espécies muitas vezes revelam falhas, porque muitas dessas propriedades são o resultado de co-evolução ou transferência horizontal de genes. No entanto, quando consideradas em conjunto, características taxonômicas e filogenéticas, uma definição concreta das espécies bacterianas pode ser concebida (Moreno, 2002).

As alterações adaptativas que ocorrem dentro de um indivíduo pode ser transferido horizontalmente para muitos ou todos os membros do grupo. Esta parece ser a condição correspondente ao processo evolutivo de muitas bactérias associativas em vegetais (Moreno, 2002).

Os estudos taxonômicos foram por muito tempo relegado em segundo plano devido a inúmeros problemas relativos à definição de espécies, especialmente quando se considera o estudo da taxonomia bacteriana. De fato a busca de organismos que possuem genes de interesse, tanto agrônomo quanto industrial, depende das metodologias de

classificação uma vez que estirpes relacionadas dentro de um táxon têm maiores possibilidades de também possuírem estas características de interesse. Este extenso campo de ação só pode ser mais bem compreendido no contexto da nova sistemática microbiana, surgida a partir da introdução e aplicação de novos conceitos taxonômicos e técnicas do final dos anos 50 e início dos anos 60 (Bull et al., 1992).

Esses estudos são necessários para facilitar a comunicação entre os cientistas e buscar um maior entendimento da biologia e evolução desta simbiose. De acordo com Haukka (1997), a filogenia pode ser definida simplesmente como uma história evolucionária de organismos e genes, cujo entendimento é um pré-requisito para estudos ecológicos e de genética de populações.

A identificação correta de um microrganismo de acordo com suas correlações filogenéticas ajuda a prever propriedades genotípicas e fenotípicas esperadas para cada espécie. Com o surgimento da taxonomia numérica, por permitir análise conjunta de dados fisiológicos e morfológicos, observou-se grande aplicabilidade destes estudos na avaliação da diversidade de diferentes grupos de microrganismos (Bull et al., 1992). Esse procedimento além de permitir um levantamento preliminar da diversidade presente no ambiente em estudo, fornece dados sobre a expressão de características fisiológicas que podem ser correlacionados com determinados fatores ambientais (Li et al., 2004).

O advento dos métodos moleculares baseados no estudo do genoma bacteriano também se constituiu uma fonte abundante de dados, passíveis de serem gerados sem a interferência de problemas técnicos importantes como condições de cultivo, estado fisiológico e outros fatores que, muitas vezes, mascaram os dados fenotípicos.

Com essa metodologia, tornou-se claro que o rizóbio era um grupo de bactérias bastante diverso, tanto em círculo de hospedeiras como em características fisiológicas e que havia algum tipo de correlação entre estas duas propriedades. O critério de classificação foi sendo modificado até obtenção de cinco gêneros baseados, principalmente, em experimentos de

hibridização de DNA: *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (Jordan, 1984), *Sinorhizobium* (Chen et al., 1988; de Lajudie et al., 1994), *Azorhizobium* (Dreyfus et al., 1988) e *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1997).

Comparações entre seqüências completas ou parciais de nucleotídeos do 16S rRNA tem sido utilizadas para avaliar a relação filogenética entre as diferentes espécies de *Rhizobium* (Lucas et al., 1995; van Berkum et al., 1998).

Na definição de novas espécies, recomenda-se o uso da “taxonomia polifásica”, a qual procura integrar diferentes tipos de informações, fenotípicas, genotípicas e filogenéticas, do microrganismo de interesse buscando uma classificação de consenso (Graham et al., 1991; Li et al., 2004).

1.6.1 Caracterização Molecular

O interesse renovado nos estudos de taxonomia microbiana deve-se muito ao desenvolvimento das técnicas de biologia molecular e iniciou-se com a aplicação dos métodos de taxonomia numérica, molecular e química, com o rápido desenvolvimento no campo do seqüenciamento do rRNA e dos genes que codificam para o rRNA (rDNA) e as técnicas de “fingerprinting” molecular. Com esse advento, foi possível determinar objetivamente as relações inter e intra-específicas de microrganismos (Straliotto e Rumjanek, 1999).

O desenvolvimento das abordagens moleculares levou à formação de diferentes tendências dentro da sistemática bacteriana, por exemplo, a elucidação de relações filogenéticas, estudos descritivos combinando informações filogenéticas e fenotípicas, estudos ecológicos com o objetivo de revelar espécies não-cultiváveis de microrganismos, ou mesmo evitar os procedimentos de cultivo nos estudos de ecologia microbiana do solo, e o desenvolvimento de metodologias de diagnose (Stackebrandt e Goebel, 1994).

Metodologias como a técnica de hibridização do DNA de colônias, com sondas ligadas a genes relacionados com a simbiose (Mercante et al., 1998) ou ainda outros tipos de marcadores moleculares, como as técnicas de reação de polimerização em cadeia (PCR) são bastante úteis no levantamento da biodiversidade do rizóbio baseado na pressuposição que as diferenças genéticas no DNA significam na maioria das vezes, diferenças fenotípicas (Faleiro, 2007).

Variações da PCR que utilizam primers complementares a seqüências de DNA de ocorrência natural altamente conservadas e repetitivas presentes em múltiplas cópias no genoma da maioria das bactérias, já foram identificadas com primers REP, ERIC e BOX. Dentre eles, os primers BOX são geralmente recomendados por gerar impressões mais robustas e produzir um padrão de fragmento mais complexo (Reis Junior et al., 2002).

De acordo com Fernandes et al. (2003) a análise por BOX-PCR revelou um alto grau de diversidade genética e a metodologia mostrou-se eficiente para diferenciar estirpes, mas não para a diferenciação de espécies de rizóbio. Pela técnica do RFLP (restriction fragment length polymorphism) da região do DNA que codifica o gene 16S rRNA e da região intergênica entre os genes 16S e 23S rRNA, com cinco enzimas de restrição, bem como pelo seqüenciamento parcial da região do 16S rRNA, foi possível classificar as estirpes nos gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*.

Alta diversidade fenotípica e genotípica também foi observada por Freitas et al. (2007) utilizando a técnica de BOX-PCR em rizóbios isolados de solos salinos no sertão de Pernambuco.

A identificação rápida e confiável de estirpes continua sendo o objetivo mais importante nos estudos taxonômicos, por isso a utilização das ferramentas da biologia molecular ainda é uma ótima alternativa. Porém a avaliação fenotípica contabilizando os efeitos ambientais e das interações genótipo versus ambiente continuarão sendo de grande importância e essenciais para subsidiar a utilização prática dos recursos genéticos nos sistemas de produção e nos programas de melhoramento (Faleiro, 2007).

1.6.2 Caracterização Fenotípica de Rizóbios

Os métodos fenotípicos clássicos ou tradicionais são usados nos protocolos de identificação da maioria dos laboratórios de microbiologia. Compreendem dados morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, os quais individualmente são considerados irrelevantes como parâmetros de relacionamento genético, mas coletivamente fornecem informações descritivas que permitem a distinção de diferentes taxa. As espécies de *Rhizobium* diferem significativamente no metabolismo de carbono e na utilização de diferentes substratos. A habilidade de utilizar glicose, sacarose, lactose, frutose, arabinose, succinato ou adipato pode servir como um teste diagnóstico na diferenciação das espécies de rizóbio (Graham et al., 1991).

O tempo de geração em meio contendo extrato de levedura, manitol e sais minerais (YMA) (Vincent, 1970) distingue os diferentes gêneros de rizóbio, sendo de 2 a 4 horas para *Rhizobium*, 6 a 10 horas para *Bradyrhizobium* e apresentando valores intermediários para *Mesorhizobium*. Como consequência, o tamanho das colônias em meio sólido varia de 2 a 4mm após 3 a 5 dias de incubação para *Rhizobium* e *Mesorhizobium* e até 1 mm após 5 a 7 dias para *Bradyrhizobium* (Graham et al., 1991).

Os gêneros de rizóbio descritos podem ser diferenciados com base em características culturais e morfológicas em meio YMA . Segundo Martins et al. (1997), os principais parâmetros utilizados são: tempo de crescimento em meio de cultura YMA, reação ácida ou básica em meio de cultura, diâmetro de colônia, produção de polissacarídeos extracelulares (goma) e coloração da colônia. Com relação ao tempo de crescimento podem, ser formados cinco grupos: muito rápido, para aquelas colônias que podem ser visualizadas após 1 dia de incubação; rápido, para aquelas que são visualizadas de 2 a 3 dias de incubação, intermediárias; com 4 a 5 dias; lentas, com 6 a 10 dias e muito lentas, são visualizadas após 10 dias de incubação (Melloni et al., 2006).

A alteração do pH do meio de cultura pode ser usada para dividir os isolados em três classes: estirpes que apresentam reação ácida, reação

básica ou reação neutra em meio de cultura. Meios de cultura como YMA recém preparadas com azul de bromotimol, possuem pH próximo a 6,8 e cor verde. Rizóbios de crescimento lento tendem a alcalinizar, modificando a cor para azul, enquanto os rizóbios de crescimento rápido tendem a acidificar o meio, alterando a cor para amarelo (Martins et al., 1997).

Tan e Broughton (1981) sugerem que as mudanças de pH promovidas pelo rizóbio no meio de cultura são devido à utilização preferencial de açúcares pelas estirpes de crescimento rápido, seguida da excreção de ácidos orgânicos, e de compostos nitrogenados pelas estirpes de crescimento lento e conseqüente liberação de cátions.

A produção de polissacarídeos extracelulares, também denominada de muco ou goma é outra característica utilizada na caracterização de rizóbio. As estirpes podem ser agrupadas em secas, quando não produzem goma, e quando ocorre formação de goma são classificadas quanto à quantidade produzida em: alta, média e baixa. Estirpes de crescimento rápido tendem a produzir mais goma, ao contrário de rizóbios de crescimento lento que formam colônias secas ou com baixa produção de muco (Martins et al., 1997).

A coloração da colônia varia dentro das diferentes estirpes de rizóbio, sendo uma importante característica no agrupamento de *taxa*. A coloração pode variar de incolor, branco a creme, sendo mais incomum a cor amarela (Araújo, 1994).

A avaliação das características culturais e morfológicas é o primeiro passo para a identificação de grupos taxonômicos de microrganismos, podendo prever uma boa aproximação em nível de gênero. Estes descritores podem indicar diferenças fisiológicas importantes entre microrganismos, que podem ser detectadas, posteriormente, mediante estudos mais refinados (Pelczar Júnior et al., 1997). Um exemplo é o gênero *Mesorhizobium*, no qual foram incluídos isolados que apresentavam algumas características fenotípicas diferenciadas do gênero *Rhizobium*, inclusive algumas estirpes que apresentam crescimento intermediário, sugerindo a existência de

diferenças metabólicas importantes (Moreira e Siqueira et al., 2006; Jarvis et al., 1997; de Lajudie et al., 1998).

É importante ressaltar que há uma grande variabilidade quando se analisa estas características, de modo que a possibilidade de análise do maior número possível de dados culturais, morfológicos e outras propriedades fenotípicas (tolerância a antibióticos, sorologia, análise de lipopolissacarídeos celulares, padrões protéicos, composição das paredes celulares, etc.) deve ser considerada (Vandamme et al., 1996). Trabalhos já foram publicados com base em características fenotípicas visando à caracterização de diferentes populações de rizóbio nodulando as mais diversas plantas hospedeiras (Swellim et al., 1997; Xavier et al., 1998).

Muitas destas características fenotípicas são estudadas com o objetivo não somente de caracterização, mas de verificar a provável adaptabilidade ecológica dos diferentes isolados às condições ambientais prevalentes no ecossistema para o qual se procede a seleção do rizóbio-inoculante. Além disso, busca-se correlacionar dados de diversidade metabólica com os de eficiência simbiótica, uma vez que ela deve refletir a diversidade dos mecanismos de controle das interações simbióticas entre espécies de rizóbio e as diferentes leguminosas (Batzli et al., 1992). Assim, tolerância às condições de salinidade (Swellim et al., 1997), pH (Swellim et al., 1997), temperatura (Sá et al., 1993; Mercante et al., 1998), antibióticos (Xavier et al., 1998) e etc., são variáveis analisadas "in vitro", como o objetivo de estabelecer correlações com a eficiência simbiótica dos isolados no campo.

Martins et al. (1997) tentaram correlacionar características fenotípicas, como tempo de crescimento em meio YMA e pH do meio de crescimento, e simbióticas, como atividade da hidrogenase, capacidade de fixação de nitrogênio e nodulação da soja, com as condições de solo e clima das regiões onde populações de rizóbio capazes de nodular o caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) foram isoladas. Entre outras conclusões, os autores observaram a maior ocorrência de estirpes de crescimento rápido em condições de clima semi-árido, apesar da planta ter como característica

nódulos formados por estirpes de *Bradyrhizobium*, de crescimento lento. Num outro estudo desta população de rizóbio, características fenotípicas tais como produção de muco e resistência a antibióticos foram relacionadas aos níveis de fósforo (P) e alumínio (Al) no solo (Xavier et al., 1998).

Em termos ecológicos, a análise de dados fenotípicos tem aplicabilidade restrita devido ao grande número de interações que ocorrem no sistema solo, tanto biótica como abióticas, especialmente quando se considera os microagregados do solo onde se alojam as populações bacterianas sob a influência do ambiente rizosférico. Estas interações dificultam as correlações entre os resultados em laboratório com os obtidos no campo. No entanto, em termos taxonômicos, após a introdução dos métodos de taxonomia numérica, a análise destes dados tornou-se imprescindível. (Reis Júnior et al., 2002)

Apesar da quantidade de dados genotípicos na literatura, a correlação destes com as características fenotípicas é uma das condições para a descrição de novos gêneros e espécies bacterianas. Além disso, estas análises de agrupamento facilitam o estudo comparativo do comportamento dos diferentes grupos, tanto intraespecíficos como interespecíficos, quanto às diferentes características no campo (Straliotto e Rumjanek, 1999).

Quanto à produção de muco, as estirpes de rizóbio, diferem tanto em quantidade de produção como em qualidade. De acordo com Dehio e Bruijn (1992), *Rhizobium* sp. fixador de nitrogênio dos nódulos de árvores leguminosas como a *Leucaena leucocephala* (leucaena) produz grandes montantes de exopolissacarídeos em meio contendo manitol.

Tittabutr et al. (2006) observaram que a expressão de genes específicos em meio salino onde determinada estirpe de *Sinorhizobium* sp., aumentou a produção de muco durante a fase exponencial e chegou ao nível máximo no meio da fase estacionária, mostrando que esses genes são requeridos para tolerância salina.

Em geral, os estudos das características culturais e morfológicas dos rizóbios costumam estar relacionados com estudos em nível de DNA sendo

fundamentais para se conhecer a diversidade das espécies (Martins et al., 1997).

1.6.2.1 Coloração de GRAM

Essa técnica foi desenvolvida por Hans Christian Joachim Gram, estudante de medicina que em 1884 desenvolveu um método para colorir e distinguir entre duas classes de bactérias, a Técnica de Gram, que ainda hoje é um procedimento padrão na microbiologia.

A coloração de GRAM é muito utilizada porque a maioria das bactérias cora-se por este método, permitindo observar sua morfologia e fornecendo informações a respeito do comportamento do material celular diante dos corantes básicos. Devido a estas vantagens esta coloração é também utilizada no estudo taxonômico das bactérias fixadoras de nitrogênio (Baldani et al., 1998; Ribeiro e Soares, 2002).

O mecanismo dessa coloração se refere à composição da parede celular, sendo que as GRAM-positivas possuem uma espessa camada de peptídeo-glucano, ácido teicóico e polissacarídeos. Nas bactérias GRAM-negativas o peptídeo-glucano constitui uma camada basal delgada, sobre a qual se encontra uma outra camada, composta por lipoproteínas, fosfolipídeos, proteínas e lipopolissacarídeos, denominada membrana externa.

A coloração de GRAM consiste em tratar bactérias previamente fixadas em lâminas, sucessivamente com cristal violeta, lugol, álcool e fucsina. O cristal violeta e o lugol penetram tanto nas bactérias GRAM-positivas quanto nas negativas, formando um complexo de cor roxa. O tratamento com álcool é a etapa diferencial. Nas bactérias GRAM-positivas o álcool não retira o complexo cristal violeta-lugol formado no espaço intercelular entre o peptídeo-glucano e a membrana plasmática, pois seu poder desidratante faz com que a espessa camada de peptídeo-glucano se torne menos permeável, retendo o complexo. Nas GRAM-negativas, devido à pequena espessura da camada de peptídeo-glucano, o complexo corado é

extraído pelo álcool, deixando as células descoradas e invisíveis mesmo ao microscópio óptico. O tratamento com a fucsina não altera a cor roxa das GRAM-positivas, ao passo que as GRAM-negativas, tornam-se avermelhadas (Jorge, 2001).

Segundo Trabulsi e Alterthum (2004), na etapa diferencial com álcool, as bactérias GRAM-negativas têm o complexo extraído pelo álcool devido às descontinuidades existentes entre a membrana externa e a membrana celular dessas bactérias.

1.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIAS M, TEIXIDÓ N, USALL J, BENABARRE A, VIÑAS I. **Viability, efficacy, and storage stability of freeze-dried biocontrol agent *Candida sake* using different protective and rehydration media.** J Food Prot., Lawrence, v.64, n.13, p.856-861, 2001.

ADÂMOLI, J. **Fisiografia do Pantanal.** Recursos Forrageiros Nativos do Pantanal Matogrossense. Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1987, 339p.

ALLEM, A.C.; VALLS, J.F.M. **Recursos Forrageiros Nativos do Pantanal Matogrossense.** Brasília:EMBRAPA/CENARGEN, 1987. (Documentos 8).

ALLEN, O.N.; ALLEN, E.K. The leguminosae: a source book of characteristics, uses and nodulation. Madison: University of Wisconsin, 1981, 604-607p.

ALLIEVI L.; SALARDI C. **Frozen storage (- 20 and - 80°C) of soybean *Bvadyrhizobium* cell suspensions.** Letters appl microbial. New York, v.16, p. 196-198, 1993.

ALVARENGA, R.C. **Plantas de cobertura de solo para sistemas de plantio direto.** Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v.22, n.208, p.25-36, 2001.

AMARAL, V.; SILVA, M.C.da. **Fazenda Rio Negro: tradição e conservação no pantanal Mato-grossense.** UNIDERP:Campo Grande, 2007, 116p.

AMARAL FILHO, Z.P. **Solos do Pantanal Matogrossense.** Corumbá: EMBRAPA/CPAP, 1986, 91-103p. (Documentos 5).

ANDRADE L. A. **Desenvolvimento sustentável: uma abordagem conceitual.** Debate, Viçosa, n 19, p.56-53, 1995.

- APPLEMAN, M.D.; SEARS, O.H. **Studies on lyophilized cultures:lyophile storage of cultures of rhizobium leguminosarum.** J. Bacteriol. Oxford, v. 52, n.2, p.209-211, 1946.
- AQUINO, A.M.; ASSIS, R.L. (ed). **Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável.** Brasília DF: Embrapa informação tecnológica, 2005. 368 p.
- ARAUJO, R. S. Caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica do rizóbio. In: HUNGRIA, M. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola.** Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 21-43 p.
- ARAÚJO, A.S.F. de; CARVALHO, E.M. de S. Fixação biológica de nitrogênio em leguminosas, n.11, p.1-4, 2006.
- BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; GOI, S.R.; SILVA, R.A. da; BALDANI, J.I.; DÖBEREINER, J. **Técnicas microscópicas aplicadas na identificação e localização de bactérias fixadoras de nitrogênio e biomacromoléculas em tecidos vegetais.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1998. 27p.
- BARRETT, C.F.; PARKER, M.A. **Prevalence of *Burkholderia sp.* Nodule symbionts on four mimosoid legumes from Barro Colorado Island, Panama.** Syst. appl. microbiol. Stuttgart, v. 28, n. 1, p.57-65, 2005.
- BJERKETORP, J., KANSSON, H., BELKIN, S., JANSSON, J.K. **Advances in preservation methods: keeping biosensor microorganisms alive and active.** Current Opinion in Biotechnology, New York, v. 17, n.1, p.43–49, 2006.
- BREWING, N. J. **Tissue y cell invasion by *Rhizobium*:the structure y development of infection threads y symbiosomes.** In: H. P.Spaink, A. Kondorosi, y P. J. J. Hooykaas (eds.). *The Rhizobiaceae.* Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 1998. 429p.
- BULL, A.T.; GOODFELLOW, M.; SLATER, J.H. **Biodiversity as a source of innovation in biotechnology.** Annual Review of Microbiology, Palo Alto, v.46, p.219-252, 1992.
- CAMEOTRA, S.S. **Preservation of microorganisms as deposits for patent application.** Bioch. and Bioph. Research Communications, Oxford, v. 353, n.14, p. 849–850, 2007.
- CAMPOS, T. de; CANÉCHIO FILHO, V. Cultura da Soja. In: CAMPOS, T. de; CANÉCHIO FILHO, V. Principais Culturas vol.II. Instituto Campineiro de ensino agrícola:Campinas, São Paulo, 1987. 289-314p.

CANHOS, V.P. **Informática para Biodiversidade: padrões, protocolos e ferramentas.** Ciência e Cultura, Rio de Janeiro, v.2, n.1, p. 45-47. 2003.

CANHOS, V.P. Views of a developing country. In: KIRSOP, B. e HAWKSWORTH, D.L. (Ed.) **The biodiversity of microorganisms and the role of microbial resource centers.** World Federation for Culture Collections. 1994, 45-52 p.

CANHOS, V.P. Microorganismos e biodiversidade de solos. 1998. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/chm/arquivos/gtt10.pdf>. Acesso em 14 de maio 2007.

CANHOS, V.P.; MANFIO, G.P. Microbial Resource Centres and *Ex-Situ* Conservation. In: PRIEST, F.G. e GOODFELLOW, M. (Ed.) **Applied Microbial Systematics.** Freising: Kluwer Academic Publishers. 2000. 421-446 p.

CARVALHO, A.S.; SILVA, J.; HO, P.; TEIXEIRA, P.; MALCATA, F.X.; GIBBS, P. **Effects of various sugars added to growth and drying media upon thermotolerance and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*.** Biotechnology Progress, v.20, n.9, p. 248–254, 2004.

CARVALHO H. M. **Desenvolvimento sustentável e padrões de sustentabilidade.** Cuiabá:PRODEAGRO, 1993. 37p.

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, Baltimore, v. 38, s/n, p. 392-397, 1988.

CHRISTOFFOLETI, P.J., de CARVALHO, S.J.P., LÓPEZ-OVEJERO, R.F., NICOLAI, M., HIDALGO, E., SILVA, J.E. **Conservation of natural resources in Brazilian agriculture: Implications on weed biology and management.** Crop Protection, Baltimore, v. 26, n.7, p. 383–389, 2007.

CORBY, H. D. L. **Types of rhizobial and their distribution among the Leguminosae.** Kirkia, Harare, v. 13, p. 53-123, 1988.

CRIST, D.K.; WIZA, R.E., MILLS, K.K., BAUER, W.D.; EVANS, W.R. **Preservation of *Rhizobium* viability and symbiotic infectivity by suspension in water.** Appl. Environm Microbiol. New York, v. 47, p. 895-900, 1984.

DEHIO, C.; de BRUIJN, F. J. **The early nodulin gene *SrEnod2* from *Sesbania rostrata* is inducible by cytokinin.** Plant Journal., Gainesville, v. 2, n.21, p.117, 1992.

DeLAJUDIE, P.; WILLENS, 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* and description of *Sinorhizobium meliloti* com. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov.** International Journal Systematic of Bacteriology, Baltimore, v.44, p.715-733, 1994.

DeLAJUDIE, P.; WILLWMS,A.; NICK, G.; MOREIRA, F.;MOLOUBA, F.; HOSTE, B.; TORCK,U.; NEYRA, M.; COLLINS, M.D.; LINDSTRÖM, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. **Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp.** International Journal of Systematic Bacteriology, Baltimore, v.48, n.6, p.369-382, 1998.

DINIZ-FILHO, J. A. F., DE SANT'ANA, C. E. R., BINI, L. M. **An eigenvector method for estimating phylogenetic inertia.** Evolution, Oxford, v.52, n.22, p. 1247–1262, 2005.

DINIZ-MENDES L, BERNARDES E, de ARAÚJO PS, PANEK, A.D., PASCHOALIN, V.M.F. **Preservation of frozen yeast cells by trehalose.** Biothechnol Bioengin., New York, v.65, n.10, p. 572-578, 1999.

DREYFUS, B.L.; GARCIA, J.L.; GILLIS, M. **Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov. s. nov., a stem noduling nitrogen fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*.** International Journal of Systematic Bacteriology, Baltimore, v. 38, n. 1, p. 89-98, 1988.

DRISSNER, D., BLUM, H., TSCHERKO, D., KANDELER, E. **Nine years of enriched CO₂ changes the function and structural diversity of soil microorganisms in a grassland.** European Journal of Soil Science, London, v. 58, n.4, p. 260–269, 2007.

EFSTRAND, S., HEDLUND, K., MARTENSSON, A. **Soil enzyme activities, microbial community composition and function after 47 years of continuous green manuring.** Applied Soil Ecology, New York, v. 35, n.5, p. 610–621, 2007.

EMBRAPA. Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal. **Ecologia de áreas alagáveis (atualização e discussão).** Corumbá: EMBRAPA/CPAP, 1991. 17p.

EMBRAPA. **Centro Nacional de Pesquisa Agropecuária do Pantanal-CPAP.** Pantanal. Corumbá, CPAP/SEBRAE, 1996. CD-ROM.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa Agropecuária de Soja – CNPSO. **Tecnologias de produção de soja – Região central do Brasil.** Soja. Londrina: EMBRAPA/CNPSO, 2004.

FALEIRO, F.G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007, 102 p.

FARIA, S.M.; LEWIS, G.P.; SPRENT, J.I.; SUTHERLAND, J.M. **Ocurrence of nodulation in the Leguminosae.** *New Phytologist*, Oxford, v.111, p.607-619, 1989.

FERREIRA, A.B.de H. (Ed.). **Miniaurélio: o dicionário da língua portuguesa.** São Paulo: Positivo, 2004. 896 p.

FERNANDES, M.F.; FERNANDES, R.P.M., HUNGRIA, M. **Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes em culturas do guandu e caupi.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v.38, n.8, p. 911-920, 2003.

FERNANDEZ-ALAEZ, C., de SOTO, J. FERNANDEZ-ALAEZ, M., GARCIA-CRIADO, F., **Spatial structure of the caddishfly (Insecta,Trichoptera) communities in a river basin in NW Spain affected by coal mining.** *Hydrobiologia*, v. 487, n. 2, p. 193–205, 2002.

FREITAS, A.D.S.; VIEIRA, C.L.; SANTOS, C.E.R.S.S.; STAMFORD, N.P.; LYRA, M.C.C.P. **Caracterização de rizóbios isolados de jacatupé cultivado em solo salino do estado de Pernambuco, Brasil.** *Bragantia*, Campinas, v.66, n.3, p.497-504, 2007.

GARRITY, G. M. e HOLT, J. G. The road map to the *Manual*. In: BOONE, D. R. e CATENHOLZ, R. W.,(eds.). **Bergey's manual of systematic bacteriology.** New York: Springer-Verlag, 2001. v.1, p. 119-166.

GASTON, K.J., SPICER, J.I. **Biodiversity: An Introduction.** 2 Ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2004, 183 p.

GILLESPIE, D.E.; BRADY, S.F.; BETTERMANN, A.D.; CIANCIOTTO,N.P., LILES, M.R.; RONDON, M.R. **Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA.** *Appl Environ Microbiol*, New York, v.68, n.25, p. 4301–4306, 2002.

GRAHAM, P.H.; DRAEGER, K.J.; FERRY, M.L. **Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria.** *International Journal of Systematic Bacteriology*, Baltimore, v. 41, n. 4, p. 582-587, 1991.

GRIFFITH, D. A. *Spatial autocorrelation and spatial filtering. Gaining understanding through theory and visualization.* Berlin: Springer. 2003

GUEDES, I.M.R. Por que a agricultura convencional não é sustentável. 2008. Em <http://scienceblogs.com.br/geofagos/2008/10/por-que-a-agricultura-convencional-nao-e-sustentavel.php>. Acessado em março de 2009.

HAUKKA, K. **Genetic diversity and phylogeny of rhizobia isolated from tropical tree legumes**. 1997. 176f. Dissertação de mestrado - Helsinki: Department of Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki, 1997.

HECKLER, J.C.; HERNANI, L.C.; PITOL, C. **Palha**. In: SALTON, J.C.; HERNANI, L.C. & FONTES, C.Z. Sistema de plantio direto. Brasília, Embrapa-Agropecuária Oeste, 1998. p. 38-49.

HILL, R., & SENDASHONGA, C. **Conservation Biology, Genetically Modified Organisms, and the Biosafety Protocol**. Conservation Biology. v. 20, n.15, p. 1620–1625, 2006.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B. M.; PACE, N. **Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity**. Journal of Bacteriology, Washington v. 180, n. 18, p. 4765 – 4774, 1998.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **Fixação biológica de nitrogênio na cultura da soja**. EMBRAPA/CNPQSO:Londrina, 2001, 116p.

HUNGRIA, M.; LOUREIRO, M.F.; MENDES, I.C.; CAMPO, R.J.; GRAHAM, P.H. **Inoculant preparation, production and application**. In: WERNER, D.; NEWTON, W.E. (eds) Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology and the environment. Springer:Netherlands. 2005. 223-253p.

HUTCHESON, K. **A test for comparing diversities based on the Shannon formula**. Journal of Theoretical Biology, v.29, p. 151-154, 1970.

IZSA'K, J. **Parameter dependence of correlation between the Shannon index and members of parametric diversity index family**. Ecological Indicators, Amsterdam, v.7, p.181-194, 2007.

JARVIS, B. D. W., van BERKUM, P., CHEN, W. X., NOUR, S. M., FERNANDEZ, M. P., CLEYET-MAREL, J. C.; GILLIS, M. **Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum* and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov.** International Journal of Systematic Bacteriology, Baltimore, v. 47, n. 3, p. 895-898, 1997.

JOHRI, B.N.; GANGULY, B.N.; GOEL, S.K.; VIRDI, J.S.; TRIPATHI, A.K.; JAIN, R.K.; KAMRA, D.N.; BHATNAGARS, A. **Microorganism diversity:**

Strategy and action plan. Current Science, Amsterdam, v. 89, n.1, p.151-154, 2005.

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

JORGE, A.O.C. Microbiologia atividades práticas. Santos:São Paulo, 2001. 146p.

JULES, M., GUILLOU, V., FRANCOIS, J., PARROU, J.-L. Two distinct pathways for trehalose assimilation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol., Washington, v.70, n.20, p. 2771–2778, 2004.

KASSEN, K. & RAINEY, P.B. **The ecology and genetics of microbial diversity.** Annu. Rev. Microbiol., Washinton, v. 58, n.6, p. 207–31, 2004.

KIESSLING, W. **Long-term relationships between ecological stability and biodiversity in Phanerozoic reefs.** Nature, v. 433, p. 410–413, 2005.

KIRSOP B.E.& SNELL J.J.S. **Maintenance of Microorganisms, a Manual of Laboratory Methods.** London: Academic Press Inc., 1984, 240 p.

KITAMURA P. **A agricultura e o desenvolvimento sustentável.** Agricultura Sustentável, v.1, p. 27-32, 1994.

KNIETSCH, A.; WASCHKOWITZ, T.; BOWIEN, S.; HENNE, A.; DANIEL, R. **Metagenomes of complex microbial consortia derived from different soils as sources for novel genes conferring formation of carbonyls from short-chain polyols on *Escherichia coli*.** J Mol Microbiol Biotechnol,Oxford, v.5, n.2, p.46–56, 2003.

KOZIELL I. & SWINGLAND, I.R. **Collateral biodiversity benefits associated with 'free-market' approaches to sustainable land use and forestry activities.** Phil. Trans. R. Soc. Lond, v.360, n.21, p.1807-1816, 2002.

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, n.5, v.20, p.148-192, 1992.

LI, Q.; ALLEN, H.L.; WOLLUM II, A.G. **Microbial biomass and bacterial functional diversity in Forest soils: effects of organic matter removal, compaction and vegetation control.** Soil Biology and biochemistry, Oxford, v.36, p.571-579, 2004.

LOMBARDI NETO, F.; BELLINAZZI JÚNIOR, R.; LEPSCH, I.F.; OLIVEIRA, J.B. de.; BERTOLINI, D.; GALETI, P.A.; DRUGOWICH, M.I. **Terraceamento**

agrícola. Campinas: Coordenadoria da Assistência Técnica Integral, 1991. 38p. (*Boletim técnico*, 206)

LONG, S. R. *Rhizobium-legume nodulation: Life together in the underground*. Cell, v. 56, p.203-214, 1989.

LOUREIRO, M.F. **Caracterização das estirpes de rizóbio e morfologia dos nódulos de raiz e caule de *Aeschynomene* spp. e *Discolobium* spp. nativas do Pantanal Mato-Grossense**. 1994. 205p. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1994. 205p. (Tese de Doutorado).

LOUREIRO, M.F.; JAMES, E.K.; SPRENT, J.I.; FRANCO, A.A. **Stem and root nodules on the tropical wetland legume *Aeschynomene fluminensis***. New Phytol., Oxford, v.130, s/n., p.531-544, 1995.

LOUREIRO, M. F.; JAMES, E. K.; POTT, A.; Ocorrência de nodulação em leguminosas do Pantanal Mato-Grossense. In: Simpósio Sobre Recursos Naturais E Sócio-Econômicos Do Pantanal - Manejo E Conservação, 2., 1996, Corumbá., 1986, Corumbá. **Resumos** ...Corumbá: EMBRAPA/CPAP, 1996. 131p.

LUCAS, I.H.; L. SEGOVIA, L.; MARTINEZ-ROMERO, E.; PUEPPKE, S.G. **Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L.** Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.61, p.2775-2779, 1995.

MAGURRAN, A.E. **Ecological Diversity and Its Measurement**. London: Croom Helm Ltda., 1988, 192 p.

MAILA, M.P., RANDIMA, P., DRONEN, K., CLOETE, T.E. **Soil microbial communities: Influence of geographic location and hydrocarbon pollutants**. Soil Biology & Biochemistry, Oxford, v. 38, n.8, p. 303-310, 2006.

MANFIO, G.P. Avaliação do estado do conhecimento da diversidade biológica do Brasil. Ministério da Ciência e Tecnologia, p.79, 2003. Acessado em 20/05/2007. Disponível em <http://www.mma.gov.br>

MARTINS, L.M.V. NEVES, M.C.P., RUMJANEK, N.G. **Growth characteristics and symbiotic efficiency of rizobia isolated from cowpea nodules of the northeast of Brazil**. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v.29, n.5-6; p.1005-1010, 1997.

McLELLAN MR, DAY JG. **Cryopreservation and freeze-drying protocols. Introduction. Methods**. Mol Biol., Oxford, v.38, n.1, p. 1-5, 1995.

MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L., (Ed). **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa – CNPMA, 1998. 488 p.

MELO, I.S. Recursos genéticos microbianos. In: MELO, I.S.; VALADARES-INGLIS, M.C.; NASS, L.L.; VALOIS, A.C.C.(Ed).**Recursos genéticos e melhoramento-microrganismos**. Brasília: Embrapa – Meio ambiente, 2002, 48 p.

MELLONI, R.; MOREIRA, F.M.S.; NOBREGA, R.S.A.; SIQUEIRA, J.O. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.6 , n. 30, p. 235-246, 2006.

MERCANTE, F.M.M.; CUNHA, C.O.; STRALIOTTO, R.; RIBEIRO-JÚNIOR, W.Q.; VANDERLEYDEN, J.; FRANCO, A.A. ***Leucaena leucocephala* as a trap host for *Rhizobium tropici* strains from the brazilian “Cerrado” region**. Revista de Microbiologia, São Paulo, v.29, p.49-58, 1998.

MES, T.H.M. **Microbial diversity-insights from population genetics**. Environmental Microbiology, v.10, n.1, p.251-264, 2008.

MOORE, P.D. **Roots of stability**. Nature. v. 437, p.959–961, 2005.

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

MORENO, E. **In search of a bacterial species definition**. Rev. Biol. Trop, San José, v.50, n.2, p.803-821, 2002.

MORGAN, C.A.; HERMAN, N.; WHITE, P.A.; VESEY, G. **Preservation of micro-organisms by drying; A review**. Journal of Microbiological Methods, London, v. 66, n.9, p. 183–193, 2006.

MOULIN L.; MUNIVE A.; DREYFUS B. E BOIVIN-MASSON C. **Nodulation of legumes by members of the b-subclass of Proteobacteria**. Nature, v. 411, p. 948-950. 2001.

ODALIA-RÍMOLI, A., ARRUDA, E.J., RÍMOLI, J., BUENO, N.R., COSTA, R.B. **Biodiversidade, biotecnologia e conservação genética em desenvolvimento local**. Revista Internacional de Desenvolvimento, São Paulo, v. 1, n.1, p. 21-30, 2000.

ODUM, E.P. **Fundamentos de ecologia**. 4.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1988. 927p.

PARO, H. **História da soja em Mato Grosso**. Cuiabá:EMPAER – MT. 1998. 8p.

PEET, R.K. **The measurement of species diversity**. Ann. Rev. Ecol. Syst., v.5, p. 285–307, 1974.

PELCZAR jr, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2ed. Rio de Janeiro: Makron Books do Brasil, 1997.

PEREIRA, P.A.A.; OLIVER, A.; BLISS, F.A.; CROWE, L.; CROWE, J. **Preservation of rhizobia by lyophilization with trehalose**. Pesq. agropec. bras., Brasília, v. 37, n. 6, p. 831-839, 2002.

PIELOU, E.C. **Ecological Diversity**. NewYork: Wiley, 1975. 165 p.

POTT, A. Patagens do Pantanal. Corumbá: EMBRAPA/CPAP, 1988, 58p. (Documentos 7).

RANGEL, T. F.L.V.B., BINI, L.M., DINIZ-FILHO, J.A.F., Pinto, M.P., CARVALHO, P., BASTOS, R.P. **Human development and biodiversity conservation in Brazilian Cerrado**. Applied Geography, Boston, v.27, n.3, p. 14–27, 2007.

REIS,V.M.; OLIVEIRA, A.L.M.; BALDANI, V.L.D.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I; BALDANI, V.L.D. **Fixação Biológica de nitrogênio simbiótica e associativa**. In: FERNANDES, M.S. Nutrição Mineral de Plantas. Viçosa:SBCS, 2006, 432p.

REIS JUNIOR, F.B.dos; MENDES, I.de C.; TEIXEIRA, K.G. dos S.; REIS, V.M. **Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo**. Planaltina, DF:Embrapa Cerrados, 2002. 33p.

REZENDE FILHO, A.T.; SAKAMOTO, A.Y.; BARBIÉRO, L.; QUEIROZ NETO, J.P.; FURIAN, S. Mapeamento de solos salinos – Pantanal da Nhecolândia, MS: um método cartográfico. In: IV Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal, 2004, Corumbá-MS. **Anais...** Corumbá:EMBRAPA Pantanal, 2004, 7p.

RIBEIRO, M.C.; SOARES, M.M.S.R. Microbiologia prática – roteiro e manual. Atheneu: São Paulo, 2002, 112p.

RODRÍGUEZ-VALERA, F. **Approaches to prokaryotic biodiversity: a population genetics perspective**. Environ. Microbiol., Washington, v. 4, n.11, p. 628–633,2002.

RONDON, M.R., AUGUST, P.R., BETTERMANN, A.D., BRADY, S.F.; GROSSMAN, T.H.; LILES, M.R. **Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms**. Appl Environ Microbiol, New York, v. 66, n.11, p. 2541–2547, 2000.

ROSE D. **Some Factors Influencing the survival of freeze dried yeast cultures.** J Appl Bact., Oxford, v.33, n.6, p. 228-230,1970.

ROSSO, S. **Amostragem, repartição espacial e diversidade/dominância de comunidades de costões rochosos: uma abordagem metodológica.** Laboratório de Ecol. Marinha:USP, 1996. 30 p.

RYAN, M.J., SMITH, D., JEFRIES, P. **A decision-based key to determine the most appropriate protocol for the preservation of fungi.** World J of Microbiol & Biotech, v.16, n.5, p. 183-186, 2000.

SÁ, N.M.H.; SCOTTI, M.R.M.L.; PAIVA, E.; FRANCO, A.A.; DÖBEREINER, J. **Selection and characterization of *Rhizobium* spp strains stable and capable in fixing nitrogen in bean (*Phaseolus vulgaris* L.).** Rev. de Microbiol., São Paulo, v. 24, n. 1, p. 28-48, 1993.

SAAB, O.C.A, CASTILLO, M.C., HOLGADO, A.P.R., NADER O.M. **A comparative study of preservation and storage of *Haemophilus influenzae*.** Mem Inst Oswaldo Cruz., Rio de Janeiro, v. 96, n.18, p.583-586, 2001.

SADOWSKY, M. J.; GRAHAM, P. H. **Soil biology of the *Rhizbiaceae*.** In: H. P. Spaink, A. Kondorosi, y P. J. J. Hooykaas (eds.). The Rhizobiaceae. Kluwer AcademicPublishers: Dordrecht. 1998, 172p.

SADOWSKY, M. J.; GRAHAM, P. H. **The prokaryotes:an evolving electronic resource for the microbiological community.** Springer:Verlag, 2002.

SAHIN, N. **Biosafety, biodiversity and significance of Microbial Resource Centers (MRCs) in microbiology education World.** J. of Microbiol & Biotechn, Washington, v.22, n.10, p. 219–224, 2006.

SALAS, F., MARCOS, C., PÉREZ-RUZFA, A., MARQUEZ, J.C. **Application of the exergy index as ecological indicator of organicallyenrichment areas in the MarMenos lagoon (south-eastern Spain).** Energy, v. 30, p. 2505–2522, 2005.

SATURNINO, H. M. **Evolução do Plantio Direto e as Perspectivas nos Cerrados.** Informe Agropecuário, Belo Horizonte, EPAMIG, v.22 n.208, p.5-12. 2001.

SAWADA, H.; KUYKENDALL, L. D.; YOUNG, J. M. **Changing concepts in the systematic of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts.** J. Gen. Appl. Microbiol. v. 49, p.155-179, 2003.

SHANNON, C.E.; WEAVER, W. **The Mathematical Theory of Communication.** Urbana, IL, USA: University of Illinois Press.1949, 148 p.

- SHIOMI, H.F.; SILVA, H.S.A.; MELO, I.S.; VIEIRA, F. N.; BETTIOL, W. **Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust.** Sci. Agric, Piracicaba, v.63, n.1, p.32-39, 2006.
- SILVA, O. D. da. **Pantanal, santuário ameaçado.** São Paulo:Ateniense, 1992. 101p.
- SMITH, D. **Culture collections over the world.** Int Microbiol, v. 6, n.6, p.95–100, 2003.
- SPAINK, H. P., KONDOROSI, A.; HOOYKAAS, P. J. J. The Rhizobiaceae. Kluwer Academic Publishers: Dordrecht. 1998.
- SPENCER J.F. & SPENCER D.M. **Maintenance and culture of yeasts.** Methods Mol Biol. v.53, n.1, p. 5-15,1996.
- STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B.M. **Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology.** Internat. J. of Systemat Bacteriol, Washington, v.44, p.846-849, 1994.
- STEIN, J.L., MARSH, T.L., WU, K.Y., SHIZUYA, H., and DeLONG, E.F. **Characterization of uncultivated prokaryotes: Isolation and analysis of a 40-kilobase-pair genome fragment from a planktonic marine archaeon.** J Bacteriol, v.178, p. 591–599, 1996.
- STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N.G. **Aplicação e evolução dos métodos moleculares para o estudo da biodiversidade do rizóbio.** Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1999. 70p.
- STREETER, J.G. **Effect of trehalose on survival of Bradyrhizobium japonicum during desiccation.** J. of Appl Microbiol, Washigton, v.95, n.12, p.484–491, 2003.
- SWELIM, D.M.; HASHEM, F.M.; KUYKENDALL, L.D.; HEGAZI, N.I.; ABDEL-WAHAB, S.M. **Host specificity and phenotypic diversity of *Rhizobium* strains nodulating *Leucaena*, *Acacia* and *Sesbania* in Egypt.** Biol and Fertil of Soils, v. 25, n. 3, p. 224-232, 1997.
- SY, A., GIRAUD, E., JOURAND, P., GARCIA, N., WILLEMS, A., de LAJUDIE, P., PRIN, Y., NEYRA, M., GILLIS, M., BOIVIN-MASSON, C., y DREYFUS, B. **Methylotrophic *Methylobacterium* bacteria nodulate y fix nitrogen in symbiosis with legumes.** J. Bacteriol. Washington, v.183, p.214-220, 2001.
- TAKAGI H, IWAMOTO F, NAKAMORI S. **Isolation of freeze-tolerant laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae* from praline-analogue-**

resistant mutants. Appl Microbiol Biotechnol, New York, v.47, n.14, p. 405-411,1997.

TAN, I. K. P.; BROUGHTON, W. J. **Rhizobia in tropical legumes. XIII. Biochemical basis of acid and alkali reactions.** Soil Biol and Bioch,Oxford, v. 13, n. 12, p. 389-393, 1981.

TITTABUTR, P. PAYAKAPONG, W.; TEAUMROONG, N.; BOONKERD, N.; SINGLETON, P.W.; BORTHAKUR, D. **The alternative sigma factor RpoH2 is required for salt tolerance in *Sinorhizobium* sp. strain BL3.** Res Microbiol. Washington, v.127, n.7, p.811-818, 2006.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 4ed. Atheneu: São Paulo, 2004. 718p.

VALOIS, A.C.C. **Biodiversidade, biotecnologia e propriedade intelectual.** Cadernos de Ciência & Tecnologia, Brasília, v.15, n. especial, p. 21-31, 1998.

van BERKUM, P., BEYENE, D., BAO, G., CAMPBELL, T. A., EARDLY, B. D. ***Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour].** Internat J of Systemat and Evolut Bacteriol, Baltimore, v. 48, n. 1, p. 13-22, 1998.

van RHIJN, P.; VANDERLEYDEN, J. **The *Rhizobium*-plant symbiosis.** Microbiol.Rev. New York, v. 59, p.124-142, 1995.

VANDAMME, P., POT, B., GILLIS, M., DE VOS, P. KERSTERS, K., SWINGS, J. **Polyphasic taxonomic, a consensus approach to bacterial systematics.** Microbiol Rev, New York, v. 60, n. 12, p.407-438. 1996.

VIEIRA, J. A. **Plantio direto na Região de Primavera do Leste, Mato Grosso.** Viçosa: UFV. 2002.

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

WILHM, J. **Graphic and mathematical analyses of biotic communities in polluted streams.** Annual.Rev of Entomol, v.17, p.223-252, 1972.

XAVIER, G.R.; MARTINS, L.M.V.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. **Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea, rhizobia population.** Biol and Fertil of Soils, Berlin, v.27, n.11 , p.386-392, 1998.

YAO, H., BOWMAN, D., SHI, W. **Soil microbial community structure and diversity in a turfgrass chronosequence: Land-use change versus turfgrass management.** Appl Soil Ecol. Oxford, v.34, n.8, p. 209–218, 2006.

ZILLI, J.É.; RUMJANEK N.G.; XAVIER, G.R.; COUTINHO, H.L. DA C.; NEVES, M.C.P. **Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo.** Cadernos de Ciência & Tecnologia, Brasília, v. 20, n. 3, p. 391-411, 2003.

CARACTERIZAÇÃO E DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS DE LEGUMINOSAS NATIVAS DO PANTANAL

RESUMO Com o objetivo de caracterizar bactérias isoladas de nódulos de duas leguminosas do Pantanal de Poconé e de Nhecolândia: *Discolobium spp.* e *Aeschynomene fluminensis*, foram realizadas coletas de nódulos de raiz e caule de *Discolobium spp.* e coleta de nódulos de caule de *Aeschynomene fluminensis* no período de inundação. Os nódulos foram armazenados em frascos contendo sílica gel sem controle de temperatura até o momento das análises. Depois de desinfestados superficialmente, os nódulos foram macerados com pinça e riscados em placas contendo meio YMA e incubados à 28°C por 10 dias, quando então foram caracterizados fisiológica e morfológicamente. Foram obtidos 262 isolados de nódulos de caule e de raiz das leguminosas nativas. Todos os isolados foram caracterizados quanto às características culturais, morfológicas e produção de muco e armazenados com glicerol. A cor das colônias dos isolados predominante foi amarela. A diversidade bacteriana dos isolados de nódulos de leguminosas nativas foi influenciada pela região de coleta e a região de Nhecolândia foi mais diversa e com maior abundância de espécies quando comparada com Poconé. As análises de agrupamento sugeriram diferenças entre os isolados de nódulos de caule e de raiz.

Palavras-chave: associação simbiótica, leguminosas tropicais, diversidade.

CARACTERIZATION AND DIVERSITY OF BACTERIA ISOLATED FROM PANTANAL NATIVE LEGUME NODULES

ABSTRACT Aiming to characterize bacteria isolated from nodules of two legumes from pantanal of Poconé and pantanal of Nhecolândia: *Discolobium spp.* and *Aeschynomene fluminensis*. Nodules from root and stem of *Discolobium spp.* and stem nodules of *Aeschynomene fluminensis*, were collected during flood period. The nodules were stored in vials containing silica gel without temperature control until the time of analysis. After disinfected surface, the nodules were macerated with forceps and scratched on plates containing YMA medium and incubated at 28 °C for 10 days when then were characterized morphologically and physiologically. All isolates were characterized as the cultural characteristics, morphology and production of mucus and stored in glycerol. The color of the colonies of the isolates was predominantly yellow. The diversity of bacterial isolates from nodules of legumes native was influenced by region of collection and the region of Nhecolândia was more diverse and greater abundance of species when compared with Pocone. The clustering analysis suggested differences between isolates from nodules of stem and root.

Key-words: simbiotic association; tropical legumes; diversity.

2.1 INTRODUÇÃO

O processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um dos maiores processos que regulam a vida no planeta, seguido da decomposição da matéria orgânica, perdendo apenas pela fixação biológica de carbono (fotossíntese). E, por esse motivo, talvez seja o processo microbiano relacionado à agricultura, mais estudado e explorado tecnologicamente. É um processo realizado exclusivamente por microrganismos procariotos de diferentes grupos, inclusive alguns exemplares do grupo *Archae*.

Existem três tipos de organismos diazotróficos: os de vida livre; aqueles que vivem associados a outros organismos; e, aqueles que vivem em simbiose com outros organismos, sendo este último, a relação mais eficiente desenvolvida por certas bactérias com plantas da família das leguminosas. Nesse processo de associação simbiótica, ocorre formação de estruturas especializadas na raiz ou caule das plantas que são conhecidas como nódulos.

A busca por bactérias diazotróficas com características diferenciadas como a capacidade de realizar a FBN mesmo em condições adversas como temperaturas altas, solos salinos, deficiência hídrica e outros, são ainda objeto de estudo para muitos pesquisadores.

Nesse contexto, o isolamento e a caracterização desses diazotróficos oriundos de áreas com condições diferenciadas como é o caso do Pantanal, onde há potencial ecológico muito maior do que já descrito em literatura constitui o primeiro passo para muitos estudos futuros.

Nas planícies pantaneiras sobressaem solos inférteis (lateritas) em áreas úmidas (hidromórficas) e planossolos, além de várias outras classes, todos alagáveis, em maior ou menor grau, e de baixa fertilidade apresentando problemas para o desenvolvimento da agricultura. É nesse cenário de épocas de cheia e de seca que estão determinados os ciclos da vida no Pantanal.

As espécies de leguminosas *Discolobium spp.* e *Aeschynomene fluminensis*, conhecidas popularmente como cortiça, são abundantes nessas regiões e utilizadas como alimento para o gado e também por animais

silvestres. Sua importância está relacionada com seu aproveitamento como adubo verde ou forragem.

Este estudo teve por objetivo caracterizar bactérias isoladas de nódulos de leguminosas nativas do Pantanal.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 IDENTIFICAÇÃO DAS ÁREAS DE ESTUDO

Pantanais de Poconé e Nhecolândia

O trabalho foi realizado em época de inundação em áreas no pantanal de Nhecolândia – MS na fazenda da EMBRAPA – CPAP (Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal) (Figura 1) e em áreas do pantanal de Poconé - MT, (Figura 2). As coordenadas geográficas e informações sobre a época de amostragem estão descritos na tabela 1. Na tabela 2, está descrito a análise de solo das regiões onde foram coletadas as plantas e nódulos.

Tabela 1 Descrição dos locais de coleta, coordenadas geográficas, período de inundação, número de nódulos e densidade de plantas na época de amostragem.

Locais	Coordenadas geográficas	Altura da Lâmina D'água (cm)	Persistência da inundação	Densid. média de plantas (m ²)	Número médio de nódulos/planta
RC	16° 40' 675"S 56° 40' 503" W	60	jan- junho	12,2	4,2
PF	16° 40' 683"S 56° 46' 283" W	35	jan-abril	3,5	0,9
PBa	16° 31' 376"S 56° 42' 793 W	48	jan-maio	28,9	1,8
NHE*	19° 15' 01"S 57° 01' 29 W	40	jan-maio	-	-

*Nhecolândia

Tabela 2 Características químicas e físicas das áreas experimentais na profundidade de 0-20 cm. Localizadas no Pantanal de Poconé, MT.

Locais	pH	P	K	Ca+Mg	Ca	Mg	Al	H	M.O.	Areia	Silte	Argila
	Água	mg/dm ³			cmol _c /dm ³				%	%		
RC	5,7	8,7	88	4,2	3,5	0,7	0,0	4,8	3,90	38	16	46
PF	5,1	16,0	35	1,8	1,2	0,6	0,6	2,5	1,61	82	3,5	14,5
PBa	5,3	8,9	28	1,1	0,8	0,3	0,4	2,0	1,14	17	8	75



Figura 1 – Localização das regiões de coleta de nódulos no pantanal de Nhecolândia. Ponto A evidencia a localização da fazenda Nhumirim da Embrapa/CPAP ; Ponto B evidencia a georeferência da cidade de Nhecolândia.



Figura 2 – Localização dos três pontos de coleta de nódulos no pantanal de Poconé. Ponto Barara e Ponto Posto Fiscal ao longo da rodovia transpantaneira e o ponto Rio Claro mais distante.

2.2.2 COLETA DE NÓDULOS

Foram coletados nódulos de caule e raiz de *Discolobium spp.* e nódulos de caule de *Aeschynomene fluminensis* em período de inundação no Pantanal.

Após a coleta, os nódulos foram armazenados em frascos contendo sílica-gel e estocados por um período de um mês no Laboratório de Microbiologia do Solo da FAMEV/UFMT sem controle de temperatura até o momento das análises.

2.2.3 ISOLAMENTO DE RIZÓBIOS

Para o isolamento, foram escolhidos aleatoriamente cerca de 10% do total de nódulos estocados para cada região. Após os nódulos foram hidratados por um período de 12 horas, quando então foram imersos em álcool 92,8° por um período de um minuto, em seguida, ficaram imersos em hipoclorito de sódio 35% por mais um minuto e lavados em água destilada estéril conforme descrito em Araújo (1994). A concentração do hipoclorito utilizada não é a recomendada, porém estudos anteriores no laboratório, comprovam que para se ter uma efetiva desinfecção desses nódulos oriundos de áreas do Pantanal, a utilização de maiores concentrações obtém-se melhores resultados.

Após a desinfecção, os nódulos foram esmagados e riscados em placas de Petri contendo meio específico para isolamento de rizóbios composto de extrato de levedura, manitol e sais minerais (YMA) (Vincent, 1970) (Apêndice 1). As placas foram incubadas a 28°C por um período de 10 dias.

Após esse período, foi verificada a pureza da cultura e as características morfológicas e fisiológicas foram avaliadas.

2.2.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FISIOLÓGICA

Foi verificada a reação ao pH do meio de cultivo de acordo com a classificação: ácida, para os isolados que transformaram o meio de cultivo para coloração amarela; alcalina, para os isolados que transformaram o meio de cultivo para coloração azul e neutra, para os isolados que não modificaram o meio de cultivo permanecendo na coloração verde.

A caracterização morfológica das colônias foi realizada seguindo os seguintes parâmetros: cor de colônia; formato da borda da colônia (regular ou irregular); detalhes ópticos (opaco, transparente e translúcido); observação da presença ou ausência de muco (Figura 3). Nesse estudo a forma da colônia de todos os isolados foram considerados circular.

A morfologia da célula do isolado e a pureza da cultura também foi observada através da técnica de coloração de GRAM (Apêndice 2). Foi considerado rizóbio todo isolado com o formato de bastonete e de coloração rósea (Gram negativo).

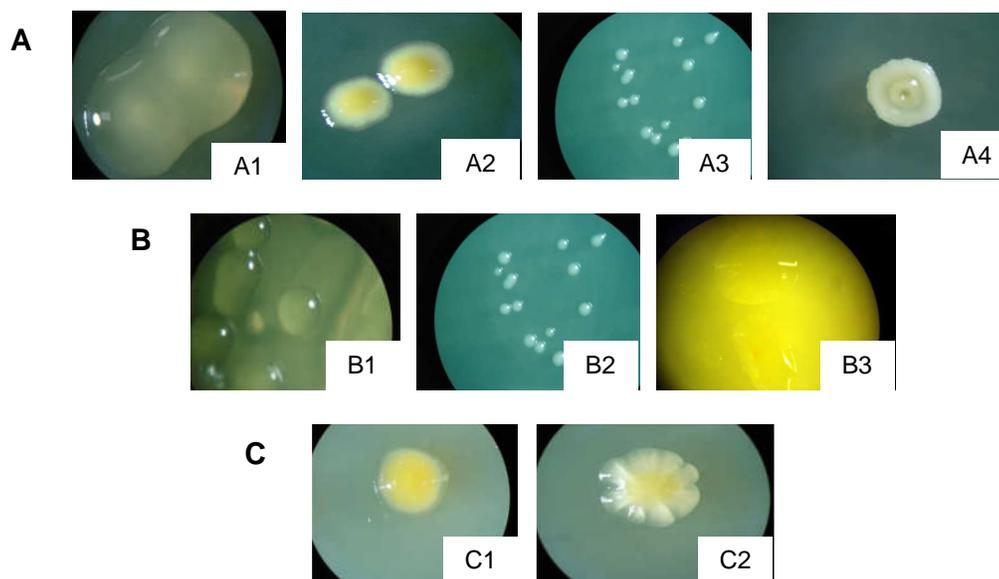


Figura 3 – Características morfológicas e fisiológicas observadas nos isolados bacterianos. A – Produção de muco (A1 – abundante; A2 – médio; A3 – pouco; A4 – sem muco); B – Detalhe óptico (B1 – translúcido; B2 – opaco; B3 – transparente); C – Formato da borda (C1 – regular; C2 – irregular).

As características das estirpes recomendadas pelo Ministério da Agricultura para o cultivo da soja, as estirpes *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA5019) e *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA5079 e SEMIA5080) oriundas da FEPAGRO (Fundação estadual de pesquisa agropecuária), foram utilizadas para comparação com os isolados. As características das bactérias *Rhizobium leguminosarum* e *Azorhizobium caulinodans* também foram utilizadas para comparação.

2.2.5 ESTABELECIMENTO DA COLEÇÃO DE CULTURAS

Os isolados devidamente caracterizados e purificados foram armazenados em microtubos contendo glicerol na proporção de 40% de solução final e estocados em freezer -20°C . Receberam cada um, identificação alfa-numérica de UFMT-50, para o primeiro isolado e UFMT-652, para o último isolado (Figura 4).



Figura 4 – Armazenamento e identificação dos isolados em microtubos.

2.2.6 ANÁLISE DOS DADOS

Foi realizada análise de similaridade pelo método complete linkage, utilizando o programa Systat for Windows versão 11 de 2004. As análises foram realizadas com base nas seguintes informações (anexo): Cor da colônia; produção de muco; tempo de crescimento; reação ao pH; detalhe óptico (transparência). Cada análise foi separada por hospedeiro e região de isolamento.

A partir dessas informações, foi montada matriz de presença e ausência para cada característica observada como descrita na Tabela 3 e submetido ao programa para análise.

Tabela 3 Características observadas dos isolados bacterianos e respectiva atribuição de valores para montagem do dendrograma de similaridade.

Descrição das Características Avaliadas	Características	
1 - Tempo de Crescimento em dias	1 a 3 dias	1
	4 a 5 dias	2
	6 a 10 dias	3
2 - Alteração do pH do meio de cultivo	Ácido	4
	Neutro	5
	Básico	6
3 - Produção de muco	s/ muco	7
	Pouco	8
	Médio	9
	Abundante	10
4 - Coloração da colônia	Branca	11
	Branca amarelada	12
	Amarela	13
	Amarela c/borda clara	14
	Creme	15
5 - Detalhe óptico (D.O.)	Opaco	16
	Translúcido	17
	Transparente	18
6 - Característica da borda da colônia	Regular	19
	Irregular	20

O índice de diversidade de Shannon (H) foi obtido por: $H = -\sum p_i \log p_i$, sendo $p_i = n_i/N$; n_i = densidade de cada grupo; e $N = \sum$ da densidade de todos os grupos. Este índice assume valores que podem variar de 0 a 5; o declínio de seus valores é o resultado de maior dominância de grupos em detrimento de outros (Begon et al., 1996). O Índice de Uniformidade de Pielou (e) é um índice de eqüitabilidade, sendo definido por: $J = H/\log S$, em que H = valor do índice de diversidade de Shannon; e S = número de grupos funcionais.

2.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 262 isolados de nódulos de caule e de raiz das leguminosas nativas. Todos os isolados foram caracterizados quanto às características culturais, morfológicas e produção de muco e armazenados com glicerol (Morgan et al., 2006). Cada isolado recebeu uma identificação única alfa-numérica iniciando com UFMT- 50 e finalizando com UFMT-652.

Esses resultados foram incluídos no banco de dados do Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC), os quais podem ser consultados pelo site www.bmrc.lncc.br . O resumo das características observadas está descrito na Tabela 4 e Figura 5.

A grande maioria dos isolados desenvolveram reação ácida em meio YMA e produziram muco. Esses resultados corroboram com os de Martins et al. (1997) pois, também encontrou em sua maioria rizóbios com crescimento rápido, acidificando o meio e produzindo muco.

Segundo Freitas et al. (2007) rizóbios nativos isolados de solos salinos, condição observada nos solos pantaneiros (Almeida et al., 2003; Rezende Filho, 2004), são de crescimento rápido, produzem exopolissacarídeos e estão associados à eficiência em fixação de nitrogênio.

Andrade et al. (2002) isolaram rizóbios a partir de nódulos de *Phaseolus vulgaris* onde todos foram de crescimento rápido e a maioria (81%) produziu muco. Vale ressaltar que essa leguminosa foi inoculada com amostras do próprio solo da região onde foi cultivada, fato que nos leva a inferir que são rizóbios nativos.

Esses mesmos autores constataram que o manejo do solo afetou significativamente as propriedades culturais e bioquímicas desses isolados, pois modificou a predominância de alguns grupos de rizóbios.

A produção de exopolissacarídeos associada ao rápido crescimento de isolados constatada por outros autores, também pode estar associada à tolerância dos isolados a níveis de pH mais baixos, como afirmado por Barberi et al. (2004).

Tabela 4 – Quantidade de isolados bacterianos e respectivos percentuais de características fisiológicas.

Hospedeiro	Tipo nódulo	Total Isolados	%			
			Reação pH	Muco (+)*	Muco (-)**	
<i>Aeschynomene</i>	Caule	83	Ácida	96,4	97,5	2,5
			Alcalina	3,6	100	-
			Neutra	-	-	-
<i>Discolobium spp.</i>	Caule	94	Ácida	70,2	89,4	10,6
			Alcalina	12,8	66,6	33,4
			Neutra	17	68,75	31,25
	Raiz	168	Ácida	62,5	90,5	9,5
			Alcalina	6,5	63,6	36,4
			Neutra	31	78,8	21,2
			neutra	15,7	87,5	12,5

*Produção de muco; **Ausência de muco.

Os isolados de caule de *Aeschynomene sp.* acidificaram o pH do meio de cultivo, ao contrário do que foi encontrado por Loureiro (1994) e Santos et al. (2007) onde foi observado que em torno de 80 a 89% dos isolados de nódulos de *Aeschynomene*, alcalinizaram o meio de cultivo.

Alazard (1985) já havia descrito isolados de nódulos de caule de *Aeschynomene spp.* como membros de um grupo específico de *Rhizobium spp.* por serem isolados de crescimento rápido com a propriedade de alcalinizar o meio YMA. Porém esses experimentos foram conduzidos com isolados do oeste da África em casa de vegetação e não em condições naturais.

Com base na característica fenotípica cor de colônia dos isolados, foi possível a obtenção de cinco morfoespécies distribuídos por região de isolamento (Tabela 5). As características das morfoespécies estão descritas na figura 5 A.

Considerando o número de componentes representantes de cada hospedeiro, a morfoespécie 3 é de ocorrência comum para as duas regiões estudadas independentemente do tipo de nódulo. As morfoespécies 1 e 5 ocorrem mais abundantemente em isolados de nódulos de raiz, na região de Poconé, enquanto a morfoespécie 4 ocorre mais vezes em isolados de nódulos de caule.

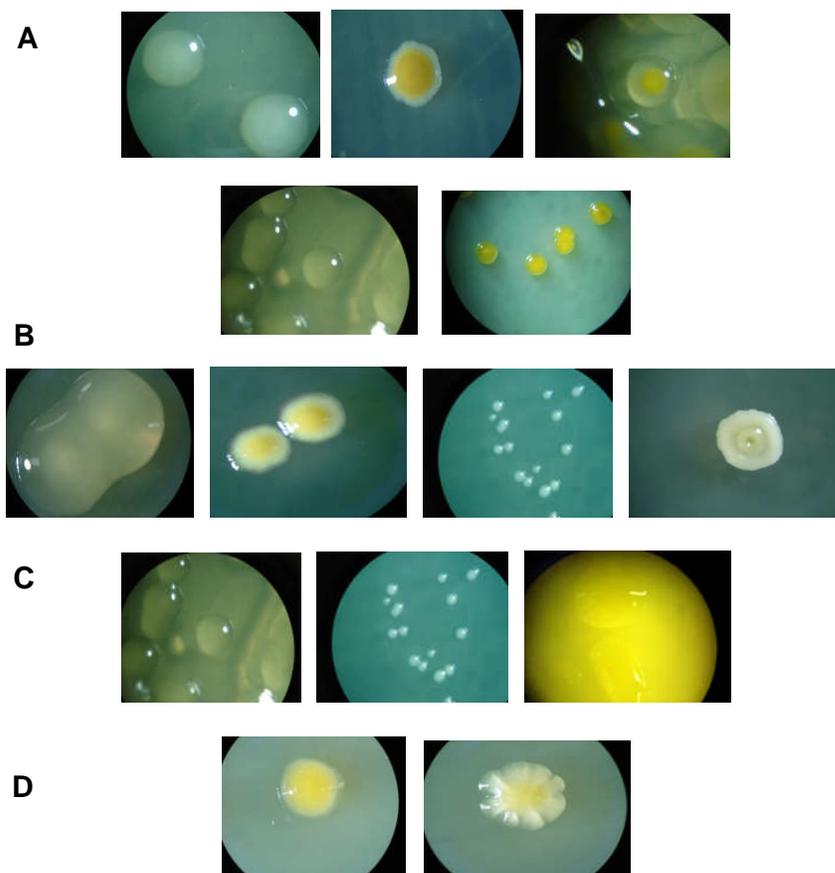


Figura 5 – Características morfológicas observadas nos isolados. A – Cor de colônia (branca; branca amarelada; amarela borda clara; creme; amarela); B – Produção de muco (abundante; médio, pouco; sem muco); C – Detalhe óptico (translúcido; opaco; transparente); D – Formato da borda (regular; irregular).

Esse fato sugere diferenças nas comunidades de rizóbios com relação ao processo de colonização e região de ocorrência dependendo do hospedeiro.

De acordo com Loureiro et al. (2007) o solo pode afetar a diversidade de rizóbios bem como as condições estressantes do ambiente tropical. Reis Júnior et al. (2004) indicam que o fator ambiental apresenta efeito significativo sobre as populações de *A. amazonense*.

Tabela 5 – Número de isolados de bactérias por grupo formado, de acordo com a cor das colônias e seus respectivos hospedeiros.

	Morfoespécies	<i>Discolobium</i>		<i>Aeschynomene</i>
		Poconé	Nhecolândia	Poconé
CAULE	1	9	6	4
	2	5	3	3
	3	52	7	61
	4	3	1	14
	5	4	4	1
RAIZ	1	20	5	-
	2	2	2	-
	3	99	2	-
	4	7	-	-
	5	31	-	-

A influência desses fatores pode ser comprovada de acordo com o índice de diversidade e equitabilidade (Tabela 6) calculados. Foi observado que a diversidade (H') para isolados de nódulos de caule foi maior na região de Nhecolândia com alta concentração de diferentes espécies (J) enquanto que para os isolados de nódulos de raiz, a maior diversidade foi na região de Poconé, porém a distribuição de espécies foi bastante próxima nas duas regiões. Também houve diferenças entre as leguminosas. Para a *Discolobium spp.* os índices indicaram maior diversidade e distribuição de espécies do que para *Aeschynomene sp.*

A diversidade observada nos índices, também foi reproduzida nos dendrogramas de similaridade construídos com base nas características culturais e morfológicas dos isolados para cada região estudada. Observa-se a formação de agrupamentos que denotam o nível de diversidade encontrada.

Na Figura 6, é possível observar diversidade entre os isolados e dois agrupamentos distintos de isolados de nódulos de caule de *Aeschynomene sp.* na região de Poconé - MT, todos agrupados com mais de 70% de similaridade.

Tabela 6 – Índices de Shannon (H') e Pielou (J) para cada região e tipo de nódulo estudado.

TIPO NÓDULO	<i>Discolobium</i>				<i>Aeschynomene</i>	
	POCONÉ		NHECOLÂNDIA		POCONÉ	
	H'	J	H'	J	H'	J
CAULE	0,97364	0,60496	1,463	0,909	0,846	0,526
RAIZ	1,06706	0,663	0,995	0,618	-	-

Os isolados UFMT 287, 286 e 327 formaram um agrupamento separado dos demais isolados tendo estes se agrupado com a estirpe tipo usada para comparação a *Azorhizobium caulinodans*.

Freitas et al. (2007), observaram que rizóbios nativos mostram diversidade elevada e indicam a possibilidade de se tratar de espécies novas ainda não descritas. Nóbrega et al. (2004) também fazem essa sugestão de novas espécies com relação a diazotróficos associativos, pois apresentaram alta dissimilaridade com as estirpes tipo.

Essas bactérias isoladas de caule passam por uma variedade de condições sob as quais devem ser capazes de sobreviver e crescer, dentro e fora do nódulo da planta (Boivin et al., 1997), sendo que três importantes fatores as diferenciam do que já foi encontrado na rizosfera: alta tensão de oxigênio em nível de caule; falta de nitrogênio combinado para sobrevivência do caule e folhas; e a presença de luz e fotossíntese no córtex do nódulo (Loureiro et al., 1995).

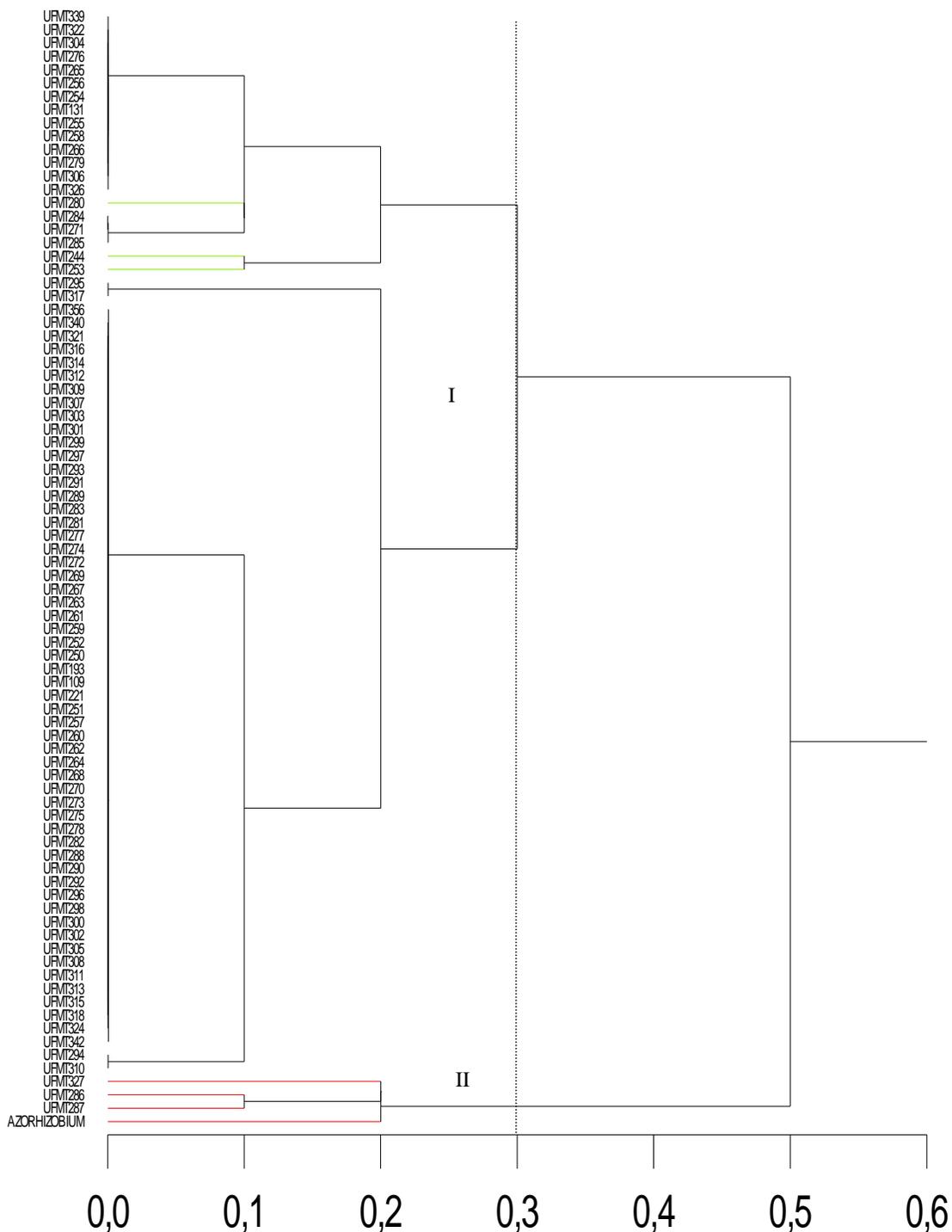


Figura 6 – Dendrograma baseado nas características morfofisiológicas de isolados de nódulos de caule de *Aeschynomene* sp. na região de Poconé – MT. *Azorhizobium caulinodans* foi utilizado para comparação.

Boivin et al. (1997) ainda destaca que apesar de análises como o gene 16S rRNA terem mostrado que 4 em 5 espécies de *Aeschynomene* de diferentes regiões geográficas terem formado grupos homogêneos com *Bradyrhizobium* como sub-grupo, análises anteriores sugerem que esses isolados formam um grupo homogêneo porém, separado dos gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e *Azorhizobium*.

Esses resultados reforçam ainda mais a necessidade de avaliação polifásica, como afirmado por Freitas et al. (2007).

A cor predominante entre esses isolados é amarela, ao contrário do que já foi descrito por Araújo (1994), onde a predominância foi da coloração branca, isso se deve talvez, por não se tratar de leguminosas nativas.

Santos et al.(2007) também observaram formação de grupos através das características fenotípicas mais distintas entre os isolados como colação da colônia, produção de muco e reação ao pH. E ainda consideraram a hipótese de haver populações nativas diferentes de rizóbios que parecem ser influenciadas pelo tipo de manejo e por fatores climáticos. Porém, Lima et al. (2005) não observaram relação entre agrupamentos fenotípicos baseados nos padrões protéicos com os sistemas de uso da terra e origem das estirpes. Essa condição também foi observada por Soares et al. (2006) para isolados de caupi.

Com relação ao dendrograma gerado a partir das características morfofisiológicas dos isolados da leguminosa *Discolobium spp.* na região de Nhecolândia (Figura 7), pode-se observar diversidade entre eles e separação de cinco grandes grupos, em um nível de similaridade próximo de 70%.

O agrupamento I possui 10 isolados sendo 8 de nódulos de caule e 2 (UFMT94 e 113) são de nódulos de raiz. Os agrupamentos II e III são sub-grupos de um grupo maior que aproxima três isolados de caule da estirpe tipo *Azorhizobium caulinodans*. No agrupamento II, o isolado de nódulo de caule UFMT 98 foi que mais se distanciou. Nesse grupo o isolado UFMT 68 é oriundo de nódulo de raiz. O agrupamento IV, o maior deles, agrupou 11 isolados sendo 5 de nódulos de raiz. É importante observar que 4 dos 5

isolados de nódulos de raiz se agruparam separadamente dos isolados de nódulos de caule. O agrupamento V possui 4 isolados sendo 3 isolados de nódulos de caule.

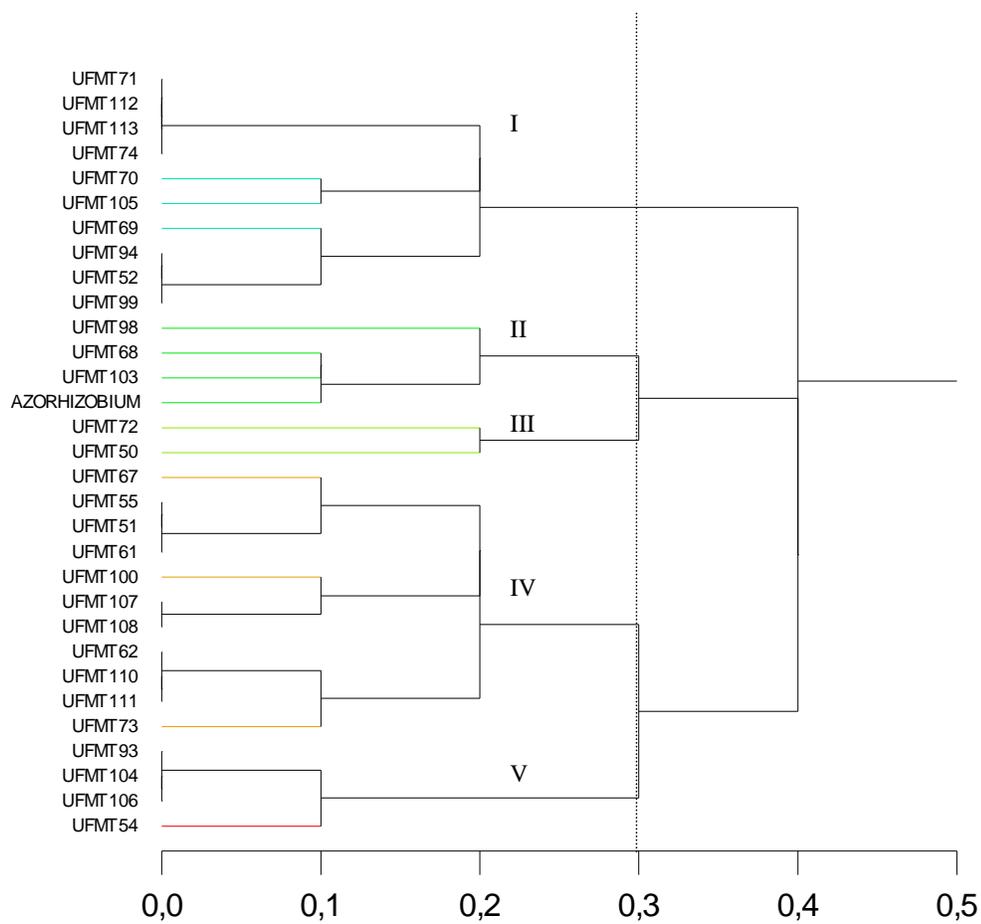


Figura 7– Dendrograma baseado nas características morfofisiológicas de isolados de nódulos de caule e raiz de *Discolobium spp.* na região de Nhecolândia – MS. *Azorhizobium caulinodans* foi utilizado para comparação.

Na Figura 8 está representado o dendrograma a 80% de similaridade gerado pelas características morfofisiológicas de isolados de nódulos de caule e raiz de *Discolobium spp.* na região de Poconé – MT.

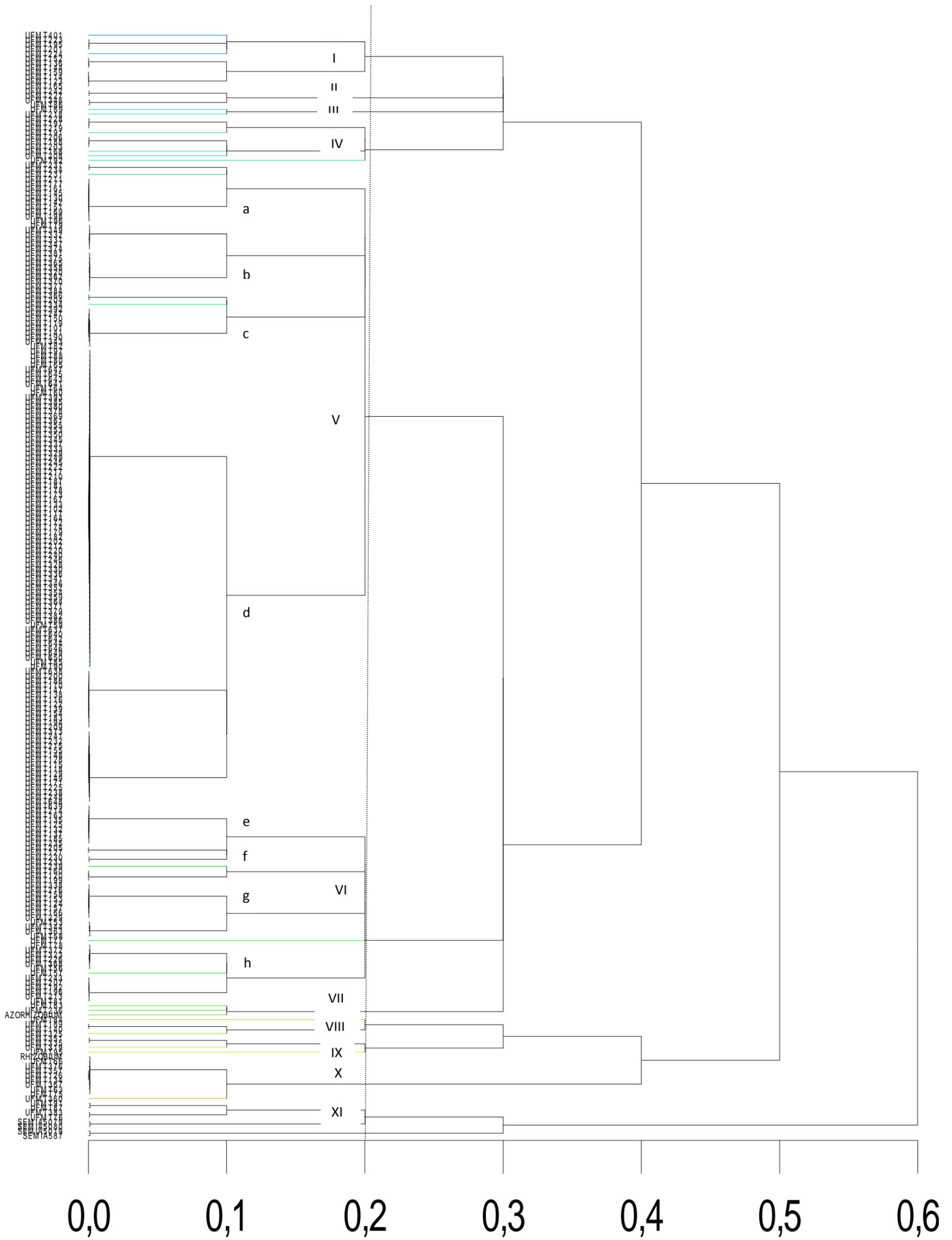


Figura 8 – Dendrograma baseado nas características morfofisiológicas de isolados de nódulos de caule e raiz de *Discolobium* spp. na região de Poconé – MT. SEMIA 587, 5019, 5079, 5080 e *Azorhizobium caulinodans* foram utilizados para comparação.

Foram isolados 232 bactérias sendo 73 de nódulos de caule e 159 de nódulos de raiz.

A maioria dos isolados de nódulos de caule se concentraram nos agrupamentos V no sub-grupo d e agrupamento IX onde todos isolados são oriundos de nódulos de caule (UFMT 351,335,319 e 95). Nos demais grupos onde estão contidos isolados de nódulos de caule e raiz, observa-se que a aproximação dos isolados é dependente do tipo de nódulo. Como por exemplo nos grupos II, VI e VIII. No agrupamento II e VIII, os isolados estão unidos de forma separada, 2 isolados de nódulos de raiz e 2 isolados de nódulos de caule. O agrupamento VI que possui 4 sub-grupos indicados por e, f, g, e h, o sub-grupo g contém 4 isolados de nódulos de caule (UFMT 53, 344, 363 e 58) que estão agrupados separadamente dos demais. No sub-grupo h, o isolado UFMT 57 de nódulo de caule também está independente dos demais.

Os agrupamentos VII, X e XI contém as estirpes tipo usadas como referência respectivamente: *Azorhizobium caulinodans* que está agrupada com os isolados UFMT 236 de nódulo de raiz e UFMT 83 de nódulo de caule; *Rhizobium leguminosarum* que está unida com 8 isolados sendo 2 de nódulos de caule. O agrupamento XI possui 4 isolados, sendo 3 de nódulos de raiz que se agruparam com as estirpes tipo SEMIA 5079 e 5080. As estirpes tipo SEMIA 5019 e 587 se uniram com o agrupamento XI a 70% de similaridade.

Apesar de ter havido formação de grupos com isolados tanto de nódulos de caule quanto de nódulos de raiz, para *Discolobium spp.* foi possível observar que há bastante diversidade entre os isolados e a tendência de separação entre os isolados de nódulos de caule e raiz citada anteriormente, pode indicar que são isolados diferentes uns dos outros evidenciando diferenças na forma em que os rizóbios nodulam os diferentes hospedeiros.

Reis e Olivares (2006) indicam que a forma de adesão das bactérias para posterior infecção não possuem especificidade para com os hospedeiros, porém, para a etapa de efetiva colonização, a presença de

estruturas na superfície celular de reconhecimento e aderência (como exopolissacarídeos) é de primordial importância em condições naturais.

É fato que a nodulação caulinar se processa em condições diferenciadas. Como descrito por Goormachtig et al. (2004), durante a fase de alagamento nas condições pantaneiras, as bactérias noduladoras colonizam diretamente nos tecidos corticais, não sendo, portanto, necessária a expressão de alguns genes específicos para nodulação em condições com pouca quantidade de água.

Outra condição que torna a nodulação caulinar especial é a presença de aparato fotossintético. Giuraud et al. (2000) observaram que a falta do aparato genético para fotossíntese em rizóbios mutantes, causou baixa de 50 pontos percentuais no número de nódulos caulinar, reduzindo também atividade de fixação de nitrogênio e crescimento da planta na mesma proporção, além do estresse constante a que estão submetidos.

A presença de isolados de nódulos de raiz e de caule na formação de um agrupamento, pode ser justificado pelo fato de haverem pouca diferença fisiológica entre isolados de nódulos de caule e raiz de *Discolobium spp.* como observado por Alazard (1985) em isolados de nódulos de caule e raiz de *Aeschynomene sp.* que, apesar de serem isolados diferentes, em um mesmo hospedeiro, há grande proximidade entre eles.

Além disso, esses resultados permitem a conclusão de que os fatores culturais e morfológicos são características muito relevantes para separação de grupos microbianos, como já descrito por outros autores (Martins et al., 1997; Sweelim et al., 1997; Xavier et al., 1998) indicando diferenças metabólicas importantes (Graham et al., 1991).

A região também influencia na diversidade e formação dos grupos microbianos como constatado pelos índices. Segundo Jesus, et al. (2005) 257 isolados de nódulos de siratro foram avaliados tendo havido formação de 63 grupos a 80% de similaridade sendo a diversidade maior observada em áreas cultivadas do que nas áreas nativas de floresta.

Souto et al. (2008) indicam que os índices de Shannon e Pielou para comunidade microbiana em solo sob caatinga variaram de acordo com a época de coleta dependendo da disponibilidade de matéria orgânica.

O mesmo pode ter ocorrido nas nossas regiões de estudo, pois o Pantanal é uma planície inundável, tendo estações definidas de seca e cheia deixando os rizóbios em condições de constante estresse, seja de temperatura ou de baixa/alta precipitação pluviométrica ou disponibilidade de nutrientes. Condições estas que podem afetar a sobrevivência e a eficiência dos rizóbios desse ecossistema e é possível que a alta diversidade observada para isolados de nódulos de caule em Nhecolândia e de raiz em Poconé seja uma indicação da capacidade do sistema de manter o grupo funcional sob condições de estresse.

Silva et al. (2007) observaram isolados de rizóbios no semi-árido pernambucano capazes de suportar estresse principalmente de temperatura.

Outro ponto a ser considerado é a presença de β -rizóbios. Segundo diferentes autores, a presença deles é bastante comum em leguminosas tropicais (Moulin et al., 2002; Verma et al., 2004).

O estudo de áreas com condições diferenciadas como é o caso do Pantanal mato-grossense onde há potencial ecológico muito maior do que já foi descrito, merece maiores estudos. Neste ecossistema, pode estar o ponto de evolução das formas de infecção em leguminosas a partir de uma variedade taxonômica de rizóbios que poderão representar a sobrevivência em ambientes diversificados (Sprent, 1999), e quanto mais diversos forem os ecossistemas estudados, maiores as chances de se descobrir ampla variedade de adaptações às diversas condições ambientais.

2.4 CONCLUSÕES

A diversidade bacteriana dos isolados de nódulos de leguminosas nativas é influenciada pela região de coleta;

Os isolados apresentaram maior diversidade e abundância de espécies na região de Nhecolândia quando comparados com Poconé;

As análises de agrupamento sugeriram diferenças entre os isolados de nódulos de caule e de raiz.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAZARD, D. **Stem and root nodulation in *Aeschynomene spp.*** Appl. Environm. Microbiol., New York, v.50, n. 3, p. 732-734, 1985.

ALMEIDA, T.E.R.; SÍGOLO, J.B.; FERNANDES, E.; QUEIROZ NETO, J.P.; BARBIERO, L.; SAKAMOTO, A.Y. **Proposta de classificação e gênese das lagoas da baixa Nhecolândia – MS com base em sensoriamento remoto e dados de campo.** Revista Brasileira de Geociências, São Paulo, vol. 433, n. 2, p.83-90, 2003.

ANDRADE, D.S.; MURPHY, P.J.; GILLER, K.E. **The diversity of *Phaseolus-Nodulating rhizobial* is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil.** App. Environm. Microbiol., New York, v.68, n.8, p.4025-4034, 2002.

ARAUJO, R. S. Caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica do rizóbio. In: HUNGRIA, M. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola.** Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 21-43 p.

BARBERI, A.; MOREIRA, F.M.S.; FLORENTINO, L.A.; RODRIGUES, M.I.D. **Crescimento de *bradyrhizobium elkanii* estirpe BR 29 em meios de cultivo com diferentes valores de pH.** Ciênc. agrotec., Lavras, v. 28, n. 2, p. 397-405, 2004.

BEGON, M.; HARPER, J.L.; TOWNSEND, C.R. **Ecology: Individuals, populations and communities.** 3.ed. Oxford, Blackwell Science, 1996. 1068p.

BOIVIN, C.; NDOYE, I.; MOLOUBA, F.; delAJUDIE, P.; DUPUY, N.; DREYFUS, B. **Stem nodulation in legumes: diversity, mechanisms, and unusual characteristics.** Critical Rev plant sci. Brewin, v.16, n. 2, p.1-30, 1997.

FREITAS, A.D.S.; VIEIRA, C.L.; SANTOS, C.E.R.S.S.; STAMFORD, N.P.; LYRA, M.C.C.P. **Caracterização de rizóbios isolados de jacatupé cultivado em solo salino do estado de Pernambuco, Brasil.** Bragantia, Campinas, v.66, n.3, p.497-504, 2007.

GIRAUD, E.; HANNIBAL, L.; FARDOUX, J.; VERMÉGLIO, A.; DREYFUS, B. **Effect of *Bradyrhizobium* photosynthesis on stem nodulation of *Aeschynomene sensitive*.** Plant Biology, Oxford, v.97, n.26, p.1069-1073, 2000.

GOORMACHTIG, S.; WARD C.; HOLSTERS, M. **Rhizobium infection: lessons from the versatile nodulation behavior of water-tolerant legumes.** Trends in Plant Sci., Washington, v.9, n.11, 2004.

GRAHAM, P.H.; DRAEGER, K.J.; FERRY, M.L. **Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria.** International Journal of Systematic Bacteriology, Baltimore, v. 41, n. 4, p. 582-587, 1991.

JESUS, E.da C., MOREIRA, F.M.S., FLORENTINO, L.A., RODRIGUES, M.I.D., OLIVEIRA, M.S. **Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental.** Pesq. agropec. bras., Brasília, v.40, n.8, p.769-776, 2005.

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.** Pesq. Agropec. Bras., Brasília, v.40, n.11, p.1095-1104, 2005.

LOUREIRO, M.F. **Caracterização das estirpes de rizóbio e morfologia dos nódulos de raiz e caule de *Aeschynomene* spp. e *Discolobium* spp. nativas do Pantanal Mato-Grossense.** 1994. 205p. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1994. 205p. (Tese de Doutorado).

LOUREIRO, M.F.; JAMES, E.K.; SPRENT, J.I.; FRANCO, A.A. Stem and root nodules on the tropical wetland legume *Aeschynomene fluminensis*. New Phytol., Oxford, v.130, s/n., p.531-544, 1995.

LOUREIRO, M.F. KASCHUK, G.; ALBERTON, O.; HUNGRIA, M. **Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] rhizobial diversity in Brazilian oxisols under various soil, cropping and inoculation managements.** Biol. Fertil. Soils, v.43, p.665-674, 2007.

MARTINS, L.M.V. NEVES, M.C.P., RUMJANEK, N.G. **Growth characteristics and symbiotic efficiency of rizobia isolated from cowpea nodules of the northeast of Brazil.** Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v.29, n.5-6; p.1005-1010, 1997.

MORGAN, C.A.; HERMAN, N.; WHITE, P.A.; VESEY, G. **Preservation of micro-organisms by drying; A review.** Journal of Microbiological Methods, London, v. 66, n.9, p. 183–193, 2006.

MOULIN, L.; CHEN, W.M; BÉNA, G.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. **Rhizobia: The family is expanding.** In: Fenan, T.M.; O'Brian, M.R.; Layzell, D.B.; Vessey, J.K.; Newton, W. Nitrogen Fixation: global perspectives. Oxon:CAB International, 2002, p.61-65.

NÓBREGA, R.S.A.; MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O.; LIMA, A.S. **Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita.** Rev. Bras. Ci. Solo, Viçosa, v.28, n.3, p. 269-279, 2004.

PIELOU, E.C. **Ecological Diversity.** New York: Wiley, 1975. 165 p.

REIS JUNIOR, F.B.; SILVA, M.F.; TEIXEIRA, K.R.S.; URQUIAGA, S.; REIS, V.M. **identificação de isolados de *Azospirillum amazonense* associados a *Brachiaria* spp., em diferentes épocas e condições de cultivo e produção de fitormônio pela bactéria.** R. Bras. Ci. Solo, Viçosa, v. 28, n 1 p.103-113, 2004.

REIS, V.M.; OLIVARES, F.L. **Vias de penetração e infecção de plantas por bactérias.** Seropédica:EMBRAPA Agrobiologia. 2006, 34p.

REZENDE FILHO, A.T.; SAKAMOTO, A.Y.; BARBIÉRO, L.; QUEIROZ NETO, J.P.; FURIAN, S. Mapeamento de solos salinos – Pantanal da Nhecolândia, MS: um método cartográfico. In: IV Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal, 2004, Corumbá-MS. **Anais...** Corumbá:EMBRAPA Pantanal, 2004, 7p.

ROESCH, L.F.W.; PASSAGLIA, L.M.P.; BENTO, F.M.; TRIPLETT, E.W.; CAMARGO, F.A.O. **diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho.** R. Bras. Ci. Solo, Viçosa, v. 31 n 6, p.1367-1380, 2007.

SANTOS, C.E.R.S.; STANFORD, N.P.; NEVES, M.C.P.; RUNJANEK, N.G.; BORGES, W.L.; BEZERRA, R.V.; FREITAS, A.D.S. **Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais.** Rev.bras. ciênc.agrar., Recife, v.2, n.4, p.249-256, 2007.

SHANNON, C.E.; WEAVER, W. **The Mathematical Theory of Communication.** Urbana, IL, USA: University of Illinois Press.1949, 148 p.

SILVA, V.N.; SILVA, L.E.S.F.; FIGUEIREDO, M.V.B.; CARVALHO, F.G.; SILVA, M.L.R.B.; SILVA, A.J.N. **Caracterização e seleção de populações nativas de rizóbios de solo da região semi-árida de Pernambuco.** Pesq.agropec.trop. Goiânia, v.31, n.1, p.16-21, 2007.

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 .** R.bras.cienc.solo. Viçosa, v.30, s/n, p.795-802, 2006.

SOUTO, P.C.; SOUTO, J.S.; MIRANDA, J.R.P.; SANTOS, R.V.; ALVES, A.R. **Comunidade microbiana e mesofauna edáficas em solo sob**

caatinga no semi-árido da paraíba. R. Bras. Ci. Solo, Viçosa, v.32, n 1,p.151-160, 2008.

SPRENT, J.I. **Nitrogen fixation and growth of non-crop legume species in diverse environments.** Perspec. Plant Ecol. Evol. Syst. Washington, v.2, n.2, p.149-162,1999.

SWELIM, D.M.; HASHEM, F.M.; KUYKENDALL, L.D.; HEGAZI, N.I.; ABDEL-WAHAB, S.M. **Host specificity and phenotypic diversity of *Rhizobium* strains nodulating *Leucaena*, *Acacia* and *Sesbania* in Egypt.** Biol and Fertil of Soils, v. 25, n. 3, p. 224-232, 1997.

VERMA, S.C.; CLOWDHURY, S.P.; TRIPATHI, A.K. **Phylogeny based on 16S rDNA and nif H sequences of *Ralstonia taiwanensis* strains isolated from nitrogen-fixing nodules of *Mimosa pudica* in India.** Can.J.Microbiol. Ottawa, v.50, p.313-322, 2004.

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

XAVIER, G.R.; MARTINS, L.M.V.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. **Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea, rhizobia population.** Biol and Fertil of Soils, Berlin, v.27, n.11 , p.386-392, 1998.

CARACTERIZAÇÃO E DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE
NÓDULOS DE SOJA SOB PLANTIO DIRETO E PLANTIO
CONVENCIONAL

RESUMO O manejo correto do solo e das culturas tem sido indicado como prática fundamental para o sucesso e o conseqüente retorno econômico dos cultivos. Entretanto, tanto o preparo quanto o cultivo do solo causam grandes impactos sobre a diversidade microbiana no solo. O manejo do agrossistema pelo uso de práticas conservacionistas tais como o plantio direto pode ajudar a restabelecer a qualidade do solo, resultando em maior produtividade associada à qualidade ambiental. Com o objetivo de caracterizar isolados de nódulos de soja foram coletados nódulos dessa leguminosa em três diferentes regiões agrícolas do Estado de Mato Grosso sob plantio direto e convencional. A coleta foi realizada no período de floração dessa cultura. Foram obtidos 258 isolados de nódulos de raiz de soja em cultura pura com características típicas de rizóbios. Desses, 102 foram isolados de nódulos de soja sob plantio direto e os demais, 156 de plantio convencional. A região e o manejo do solo influenciaram a diversidade de bactérias noduladoras de soja; Há diferença entre as bactérias noduladoras de soja sob PD e sob PC.

Palavras-chave *Glycine max*, sistemas de plantio, diversidade microbiana

CARACTERIZATION AND DIVERSITY OF BACTERIAS ISOLATED FROM
SOYBEAN NODULES UNDER CONVENTIONAL TILLAGE AND NO
TILLAGE SYSTEMS

ABSTRACT The proper management of soil and crops have been indicated as key to practice success and consequently the economic return cultures. However, both the preparation and the cultivation of the soil causing major impacts on microbial diversity in soil. The management of agrossystems by the use of practices such as conservation tillage can help to restore soil quality, resulting in increased productivity associated with environmental quality. Aiming to characterize isolates from soybean nodules, some nodules were collected from three different soybean agricultural regions of the State of Mato Grosso under conventional tillage and no tillage managements. The collection was performed in the period of flowering of culture. We obtained 258 isolates from root nodules of soybean in pure culture with characteristics typical of rhizobia. Of these, 102 were isolated from nodules of soybean under tillage and the other, 156, conventional tillage. The region and soil management influence the diversity of bacteria that form nodules on soybean; There is a difference between bacteria that form nodules on soybean under no-tillage and conventional tillage.

Key-words Glycine Max, managements systems, microbial diversity.

3.1 INTRODUÇÃO

Nas regiões dos cerrados do Centro-Oeste do Brasil, o sistema plantio direto foi introduzido nos agroecossistemas em que a soja era a cultura principal, a partir dos anos 80, por produtores rurais pioneiros que já conheciam o sistema na Região Sul do Brasil.

A adoção do sistema plantio direto veio em substituição ao plantio convencional de preparo do solo, o qual demandava aração e gradagem superficial. Essas operações realizadas com frequência causam degradação do solo, tendo como consequência a erosão hídrica e eólica, o assoreamento das microbacias hidrográficas e o desequilíbrio ambiental como um todo, culminando com a progressiva queda do potencial produtivo dos agroecossistemas.

O sistema plantio direto, quando adotado seguindo os seus fundamentos de não-revolvimento do solo, rotação de culturas e coberturas permanente do solo, constitui-se em um meio de manter a diversidade microbiológica dos solos e, por conseguinte, a estabilidade dos agroecossistemas, especialmente em se tratando da região dos cerrados onde o revolvimento constante do solo e sua não cobertura permanente com palha acarretam acelerada decomposição e queima da matéria orgânica favorecendo a degradação do meio ambiente e as perdas de recursos financeiros.

Esse sistema melhora o balanço energético do sistema de produção, reduz o risco de infestação de pragas e doenças, diminui a infestação de plantas daninhas e, em relação aos recursos disponíveis, como água, nutrientes e luz, são utilizados de forma mais eficiente.

A sustentabilidade das atividades agrícolas depende, entre outros fatores, do potencial de impacto das tecnologias sobre os agroecossistemas em seus vários aspectos sociais, ambientais e econômicos (Carvalho, 1993; Kitamura, 1994).

Os agroecossistemas conduzidos de forma sustentável funcionam como um conjunto de processo em equilíbrio dinâmico, no qual seus

mecanismos homeostáticos ativos funcionam como poder-tampão diante das agressões permitindo o autocontrole ou a rearmonização automática (Andrade, 1995).

Este trabalho tem por objetivo caracterizar isolados de nódulos de soja sob plantio convencional e plantio direto em diferentes áreas agrícolas no Estado de Mato Grosso.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Áreas Agrícolas de Mato-Grosso

Esse estudo foi realizado em três áreas agrícolas localizadas em três municípios (Figura 1) com tradição no cultivo da soja (*Glycine max*) em Mato Grosso. Históricos de cultivo e tratamentos culturais estão apresentados na Tabela 1. Na tabela 2, está descrito a análise de solo das regiões onde foram coletadas as plantas e nódulos.

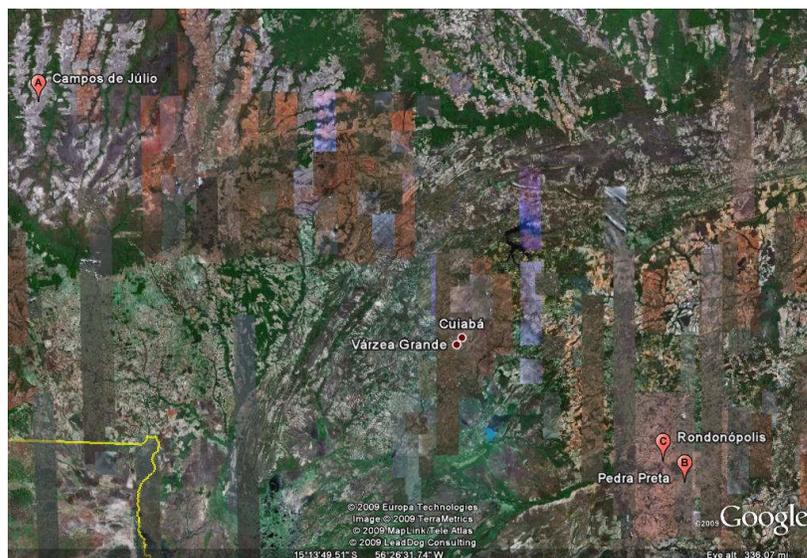


Figura 1 - Localização das três áreas de coleta de nódulos. A – Campos de Júlio ($13^{\circ}53'58''S$; $59^{\circ}08'51''W$); B – Pedra Preta ($16^{\circ}37'23''S$; $54^{\circ}28'26''W$) e C – Rondonópolis ($16^{\circ}28'15''S$; $54^{\circ}38'08''W$).

Tabela 1 – Histórico das áreas de cultivo e tratos culturais realizados em plantios comerciais de soja em diferentes municípios no Estado de Mato Grosso (Safrá 2002/2003).

Municípios	Antes da soja S.C.*	Histórico das áreas	Tratos Culturais**							
			Cal.	Adub	T.S.	Inoc.	Her.	Fun.Ins.		
Campos de Júlio	cerrado	PC	3 anos pousio inverno	S***	S	S	S	N***	S	S
		PD	3 anos milho inverno	S	S	S	S	S	S	S
Rondonópolis	Pastagem	PC	primeiro ano	N	S	S	S	N	S	S
		PD	2 anos milho inverno	N	S	S	S	S	S	S
Pedra Preta	Pastagem	PC	3 anos pousio inverno	N	N	S	S	N	S	S
		PD	8 anos milho inverno	N	N	S	S	S	S	S

S.C.* - Sistema de cultivo, PC - Plantio Convencional, PD - Plantio Direto

Tratos Culturais** - Cal. - Calagem; Adub. - adubação; T.S. - Tratamento

sementes; Inoc. - Inoculação; Her. - Herbicidas; Fun. - Fungicida; Ins. Inseticidas.

S*** - Foi utilizado; N*** - não utilizado

Tabela 2 Características químicas e físicas das áreas experimentais na profundidade de 0-20 cm. Localizadas em Mato Grosso, MT.

Locais	pH	P	K	Al+H	Ca	Mg	Al	Soma bases	CTC	V
	CaCl ₂	mg/dm ³			cmol _c /dm ³			cmol _c /dm ³		
C. júlio	4,86	2,20	0,11	5,19	1,78	0,65	0,04	2,54	7,73	32,86
PD										
PC	5,17	1,61	0,19	4,68	2,25	1,24	0,00	3,68	8,36	44,02
Rondonópolis	4,83	7,54	0,21	4,51	2,46	0,97	0,03	2,55	5,77	44,19
PD										
PC	5,29	4,43	0,08	3,66	2,81	1,34	0,00	2,88	6,43	44,79
Pedra Preta	5,06	19,15	0,06	3,22	1,98	0,51	0,00	3,64	8,15	44,66
PD										
PC	5,00	42,00	0,12	3,55	1,81	0,95	0,00	4,23	7,89	53,61

3.2.2 COLETA DE NÓDULOS

Foram coletados nódulos de raiz de soja (*Glycine max*) no período de floração dessa cultura. Os números de nódulos coletados estão apresentados na Tabela 3.

Após a coleta, os nódulos foram armazenados em frascos contendo sílica-gel e estocados no Laboratório de Microbiologia do Solo da FAMEV/UFMT sem controle de temperatura até o momento das análises.

Tabela 3. Nodulação da soja conduzida em plantio convencional ou direto e em áreas com diferentes históricos de cultivo situadas no estado de Mato Grosso. Média de 8 repetições.

Parâmetros	Campos de Júlio		Rondonópolis		Pedra Preta	
	PC	PD	PC	PD	PC	PD
N. nódulos planta ⁻¹	78,9A	38,5B	6,63A	7,06A	41,4A	17,6B
Peso seco nódulos, g.planta ⁻¹	0,15A	0,13A	0,47A	0,22B	0,18A	0,11B

Médias seguidas de mesma letra na linha e dentro de cada local, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

3.2.3 ISOLAMENTO DE RIZÓBIOS

Para o isolamento, foram escolhidos aleatoriamente cerca de 10% do total de nódulos estocados para cada região. Após os nódulos foram hidratados por um período de 12 horas, quando então foram imersos em álcool 92,8° por um período de um minuto, em seguida, ficaram imersos em hipoclorito de sódio 35% por mais um minuto e lavados em água destilada estéril conforme descrito em Araújo (1994). A concentração do hipoclorito utilizada não é a recomendada, porém estudos anteriores no laboratório, comprovam que para se ter uma efetiva desinfecção desses nódulos oriundos de áreas do Pantanal, a utilização de maiores concentrações obtém-se melhores resultados.

Após a desinfecção, os nódulos foram esmagados e riscados em placas de Petri contendo meio específico para isolamento de rizóbios composto de extrato de levedura, manitol e sais minerais (YMA) (Vincent, 1970) (Apêndice 1). As placas foram incubadas a 28°C por um período de 10 dias.

Após esse período, foi verificada a pureza da cultura e as características morfológicas e fisiológicas foram avaliadas.

3.2.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E FISIOLÓGICA

Foi verificado a reação ao pH do meio de cultivo de acordo com a classificação: ácida, para os isolados que transformaram o meio de cultivo

para coloração amarela; alcalina, para os isolados que transformaram o meio de cultivo para coloração azul e neutra, para os isolados que não modificaram o meio de cultivo permanecendo na coloração verde.

A caracterização morfológica das colônias foi realizada seguindo os seguintes parâmetros: cor de colônia; formato da borda da colônia (regular ou irregular); detalhes ópticos (opaco, transparente e translúcida); observação da presença ou ausência de muco. Nesse estudo o forma da colônia de todos os isolados foram considerados circular.

A morfologia da célula do isolado e a pureza da cultura também foi observada através da técnica de coloração de GRAM (Apêndice 2). Foi considerado rizóbio todo isolado com o formato de bastonete e de coloração rósea (Gram negativo).

As características das estirpes recomendadas pelo Ministério da Agricultura para o cultivo da soja, as estirpes *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA5019) e *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA5079 e SEMIA5080) oriundas da FEPAGRO (Fundação estadual de pesquisa agropecuária), foram utilizadas para comparação com os isolados. As características da bactéria *Rhizobium leguminosarum* também foi utilizada para comparação.

3.2.5 ESTABELECIMENTO DA COLEÇÃO DE CULTURAS

Os isolados devidamente caracterizados e purificados foram armazenados em microtubos contendo glicerol na proporção de 40% de solução final e estocados em ultrafreezer -20°C. Receberam cada um, identificação alfa-numérica de UFMT-50, para o primeiro isolado e UFMT-652, para o último isolado.

3.2.6 ANÁLISE DOS DADOS

Foi realizada análise de similaridade pelo método complete linkage, utilizando o programa Systat for Windows versão 11 de 2004. As análises foram realizadas com base nas seguintes informações: Cor da colônia;

produção de muco; tempo de crescimento; reação ao pH; detalhe óptico (transparência). Cada análise foi separada por hospedeiro.

A partir dessas informações, foi montada uma matriz de ausência e presença para cada característica observada como descrita na Tabela 4 e submetido ao programa para análise.

Tabela 4 Características observadas dos isolados bacterianos e respectiva atribuição de valores para montagem do dendrograma de similaridade.

Descrição das Características Avaliadas	Características	
1 - Tempo de Crescimento em dias	1 a 3 dias	1
	4 a 5 dias	2
	6 a 10 dias	3
2 - Alteração do pH do meio de cultivo	Ácido	4
	Neutro	5
	Básico	6
3 - Produção de muco	s/ muco	7
	Pouco	8
	Médio	9
	Abundante	10
4 - Coloração da colônia	Branca	11
	Branca amarelada	12
	Amarela	13
	Amarela c/borda clara	14
	Crème	15
	Marrom	16
	Rosa	17
5 - Detalhe óptico (D.O.)	Opaco	18
	Translúcido	19
	Transparente	20
6 - Característica da borda da colônia	Regular	21
	Irregular	22

O índice de diversidade de Shannon (H) foi obtido por: $H = -\sum p_i \log p_i$, sendo $p_i = n_i/N$; n_i = densidade de cada grupo; e $N = \sum$ da densidade de todos os grupos. Este índice assume valores que podem variar de 0 a 5; o declínio de seus valores é o resultado de maior dominância de grupos em detrimento de outros (Begon et al., 1996). O Índice de Uniformidade de

Pielou (J) é um índice de equitabilidade, sendo definido por: $J = H/\log S$, em que H= valor do índice de diversidade de Shannon; e S = número de grupos funcionais.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 258 isolados (Tabela 5) de nódulos de raiz de soja em cultura pura com características típicas de rizóbios. Desses, 102 foram isolados de nódulos de soja sob plantio direto e os demais, 156 de plantio convencional.

Tabela 5 - Quantidade de isolados bacterianos e respectivos percentuais de características fisiológicas.

Hospedeiro	Tipo nódulo	Total Isolados	%			
			Reação pH	Muco (+)	Muco (-)	
Soja (<i>Glycine max.</i>)	Raiz (PD)	102	Ácida	80,4	14,6	85,4
			Alcalina	3,9	50	50
			neutra	15,7	87,5	12,5
	Raiz (PC)	156	Ácida	73,1	43	57
			alcalina	12,8	60	40
			neutra	14,1	27,3	72,7

A maioria dos isolados tiveram reação ácida ao pH do meio YMA não produzindo muco. A reação ácida ao pH não é uma condição comum de ser encontrada para rizóbios tendo a soja como hospedeira. Contudo esses resultados estão de acordo com Kober et al.(2004) que obtiveram isolados variantes de *Bradyrhizobium* em soja com reação ácida ao meio YMA e produtores de muco.

Soares et al. (2006) observaram, mesmo em áreas que tinham sido inoculadas anteriormente, as populações nativas que nodularam feijão mostraram-se bastante diversas fenotipicamente e não incluíram estirpes similares às estirpes introduzidas como inoculantes.

Andrade et al. (2002) isolaram rizóbios a partir de nódulos de *Phaseolus vulgaris* onde todos foram de crescimento rápido e a maioria (81%) produziu muco. Vale ressaltar que essa leguminosa foi inoculada com

amostras do próprio solo da região onde foi cultivada, fato que nos leva a inferir que são rizóbios nativos.

Tabela 6 – Número de isolados de bactérias por grupo formado, de acordo com a cor das colônias e seus respectivos hospedeiros.

		SOJA		
	Morfoespécies	PPreta	Rondonópolis	CJúlio
PC	1	24	1	5
	2	-	-	1
	3	22	44	43
	4	3	1	1
	5	1	1	6
	6	-	1	-
	7	1	-	-
PD	1	3	1	7
	2	-	-	-
	3	8	34	45
	4	-	-	-
	5	-	3	1
	6	-	-	-
	7	-	1	-

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 6, onde há distribuição dos isolados de acordo com a região de isolamento e plantio, separados por morfoespécies (a descrição das morfoespécies estão na Fig. 2) pode-se observar que a morfoespécie 3 apresenta-se abundante nos dois sistemas de cultivo e nas três áreas avaliadas. A morfoespécie 6 só ocorreu em Rondonópolis sob plantio convencional e a morfoespécie 7 sob plantio direto. Em Pedra Preta também ocorreu a morfoespécie 7 porém sob plantio convencional. A morfoespécie 1 foi mais abundante em Pedra Preta enquanto a 5 foi mais abundante em Campos de Júlio.

Considerando esses resultados, podemos inferir que o tipo de manejo e a região podem influenciar as comunidades microbianas.

Ferreira et al. (2000) estudaram 142 isolados de *Bradyrhizobium* em uma área que há 15 anos não recebia tratamento com inoculantes e alta diversidade e alta taxa de fixação de nitrogênio foi encontrada nos isolados do sistema de PD. Jesus et al. (2005) também constataram que os

diferentes sistemas de uso da terra alteram a composição de bactérias que nodulam siratro.

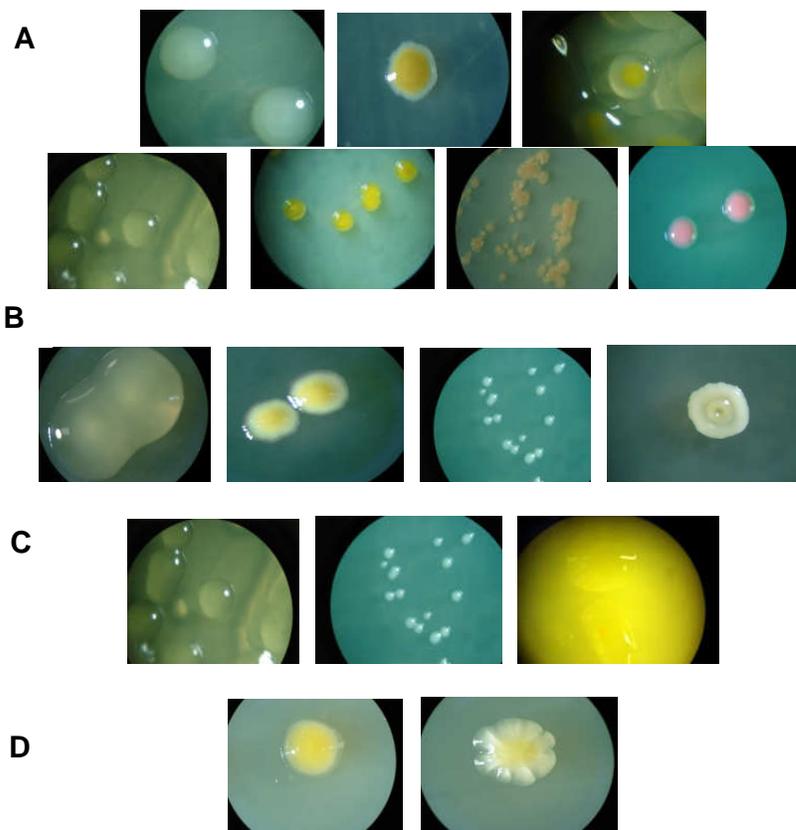


Figura 2 – Características morfológicas observadas nos isolados bacterianos. A – Cor de colônia (branca; branca amarelada; amarela borda clara; creme; amarela; marrom; rosa); B – Produção de muco (abundante; médio, pouco; sem muco); C – Detalhe óptico (translúcido; opaco; transparente); D – Formato da borda (regular; irregular).

A diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas em milho exibiu grande diferença particularmente entre as amostras de diferentes tipos de solo, regime hídrico e regiões geográficas (Roesch et al. 2007).

Avaliando-se o índice de Shannon-Wiener (H') (Tabela 7) a diversidade microbiana encontrada no cultivo de soja sob plantio convencional da região de Pedra Preta foi maior se comparada com as demais. A soja sob plantio direto apresentou diversidade maior apenas na região de Rondonópolis.

Apesar de ter havido diversidade, os valores são relativamente baixos indicando que há dominância de alguns grupos sobre outros. E ainda, a abundância das espécies (J) foi bastante inferior principalmente nas áreas sob plantio direto, significando que em todas as amostragens há grande uniformidade da comunidade microbiana. Segundo Miranda et al. (2009) a eqüitabilidade em agrossistemas mais complexos como monocultivo consorciado com gramíneas tende a ser melhor para a diversidade em fungos micorrízicos arbusculares.

Essa tendência talvez justifique a maior diversidade no PD na região de Rondonópolis que representa uma área de pastagem recém utilizada para o cultivo da soja sob plantio convencional e com 2 anos sob plantio direto em consórcio com milho no inverno. É nessa região que houve maior número de nódulos por planta e maior disponibilidade do nutriente K (potássio).

Tabela 7 – Índices de Shannon (H') e Pielou (J) para cada região e tipo de nódulo estudado.

Tipo de Plantio*	SOJA					
	PEDRA PRETA		RONDONÓPOLIS		CAMPOS JÚLIO	
	H'	J	H'	J	H'	J
PC	1,038256	0,533558	0,4024	0,2068	0,8016	0,4119
PD	0,585953	0,30112	0,5048	0,2594	0,4812	0,2473

*PC – plantio convencional; PD – plantio direto

Há de se ressaltar que as gramíneas por apresentarem colonização micorrízica superior às áreas sob cultivo de soja em dois tipos de solo conforme constatado por Cordeiro et al., 2005, geralmente favorecem uma importante interação fungo micorrízico-rizóbio da simbiose micorrízica na cultura da soja. São relatados efeitos positivos dessa interação (Pacovsky et al., 1986), resultado de melhor nutrição, como, por exemplo, o fornecimento de fósforo às raízes (Bethlenfalvay e Yoder, 1981), e/ou garantindo o suprimento desse nutriente aos bacterióides (Bergersen, 1971).

Lima (2006) observou que além do sistema de uso da terra influenciar a diversidade da população de bactérias que nodulam

leguminosas, concluiu que o sistema de pastagem é o segundo maior em riqueza cultural sendo o sistema de agricultura o penúltimo em riqueza.

A uniformidade descrita pelo índice de Pielou, também pode ser observada nos dendrogramas gerados com base nas características morfofisiológicas dos isolados bacterianos em suas respectivas regiões de isolamento.

Na Figura 3 está representado o dendrograma gerado pelo método complete linkage de isolados de nódulos de raiz de soja (*Glycine max*) na região de Campos de Júlio. É possível observar diversidade pela formação de oito grupos à aproximadamente 80% de similaridade.

O agrupamento I está constituído de 6 isolados de nódulos de raiz sob plantio convencional, com exceção do isolado UFMT 477. O segundo (II) agrupamento foi formado pela maioria de isolados de plantas sob PD (8) sendo 4 de plantas sob PC. O III agrupamento uniu 10 isolados de plantas sob PC e 1 do PD com a estirpe tipo *Rhizobium leguminosarum* utilizada para comparação.

O agrupamento IV contempla 3 isolados de plantas sob PC e 2 sob PD. O agrupamento V agrupou uniformemente 30 isolados de plantas sob PC e 30 sob PD.

Os agrupamentos VI e VII contêm a maioria de isolados de plantas sob PD (12), com exceção dos isolados UFMT 162 e 440. O agrupamento VIII formou-se independente dos demais e uniu apenas as estirpes tipo SEMIA 5080, 5079, 5019 e 587 utilizadas para comparação.

Na Figura 4 está representado o dendrograma de similaridade baseado nas características morfofisiológicas dos isolados de nódulos de soja na região de Pedra Preta a 70% de similaridade.

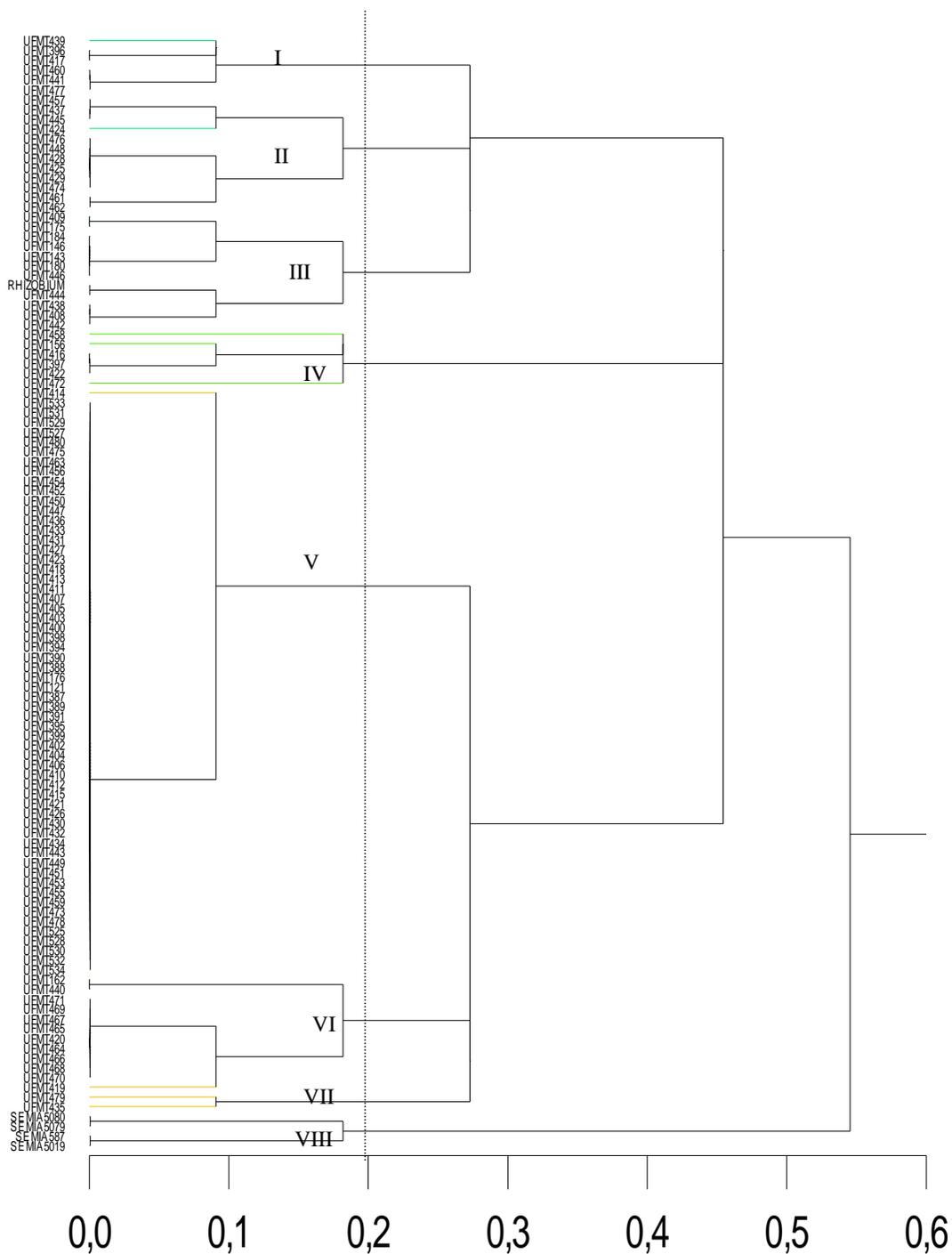


Figura 3 – Dendrograma baseado em características morfofisiológicas de isolados de nódulos de raiz de soja sob plantio direto e convencional na região de Campos de Júlio – MT. SEMIA 587, 5019, 5079, 5080 e *Rhizobium leguminosarum* fora utilizados para comparação. O método foi Complete linkage.

A grande maioria dos isolados dessa região são oriundo do sistema PC de cultivo. Para os isolados do agrupamento I, oito são do PD e 24 do PC agrupando-se com a estipe tipo *Rhizobium leguminosarum*.

Do total de 11 isolados agrupados em II, dois (UFMT 582 e 583) são oriundos do PD.

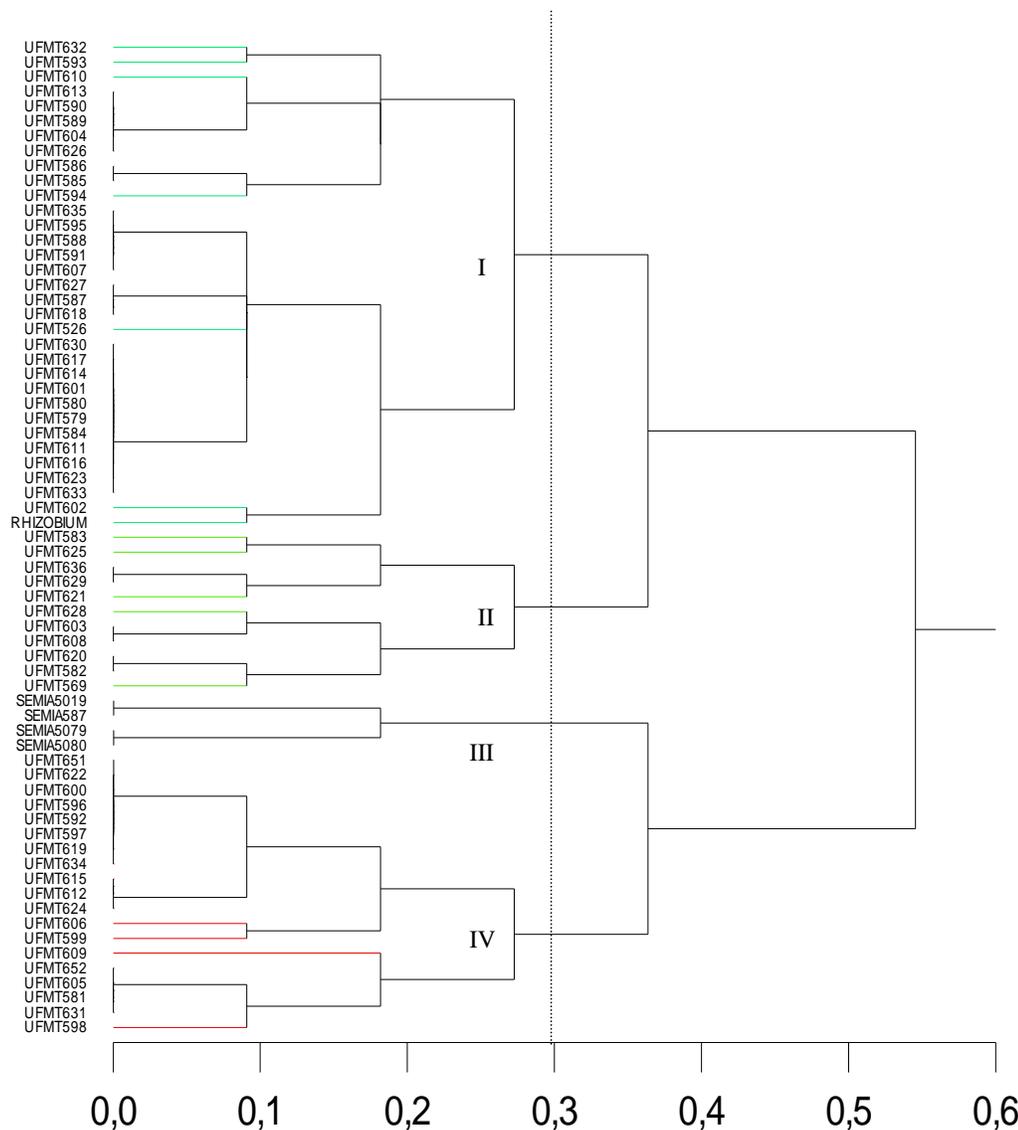


Figura 4 – Dendrograma baseado em características morfofisiológicas de isolados de nódulos de raiz de soja sob plantio direto e convencional na região de Pedra Preta – MT. SEMIA 587, 5019, 5079, 5080 e *Rhizobium leguminosarum* foram utilizados para comparação. O método foi Complete linkage.

No agrupamento III foram agrupados apenas as estirpes tipo SEMIA. Esse grupo é sub-grupo de um grupo maior que está ligado à 64% de similaridade com o agrupamento IV. Este, agrupou 19 isolados do PC e 1 do PD.

Apesar de ter havido apenas 11 isolados oriundos do PD, foi nesse grupo que se encontrou a maior diversidade como constatado na Tabela 7.

O dendrograma de similaridade gerado com base nas características morfofisiológicas de nódulos de raiz de soja para região de Rondonópolis está representado na Figura 5.

Os agrupamentos II, VII e VIII são formados exclusivamente por isolados do sistema PD de cultivo.

O agrupamento I foi formado apenas pelos padrões SEMIA e se agruparam a 60% de similaridade com o agrupamento II.

Os agrupamentos III e IV contém a maioria de isolados do PC com exceção de 3 isolados (UFMT 556, 568 e 565) que são do PD. O grupo IV contém a estirpe tipo *Rhizobium leguminosarum* utilizado para comparação.

O agrupamento V contém a maioria de isolados do PD (24) e 16 isolados do PC.

Os resultados observados para todos os dendrogramas indicam diversidade e uniformidade na distribuição dos isolados além da tendência de diferenças entre os isolados de nódulos sob sistema de cultivo PC e PD. Pode-se afirmar que os sistemas de cultivo influenciam as populações microbianas.

Alta diversidade genética também foi encontrada em isolados de 23 áreas diferenciadas de cultivo de feijão. Porém, ao contrário desse estudo, nenhum dos atributos avaliados como as características morfofisiológicas dos isolados e a genética, foram correlacionados com manejo, distribuição geográfica ou condições climáticas (Stocco et al., 2008). Fato esse também observado por Soares et al. (2006) avaliando a população nativa de isolados de caupi, onde foi apresentada alta diversidade fenotípica cultural e padrões protéicos apesar de não ter havido relação entre eles.

Giongo (2007) afirma que *Bradyrhizobium* noduladores de soja no estado de Rio Grande do Sul são muito variáveis e mostraram ser bastante influenciados por parâmetros abióticos. Segundo esse autor, a alta diversidade das populações analisadas enfatiza a ação das condições ambientais sobre as populações bacterianas.

Os resultados obtidos nesse estudo indicam que os fatores ambientais como os estresses naturais: temperatura, acidez, alta/baixa salinidade, etc. assim como os sistemas de cultivo da terra selecionam e afetam os grupos microbianos capazes de nodular leguminosas dependendo de seu aparato genético como observado por Giongo (2007).

No caso dos isolados de nódulos de soja, a região de isolamento e o manejo foram fatores importantes na separação dos grupos de rizóbios. Como constatado por Maila et al. (2006), Yao et al. (2006), Drissner (2007) e Elfstrand et al. (2007) mudanças na diversidade das comunidades microbianas do solo podem ocorrer de acordo com manejo do solo favorecendo a diversidade microbiana.

Em nosso estudo, é possível que a aplicação de herbicidas nos sistemas sob PD tenham influenciado para a pequena quantidade de nódulos nesse sistema quando comparado com PC desfavorecendo também a diversidade. Silva et al. (2006) relataram prejuízos no processo de micorrização em função da época da aplicação de herbicidas, e ressaltaram que a presença da micorriza incrementa a biomassa de nódulos.

A composição do solo também afeta a diversidade microbiana. Loureiro et al. (2007) observaram que solos com alto conteúdo de argila podem reduzir a diversidade quando comparado com solos arenosos, devido, provavelmente, à aeração reduzida.

A identificação rápida e confiável de estirpes continua sendo o objetivo mais importante nos estudos taxonômicos, por isso a utilização das ferramentas da biologia molecular ainda é uma ótima alternativa. Porém a avaliação fenotípica contabilizando os efeitos ambientais e das interações genótipo versus ambiente continuarão sendo de grande importância e

essenciais para subsidiar a utilização prática dos recursos genéticos nos sistemas de produção e nos programas de melhoramento (Faleiro, 2007).

Esses estudos são necessários para melhor entendimento da biodiversidade do rizóbio presente no solo, facilitar a comunicação entre os cientistas e buscar um maior entendimento da biologia e evolução desta simbiose.

3.4 CONCLUSÕES

A região e o manejo do solo influenciam a diversidade de bactérias isoladas de nódulos de soja;

As análises de agrupamento e os índices demonstraram diferenças entre os isolados sob os dois sistemas de plantio.

3.5 REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, D.S.; MURPHY, P.J.; GILLER, K.E. **The diversity of *Phaseolus-Nodulating* rhizobial is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil.** App. Environm. Microbiol., New York, v.68, n.8, p.4025-4034, 2002.

ANDRADE L. A. **Desenvolvimento sustentável: uma abordagem conceitual.** Debate, Viçosa, n 19, p.56-53, 1995.

BEGON, M.; HARPER, J.L; TOWNSEND, C.R. **Ecology: Individuals, populations and communities.** 3.ed. Oxford, Blackwell Science, 1996. 1068p.

BERGERSEN, F. J. **Biochemistry of symbiotic nitrogen fixation in legumes.** Ann. Rev. Plant Physiol., New York, v. 21, n. 2,p. 121-140, 1971.

BETHLENFALVAY, G. J.; YODER, J. F. The *Glycine –Glomus – Rhizobium* symbioses. I. Phosphorus effects on nitrogen fixation and mycorrhizal infection. **Physiol. Plant.**,v. 52, n. 2, p. 141-145, 1981.

CARVALHO H. M. **Desenvolvimento sustentável e padrões de sustentabilidade.** Cuiabá:PRODEAGRO, 1993. 37p.

CORDEIRO, M. A. S.; CARNEIRO, M. A. C.; PAULINO, H. B; SAGGIN JUNIOR, O. J. **Colonização e densidade de esporos de fungos**

micorrízicos em dois solos do Cerrado sob diferentes sistemas de manejo. Pesq. Agropec. Trop. Brasília, v.35, p. 147-153, 2005.

DRISSNER, D., BLUM, H., TSCHERKO, D., KANDELER, E. **Nine years of enriched CO₂ changes the function and structural diversity of soil microorganisms in a grassland.** European Journal of Soil Science, London, v. 58, n.4, p. 260–269, 2007.

EFSTRAND, S., HEDLUND, K., MARTENSSON, A. **Soil enzyme activities, microbial community composition and function after 47 years of continuous green manuring.** Applied Soil Ecology, New York, v. 35, n.5, p. 610–621, 2007.

FALEIRO, F.G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos.** Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2007, 102 p.

FERREIRA, M.C.; ANDRADE D.S.; CHUEIRE, L.M.O.; TAKEMURA, S.M.; HUNGRIA, M. **Tillage method and crop rotation on the population sizes and diversity of bradyrhizobia nodulating soybean.** Soil Biol. Biochem. Oxford, v.32, p.627-637, 2000.

GIONGO, A. **Diversidade de *Bradyrhizobium elkanii* e *B. japonicum* que nodulam soja em solos do Rio Grande do Sul.** 2007. 148f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, 2007.

JESUS, E.da C., MOREIRA, F.M.S., FLORENTINO, L.A., RODRIGUES, M.I.D., OLIVEIRA, M.S. **Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental.** Pesq. agropec. bras., Brasília, v.40, n.8, p.769-776, 2005.

KITAMURA P. **A agricultura e o desenvolvimento sustentável.** Agricultura Sustentável, v.1, p. 27-32, 1994.

KOBER, M.V.; SÁ, E.L.S.;FREIRE, J.R.; GIONGO, A. **Characterization of variants of *Bradyrhizobium elkanii* and *B. japonicum* and symbiotic behaviour in soybeans.** Ciência Rural, Santa Maria, v. 34 n. 5 p.1459-1464, 2004.

LIMA, A.S. **Densidade, eficiência e diversidade de bactérias fixadoras de N₂ que nodulam o siratro (*Macroptilium atropurpureum*) de solos sob diferentes usos na Amazônia Ocidental.** 2007. 167f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras, 2007.

LOUREIRO, M.F. KASCHUK, G.; ALBERTON, O.; HUNGRIA, M. **Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] rhizobial diversity in Brazilian oxisols under**

various soil, cropping and inoculation managements. Biol. Fertil. Soils, v.43, p.665-674, 2007.

MAILA, M.P., RANDIMA, P., DRONEN, K., CLOETE, T.E. **Soil microbial communities: Influence of geographic location and hydrocarbon pollutants.** Soil Biology & Biochemistry, Oxford, v. 38, n.8, p. 303–310, 2006.

MIRANDA, E.M., SILVA, E.M.R., SAGGIN JÚNIOR, O.J. **Comunidades de fungos micorrízicos arbusculares associados ao amendoim forrageiro em pastagens consorciadas no sudoeste amazônico.** Disponível em: <http://www.iamazonica.org.br/home/index.php?id=eventos/biodiversidadeSolo/artigosDocumentos.php>. Acessado em Abril de 2009.

PACOVSKY, R. S.; PAUL, E. A.; BETHLENFALVAY, G. J. **Response of mycorrhizal and P fertilized soybeans to nodulation by *Bradyrhizobium* or ammonium nitrate.** Crop Sci., Madison, v. 26, n. 1, p. 145-150, 1986.

PIELOU, E.C. **Ecological Diversity.** NewYork: Wiley, 1975. 165 p.

ROESCH, L.F.W.; PASSAGLIA, M.L.P.; BENTO, F.M.; TRIPLETT, E.W.; CAMARGO, F.A.O. **Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho.** R. Bras. Ci. Solo, Viçosa, v.31 n 6, p.1367-1380, 2007.

SILVA, A.C., SANTOS, J.B., KASUYA, M.C.M., SILVA, A.A., MANABE, A. **MICORRIZAÇÃO E ÉPOCAS DE DESSECAÇÃO DE *Brachiaria brizantha* NO DESENVOLVIMENTO DA SOJA.** Planta Daninha, Viçosa, v. 24, n. 2, p. 271-277, 2006.

SHANNON, C.E.; WEAVER, W. **The Mathematical Theory of Communication.** Urbana, IL, USA: University of Illinois Press.1949, 148 p.

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 .** R.bras.cienc.solo. Viçosa, v.30, s/n, p.795-802, 2006.

STOCCO, P.; SANTOS, J.C.P.; VARGAS, V.P.; HUNGRIA, M. **Avaliação da biodiversidade de rizóbios simbiotes do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em Santa Catarina.** R.bras.ci.solo, Viçosa, v.32, n.3, p.1107-1120, 2008.

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

YAO, H., BOWMAN, D., SHI, W. **Soil microbial community structure and diversity in a turfgrass chronosequence: Land-use change versus turfgrass management.** Appl Soil Ecol. Oxford, v.34, n.8, p. 209–218, 2006.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao término do isolamento e purificação, foram obtidos 603 isolados oriundos de nódulos de raiz ou caule de *Discolobium spp.*, *Aeschynomene fluminensis* e Soja (*Glycine max*). Todas as características observadas foram depositadas em um banco de dados do LNCC. O desenvolvimento desse site teve por objetivo agrupar informações sobre isolados de Coleções de Cultura das instituições envolvidas nesse projeto em todo o Brasil. Esse trabalho faz parte de um projeto maior financiado pelo CNPq, sob o título de “Rede Centro-Sul para a manutenção, bioprospecção e caracterização da biodiversidade de coleção de culturas e de genes de bactérias de importância agroindustrial: diazotróficas e promotoras do crescimento de plantas” que possui como objetivos principais recuperar, manter e expandir as coleções de cultura das seguintes instituições: Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Embrapa Soja, Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), Embrapa Agropecuária Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) e Embrapa Cerrados.

A coleção de culturas estabelecida na UFMT tem por finalidade a pesquisa, o ensino e a manutenção desse pequeno patrimônio biológico, porém, de grande importância para a Microbiologia do Solo, uma vez que a maioria dos isolados são de ambientes naturais, como o Pantanal.

5 CONCLUSÕES GERAIS

As características morfofisiológicas avaliadas nesse estudo são importantes para separação de grupos microbianos, porém, é necessário que se faça análise genética para separação dos grupos em nível de espécie;

Os isolados que mais se aproximaram das estirpes usadas para comparação, merecem maiores estudos;

Testes para verificação da capacidade de nodulação e fixação biológica de nitrogênio, devem ser realizados.

APÊNDICES

Apêndice 1 – Composição do meio de cultura YMA utilizado no trabalho.

<i>Reagente</i>	<i>Quantidade</i>
Manitol (crescimento lento)	10 g
K ₂ HPO ₄ – Solução 10%	1 mL
KH ₂ PO ₄ – Solução 10%	4 mL
MgSO ₄ . 7H ₂ O – Solução 10%	2 mL
NaCL – Solução 10%	1 mL
Extrato de Levedura	0,4 g
Azul de Bromotimol – Solução 0,5% em 0,2N KOH	5 mL

Completar para um litro de água destilada, ajustar o pH com KOH 10% para 6,8-7,0 (se necessário, a solução deve ficar com coloração verde).
Acrescentar 15 g de Agar-ágar por litro para meio sólido.

Apêndice 2 – Reagentes para Coloração de GRAM

<i>Reagentes</i>	<i>Quantidade</i>
- Cristal Violeta	
Cristal violeta	110 g
Oxalato de amônio	4 g
Etanol	100 mL
Água destilada	400 mL
- Lugol	
Iodo	1 g
Iodeto de potássio	2 g
Etanol	25 mL
Água destilada	100 mL
- Fucsina	
Fucsina básica	2,5 g
Água destilada	90 mL
Etanol	100 mL

Apêndice 3 - Identificação e caracterização dos isolados de *Discolobium* spp.

Isolados	Nódulo	Local Coleta	Reação pH	Muco*	Cor	Forma	Borda**	DO* **	Dias
UFMT-50	Caule	Nhecolândia/MS	Neutro	S	Branca	Circular	I	O	1
UFMT-51	Caule	Nhecolândia/MS	Ácido	A	Branca Amarelada	Circular	R	O	1
UFMT-52	Caule	Nhecolândia/MS	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-53	Caule	Poconé/MT	Neutro	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-54	Caule	Nhecolândia/MS	Básico	A	Amarela	Circular	I	O	1
UFMT-55	Caule	Nhecolândia/MS	Ácido	A	Branca Amarelada	Circular	R	O	1
UFMT-56	Raiz	Poconé/MT	Neutro	A	Branca	Circular	R	O	1
UFMT-57	Caule	Poconé/MT	Neutro	A	Branca Amarelada	Circular	R	O	1
UFMT-58	Caule	Poconé/MT	Neutro	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-59	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-60	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-61	Raiz	Nhecolândia/MS	Ácido	A	Branca Amarelada	Circular	R	O	1
UFMT-62	Raiz	Nhecolândia/MS	Básico	A	Branca	Circular	R	O	1
UFMT-63	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Branca	Circular	R	O	1
UFMT-64	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-65	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-66	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Branca	Circular	R	O	1
UFMT-67	Raiz	Nhecolândia/MS	Neutro	A	Branca Amarelada	Circular	R	O	1
UFMT-68	Raiz	Nhecolândia/MS	Básico	S	Branca Amarela c/	Circular	R	O	1
UFMT-69	Caule	Nhecolândia/MS	Ácido	A	Borda Clara	Circular	R	O	1
UFMT-70	Caule	Nhecolândia/MS	Ácido	A	Branca	Circular	R	O	1
UFMT-71	Caule	Nhecolândia/MS	Neutro	A	Branca	Circular	R	O	1
UFMT-72	Caule	Nhecolândia/MS	Neutro	S	Creme	Circular	R	O	1
UFMT-73	Caule	Nhecolândia/MS	Básico	A	Branca Amarelada	Circular	R	O	1
UFMT-74	Caule	Nhecolândia/MS	Neutro	A	Branca	Circular	R	O	1
UFMT-75	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Branca	Circular	R	O	1
UFMT-76	Raiz	Poconé/MT	Básico	A	Branca	Circular	R	O	1
UFMT-77	Raiz	Poconé/MT	Neutro	S	Branca	Circular	R	O	1
UFMT-78	Raiz	Poconé/MT	Neutro	A	Branca	Circular	R	O	1
UFMT-79	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Branca Amarelada	Circular	R	O	1
UFMT-80	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-81	Raiz	Poconé/MT	Neutro	A	Creme	Circular	R	O	1
UFMT-82	Caule	Poconé/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-83	Caule	Poconé/MT	Básico	A	Creme	Circular	R	O	1
UFMT-84	Caule	Poconé/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	TL	1
UFMT-85	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-86	Caule	Poconé/MT	Neutro	S	Branca	Circular	I	O	1

Isolados	Nódulo	Local Coleta	Reação pH	Muco*	Cor	Forma	Borda**	DO** *	Dias
UFMT-87	Raiz	Poconé/MT	Básico	S	Branca	Circular	R	O	1
UFMT-88	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-89	Caule	Poconé/MT	Básico	S	Branca	Circular	I	O	1
UFMT-90	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-91	Caule	Poconé/MT	Básico	S	Branca	Circular	R	O	1
UFMT-92	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Creme	Circular	I	O	1
UFMT-95	Caule	Poconé/MT	Básico	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-96	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Creme	Circular	R	O	1
UFMT-97	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-93	Raiz	Nhecolândia/MS	Básico	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-94	Raiz	Nhecolândia/MS	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-98	Caule	Nhecolândia/MS	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-99	Caule	Nhecolândia/MS	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-100	Caule	Nhecolândia/MS	Ácido	A	Creme	Circular	R	O	1
UFMT-103	Caule	Nhecolândia/MS	Básico	S	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-104	Caule	Nhecolândia/MS	Básico	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-105	Caule	Nhecolândia/MS	Ácido	A	Branca	Circular	R	TL	1
UFMT-106	Caule	Nhecolândia/MS	Básico	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-107	Caule	Nhecolândia/MS	Básico	A	Creme	Circular	R	O	1
UFMT-108	Caule	Nhecolândia/MS	Básico	A	Creme	Circular	R	O	1
UFMT-110	Raiz	Nhecolândia/MS	Básico	A	Branca	Circular	R	O	1
UFMT-111	Raiz	Nhecolândia/MS	Básico	A	Branca	Circular	R	O	1
UFMT-112	Caule	Nhecolândia/MS	Neutro	A	Branca	Circular	R	O	1
UFMT-113	Raiz	Nhecolândia/MS	Neutro	A	Branca	Circular	R	O	1
UFMT-101	Caule	Poconé/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-102	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-114	Raiz	Poconé/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	I	O	1
UFMT-115	Raiz	Poconé/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-116	Raiz	Poconé/MT	Ácido	M	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-117	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-118	Raiz	Poconé/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-119	Raiz	Poconé/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-120	Raiz	Poconé/MT	Neutro	M	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-122	Raiz	Poconé/MT	Ácido	M	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-123	Raiz	Poconé/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	I	O	1
UFMT-124	Raiz	Poconé/MT	Neutro	S	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-125	Raiz	Poconé/MT	Neutro	E	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-126	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Branca	Circular	R	O	1
UFMT-127	Raiz	Poconé/MT	Neutro	E	Branca	Circular	R	O	1
UFMT-128	Raiz	Poconé/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-129	Raiz	Poconé/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-130	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Creme	Circular	R	O	1
UFMT-132	Raiz	Poconé/MT	Neutro	E	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-133	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-134	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Branca	Circular	R	O	1

Isolados	Nódulo	Local Coleta	Reação pH	Muco*	Cor	Forma	Borda**	DO** *	Dias
UFMT-135	Raiz	Poconé/MT	Neutro	E	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-136	Raiz	Poconé/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	I	O	1
UFMT-137	Raiz	Poconé/MT	Neutro	E	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-138	Raiz	Poconé/MT	Ácido	M	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-139	Raiz	Poconé/MT	Ácido	M	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-140	Raiz	Poconé/MT	Básico	S	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-141	Raiz	Poconé/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-142	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Creme	Circular	R	O	1
UFMT-144	Raiz	Poconé/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	I	O	1
UFMT-145	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Creme	Circular	R	O	1
UFMT-147	Raiz	Poconé/MT	Ácido	M	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-148	Raiz	Poconé/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-149	Raiz	Poconé/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-150	Raiz	Poconé/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-151	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Creme	Circular	R	O	1
UFMT-152	Raiz	Poconé/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	I	O	1
UFMT-153	Raiz	Poconé/MT	Neutro	S	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-154	Raiz	Poconé/MT	Ácido	M	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-155	Raiz	Poconé/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-157	Raiz	Poconé/MT	Neutro	S	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-158	Raiz	Poconé/MT	Neutro	S	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-159	Raiz	Poconé/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	I	O	1
UFMT-160	Raiz	Poconé/MT	Neutro	M	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-161	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Creme	Circular	R	O	1
UFMT-163	Raiz	Poconé/MT	Neutro	E	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-164	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-165	Raiz	Poconé/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	I	O	1
UFMT-166	Raiz	Poconé/MT	Neutro	S	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-167	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-168	Raiz	Poconé/MT	Ácido	E	Creme	Circular	I	O	1
UFMT-169	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Creme	Circular	R	O	1
UFMT-170	Raiz	Poconé/MT	Ácido	M	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-171	Raiz	Poconé/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-172	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-173	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-174	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-177	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Creme	Circular	R	O	1
UFMT-178	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-179	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-181	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-182	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-183	Raiz	Poconé/MT	Ácido	M	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-185	Raiz	Poconé/MT	Neutro	E	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-186	Raiz	Poconé/MT	Ácido	M	Amarela	Circular	R	O	1

Isolados	Nódulo	Local Coleta	Reação pH	Muco*	Cor	Forma	Borda**	DO** *	Dias
UFMT-187	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-188	Raiz	Poconé/MT	Neutro	E	Creme	Circular	I	O	1
UFMT-189	Raiz	Poconé/MT	Básico	S	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-190	Raiz	Poconé/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-191	Raiz	Poconé/MT	Neutro	A	Creme	Circular	I	O	1
UFMT-192	Raiz	Poconé/MT	Neutro	A	Creme	Circular	R	O	1
UFMT-194	Raiz	Poconé/MT	Ácido	M	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-195	Raiz	Poconé/MT	Neutro	E	Amarela	Circular	I	O	1
UFMT-196	Raiz	Poconé/MT	Neutro	A	Creme	Circular	R	O	1
UFMT-197	Raiz	Poconé/MT	Neutro	S	Creme	Circular	I	O	1
UFMT-198	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Creme	Circular	R	O	1
UFMT-199	Raiz	Poconé/MT	Neutro	M	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-200	Raiz	Poconé/MT	Ácido	M	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-201	Raiz	Poconé/MT	Neutro	E	Amarela	Circular	I	O	1
UFMT-202	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-203	Raiz	Poconé/MT	Neutro	E	Creme	Circular	I	O	1
UFMT-204	Raiz	Poconé/MT	Ácido	S	Branca	Circular	R	O	1
UFMT-205	Raiz	Poconé/MT	Neutro	E	Branca	Circular	R	O	1
UFMT-206	Raiz	Poconé/MT	Neutro	E	Creme	Circular	I	O	1
UFMT-207	Raiz	Poconé/MT	Neutro	A	Creme	Circular	R	O	1
UFMT-208	Raiz	Poconé/MT	Básico	E	Creme	Circular	I	O	1
UFMT-209	Raiz	Poconé/MT	Ácido	M	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-210	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-211	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Creme	Circular	R	O	1
UFMT-212	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-213	Raiz	Poconé/MT	Neutro	A	Creme	Circular	R	O	1
UFMT-214	Raiz	Poconé/MT	Neutro	E	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-215	Raiz	Poconé/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-216	Raiz	Poconé/MT	Neutro	S	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-217	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-218	Raiz	Poconé/MT	Básico	S	Creme	Circular	I	O	1
UFMT-219	Raiz	Poconé/MT	Neutro	S	Creme	Circular	I	O	1
UFMT-220	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-222	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-223	Raiz	Poconé/MT	Neutro	E	Amarela	Circular	I	O	1
UFMT-224	Raiz	Poconé/MT	Neutro	S	Amarela	Circular	I	O	1
UFMT-225	Raiz	Poconé/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-226	Raiz	Poconé/MT	Neutro	A	Branca	Circular	R	O	1
UFMT-227	Raiz	Poconé/MT	Neutro	E	Branca	Circular	I	O	1
UFMT-228	Raiz	Poconé/MT	Neutro	S	Creme	Circular	I	O	1
UFMT-229	Raiz	Poconé/MT	Neutro	S	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-230	Raiz	Poconé/MT	Neutro	E	Creme	Circular	R	O	1
UFMT-231	Raiz	Poconé/MT	Ácido	E	Creme	Circular	R	O	1
UFMT-232	Raiz	Poconé/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-233	Raiz	Poconé/MT	Neutro	E	Creme	Circular	R	O	1

Isolados	Nódulo	Local Coleta	Reação pH	Muco*	Cor	Forma	Borda**	DO** *	Dias
UFMT-234	Caule	Poconé/MT	Ácido	M	Creme	Circular	R	O	1
UFMT-235	Raiz	Poconé/MT	Neutro	E	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-236	Raiz	Poconé/MT	Básico	M	Creme	Circular	R	O	1
UFMT-237	Raiz	Poconé/MT	Ácido	M	Creme	Circular	R	O	1
UFMT-238	Raiz	Poconé/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-239	Raiz	Poconé/MT	Neutro	M	Creme	Circular	R	O	1
UFMT-240	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-241	Raiz	Poconé/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-242	Raiz	Poconé/MT	Neutro	E	Branca	Circular	I	O	1
UFMT-243	Raiz	Poconé/MT	Neutro	A	Creme	Circular	R	O	1
UFMT-245	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-246	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-247	Raiz	Poconé/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-248	Raiz	Poconé/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-249	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-319	Caule	Poconé/MT	Neutro	A	Amarela	Circular	R	TR	1
UFMT-320	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela c/ Borda Clara	Circular	R	O	1
UFMT-323	Caule	Poconé/MT	Neutro	A	Branca	Circular	R	O	1
UFMT-325	Caule	Poconé/MT	Básico	S	Amarela	Circular	R	TR	1
UFMT-328	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-329	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-330	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-331	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Branca Amarelada	Circular	R	O	1
UFMT-332	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Branca Amarelada	Circular	R	O	1
UFMT-333	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-334	Caule	Poconé/MT	Ácido	S	Amarela c/ Borda Clara	Circular	R	O	1
UFMT-335	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	TR	1
UFMT-336	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-337	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-338	Caule	Poconé/MT	Neutro	S	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-341	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-343	Caule	Poconé/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-344	Caule	Poconé/MT	Neutro	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-345	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-346	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-347	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Branca Amarelada	Circular	R	O	1
UFMT-348	Caule	Poconé/MT	Neutro	S	Branca	Circular	I	O	1
UFMT-349	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Branca Amarelada	Circular	R	O	1
UFMT-350	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-351	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	TR	1

Isolados	Nódulo	Local Coleta	Reação pH	Muco*	Cor	Forma	Borda**	DO** *	Dias
UFMT-352	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-353	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-354	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-355	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-357	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Branca	Circular	R	O	1
UFMT-358	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela c/ Borda Clara	Circular	R	O	1
UFMT-359	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-360	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Branca	Circular	R	TR	1
UFMT-361	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-362	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela c/ Borda Clara	Circular	R	O	1
UFMT-363	Caule	Poconé/MT	Neutro	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-364	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-365	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela c/ Borda Clara	Circular	R	O	1
UFMT-366	Caule	Poconé/MT	Ácido	S	Branca	Circular	R	O	1
UFMT-367	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Branca	Circular	R	O	1
UFMT-368	Raiz	Poconé/MT	Neutro	A	Branca	Circular	R	O	1
UFMT-369	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-370	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela c/ Borda Clara	Circular	R	O	1
UFMT-371	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-372	Raiz	Poconé/MT	Neutro	A	Branca	Circular	R	O	1
UFMT-373	Raiz	Poconé/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-374	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Branca Amarelada Amarela c/	Circular	R	O	1
UFMT-375	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Borda Clara	Circular	R	O	1
UFMT-376	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Branca Amarela c/	Circular	R	O	1
UFMT-377	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Borda Clara	Circular	R	O	1
UFMT-378	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-379	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-380	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-381	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela c/ Borda Clara	Circular	R	O	1
UFMT-382	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-383	Raiz	Poconé/MT	Básico	A	Branca Amarela c/	Circular	R	O	1
UFMT-384	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Borda Clara	Circular	R	O	1
UFMT-385	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1

Isolados	Nódulo	Local Coleta	Reação pH	Muco*	Cor	Forma	Borda**	DO** *	Dias
UFMT-386	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-392	Raiz	Poconé/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-393	Raiz	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-401	Raiz	Poconé/MT	Neutro	A	Amarela	Circular	I	O	1
UFMT-637	caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-638	caule	Poconé/MT	Ácido	M	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-639	caule	Poconé/MT	Neutro	E	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-640	caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-641	caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-642	caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-643	caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-644	caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-645	caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-646	caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-647	caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-648	caule	Poconé/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-649	caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-650	caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
SEMIA-587	Raiz		Básico	M	Branca	Circular	R	TL	6
SEMIA-5019	Raiz		Básico	M	Branca	Circular	R	TL	6
SEMIA-5079	Raiz		Básico	A	Branca	Circular	R	O	6
SEMIA-5080	Raiz		Básico	A	Branca	Circular	R	O	6
<i>A. caulinodans</i>	Caule		Básico	S	Creme	Circular	R	O	1
<i>R. leguminosarum</i>	Raiz		Ácido	A	Branca	Circular	R	O	1

*A-muco abundante; M- muco médio; E-muco escasso; S-sem produção de muco. **R-regular; I- irregular. ***DO- detalhe óptico; TL- translúcido; TR- transparente; O- opaco.

Apêndice 4 - Identificação e caracterização de isolados de *Aeschynomene* sp.

Isolados	Nódulo	Local Coleta	Reação pH	Muco*	Cor	Forma	Borda**	DO ***	Dias
UFMT-109	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-131	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela c/ Borda Clara	Circular	R	O	1
UFMT-193	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-221	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-244	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Branca	Circular	R	TR	1
UFMT-250	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-251	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-252	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-253	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	TR	1
UFMT-254	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela c/ Borda Clara	Circular	R	O	1
UFMT-255	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela c/ Borda Clara	Circular	R	O	1
UFMT-256	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela c/ Borda Clara	Circular	R	O	1

Clara									
Isolados	Nódulo	Local Coleta	Reação pH	Muco*	Cor	Forma	Borda**	DO ***	Dias
UFMT-257	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-258	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela c/ Borda Clara	Circular	R	O	1
UFMT-259	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-260	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-261	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-262	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-263	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-264	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-265	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela c/ Borda Clara	Circular	R	O	1
UFMT-266	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela c/ Borda Clara	Circular	R	O	1
UFMT-267	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-268	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-269	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-270	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-271	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Branca Amarelada	Circular	R	O	1
UFMT-272	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-273	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-274	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-275	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-276	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela c/ Borda Clara	Circular	R	O	1
UFMT-277	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-278	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-279	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela c/ Borda Clara	Circular	R	O	1
UFMT-280	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Branca	Circular	R	O	1
UFMT-281	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-282	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-283	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-284	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Branca Amarelada	Circular	R	O	1
UFMT-285	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Branca Amarelada	Circular	R	O	1
UFMT-286	Caule	Poconé/MT	Básico	S	Branca	Circular	R	O	1
UFMT-287	Caule	Poconé/MT	Básico	S	Branca	Circular	R	TR	1
UFMT-288	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-289	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-290	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-291	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-292	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-293	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-294	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	I	O	1
UFMT-295	Caule	Poconé/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-296	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-297	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1

UFMT-298	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
Isolados	Nódulo	Local Coleta	Reação pH	Muco*	Cor	Forma	Borda**	DO***	Dias
UFMT-299	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-300	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-301	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-302	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-303	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-304	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela c/ Borda Clara	Circular	R	O	1
UFMT-305	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-306	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela c/ Borda Clara	Circular	R	O	1
UFMT-307	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-308	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-309	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-310	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	I	O	1
UFMT-311	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-312	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-313	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-314	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-315	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-316	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-317	Caule	Poconé/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-318	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-321	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-322	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela c/ Borda Clara	Circular	R	O	1
UFMT-324	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-326	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela c/ Borda Clara	Circular	R	O	1
UFMT-327	Caule	Poconé/MT	Básico	S	Branca	Circular	I	O	1
UFMT-339	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela c/ Borda Clara	Circular	R	O	1
UFMT-340	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-342	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
UFMT-356	Caule	Poconé/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	1
A. <i>caulinodans</i>	Caule		Básico	S	Creme	Circular	R	O	1

*A-muco abundante; M- muco médio; E-muco escasso; S-sem produção de muco. **R-regular; I- irregular. ***DO- detalhe óptico; TL- translúcido; TR- transparente; O- opaco.

Apêndice 5 - Identificação e caracterização de isolados de Soja (*Glycine max*).

Isolados	Nódulo	Local Coleta	Reação pH	Muco*	Cor	Forma	Borda**	DO** *	Plantio	Dias
<i>R. leguminosarum</i>	Raiz		Ácido	A	Branca	Circular	R	O		1
SEMIA-5019	Raiz		Básico	M	Branca	Circular	R	TL		6
SEMIA-5079	Raiz		Básico	A	Branca	Circular	R	O		6

Isolados	Nódulo	Local Coleta	Reação pH	Muco* co*	Cor	Forma	Borda**	DO** *	Plantio	Dias
SEMIA-5080	Raiz		Básico	A	Branca	Circular	R	O		6
SEMIA-587	Raiz		Básico	M	Branca	Circular	R	TL		6
UFMT-121	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-143	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	A	Creme	Circular	R	O	PC	1
UFMT-146	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	A	Creme	Circular	R	O	PC	1
UFMT-156	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	M	Amarela	Circular	I	O	PC	1
UFMT-162	Raiz	Campos Júlio/MT	Básico	S	Amarela	Circular	R	O	PC	4
UFMT-175	Raiz	Campos Júlio/MT	Neutro	A	Creme	Circular	R	O	PC	1
UFMT-176	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-180	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	A	Creme	Circular	R	O	PC	1
UFMT-184	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	A	Creme	Circular	R	O	PC	1
UFMT-387	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-388	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-389	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-390	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-391	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-394	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-395	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-396	Raiz	Campos Júlio/MT	Neutro	S	Branca	Circular	R	O	PC	1
UFMT-397	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	I	O	PC	1
UFMT-398	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-399	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-400	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-402	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-403	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-404	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-405	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-406	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-407	Raiz	Campos	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1

Júlio/MT										
Isolados	Nódulo	Local Coleta	Reação pH	Muco* co*	Cor	Forma	Borda**	DO** *	Plantio	Dias
UFMT-408	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-409	Raiz	Campos Júlio/MT	Neutro	A	Creme	Circular	R	O	PC	1
UFMT-410	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-411	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-412	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-413	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-414	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	TL	PC	1
UFMT-415	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-416	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	I	O	PC	1
UFMT-417	Raiz	Campos Júlio/MT	Neutro	S	Branca	Circular	R	O	PC	1
UFMT-418	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-419	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	I	O	PD	4
UFMT-420	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	4
UFMT-421	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-422	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	I	O	PD	1
UFMT-423	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-424	Raiz	Campos Júlio/MT	Neutro	A	Amarela	Circular	R	O	PD	4
UFMT-425	Raiz	Campos Júlio/MT	Neutro	A	Branca	Circular	R	O	PD	4
UFMT-426	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-427	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-428	Raiz	Campos Júlio/MT	Neutro	A	Branca	Circular	R	O	PD	4
UFMT-429	Raiz	Campos Júlio/MT	Neutro	A	Branca	Circular	R	O	PD	4
UFMT-430	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-431	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-432	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-433	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-434	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1

Isolados	Nódulo	Local Coleta	Reação pH	Muco* co*	Cor	Forma	Borda**	DO** *	Plantio	Dias
UFMT-435	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	TL	PD	4
UFMT-436	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-437	Raiz	Campos Júlio/MT	Neutro	A	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-438	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-439	Raiz	Campos Júlio/MT	Neutro	S	Branca Amarela da	Circular	R	O	PC	1
UFMT-440	Raiz	Campos Júlio/MT	Básico	S	Amarela	Circular	R	O	PC	4
UFMT-441	Raiz	Campos Júlio/MT	Neutro	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-442	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-443	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-444	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	A	Branca	Circular	R	O	PC	1
UFMT-445	Raiz	Campos Júlio/MT	Neutro	A	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-446	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	A	Creme	Circular	R	O	PD	1
UFMT-447	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-448	Raiz	Campos Júlio/MT	Neutro	A	Branca	Circular	R	O	PD	4
UFMT-449	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-450	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-451	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-452	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-453	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-454	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-455	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-456	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-457	Raiz	Campos Júlio/MT	Neutro	A	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-458	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	A	Amarela c/ Borda Clara	Circular	I	O	PC	1
UFMT-459	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-460	Raiz	Campos Júlio/MT	Neutro	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-461	Raiz	Campos Júlio/MT	Neutro	A	Branca	Circular	R	O	PC	1

Isolados	Nódulo	Local Coleta	Reação pH	Muco* co*	Cor	Forma	Borda**	DO** *	Plantio	Dias
UFMT-462	Raiz	Campos Júlio/MT	Neutro	A	Branca	Circular	R	O	PC	1
UFMT-463	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-464	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	4
UFMT-465	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	4
UFMT-466	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	4
UFMT-467	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	4
UFMT-468	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	4
UFMT-469	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	4
UFMT-470	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	4
UFMT-471	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	4
UFMT-472	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Branca	Circular	I	O	PD	1
UFMT-473	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-474	Raiz	Campos Júlio/MT	Neutro	A	Branca	Circular	R	O	PD	4
UFMT-475	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-476	Raiz	Campos Júlio/MT	Neutro	A	Branca	Circular	R	O	PD	4
UFMT-477	Raiz	Campos Júlio/MT	Neutro	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-478	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-479	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	PD	4
UFMT-480	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-481	Raiz	Rondonópolis/MT	Ácido	M	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-482	Raiz	Rondonópolis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-483	Raiz	Rondonópolis/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	I	O	PC	1
UFMT-484	Raiz	Rondonópolis/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-485	Raiz	Rondonópolis/MT	Ácido	A	Amarela c/ Borda Clara	Circular	R	O	PC	1
UFMT-486	Raiz	Rondonópolis/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-487	Raiz	Rondonópolis/MT	Ácido	M	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-488	Raiz	Rondonópolis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	I	O	PC	1
UFMT-489	Raiz	Rondonópolis	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1

polis/MT										
Isolados	Nódulo	Local Coleta	Reação pH	Muco*	Cor	Forma	Borda**	DO** *	Plantio	Dias
UFMT-490	Raiz	Rondonópolis/MT	Ácido	M	Marrom	Circular	R	O	PC	4
UFMT-491	Raiz	Rondonópolis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	I	O	PC	1
UFMT-492	Raiz	Rondonópolis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-493	Raiz	Rondonópolis/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-494	Raiz	Rondonópolis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-495	Raiz	Rondonópolis/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-496	Raiz	Rondonópolis/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-497	Raiz	Rondonópolis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-498	Raiz	Rondonópolis/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-499	Raiz	Rondonópolis/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-500	Raiz	Rondonópolis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-501	Raiz	Rondonópolis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-502	Raiz	Rondonópolis/MT	Ácido	E	Creme	Circular	R	O	PC	1
UFMT-503	Raiz	Rondonópolis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-504	Raiz	Rondonópolis/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-505	Raiz	Rondonópolis/MT	Ácido	M	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-506	Raiz	Rondonópolis/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-507	Raiz	Rondonópolis/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-508	Raiz	Rondonópolis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-509	Raiz	Rondonópolis/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-510	Raiz	Rondonópolis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-511	Raiz	Rondonópolis/MT	Ácido	M	Amarela	Circular	R	TR	PC	1
UFMT-512	Raiz	Rondonópolis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-513	Raiz	Rondonópolis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-514	Raiz	Rondonópolis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-515	Raiz	Rondonópolis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-516	Raiz	Rondonópolis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1

Isolados	Nódulo	Local Coleta	Reação pH	Muco* co*	Cor	Forma	Borda**	DO** *	Plantio	Dias
UFMT-517	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	I	O	PD	1
UFMT-518	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-519	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-520	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-521	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-522	Raiz	Rondonó polis/MT	Neutro	E	Amarela	Circular	R	TR	PD	1
UFMT-523	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-524	Raiz	Rondonó polis/MT	Neutro	E	Branca	Circular	R	O	PD	1
UFMT-525	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-526	Raiz	Pedra Preta/MT	Ácido	M	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-527	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-528	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-529	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-530	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-531	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-532	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-533	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-534	Raiz	Campos Júlio/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-535	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-536	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-537	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-538	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-539	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-540	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-541	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-542	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	M	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-543	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-544	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	I	O	PC	1

Isolados	Nódulo	Local Coleta	Reação pH	Muco* co*	Cor	Forma	Borda**	DO** *	Plantio	Dias
UFMT-545	Raiz	Rondonó polis/MT	Neutro	E	Branca	Circular	I	O	PC	1
UFMT-546	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-547	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-548	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-549	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	M	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-550	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-551	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-552	Raiz	Rondonó polis/MT	Básico	E	Amarela	Circular	R	O	PD	4
UFMT-553	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-554	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-555	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-556	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	M	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-557	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-558	Raiz	Rondonó polis/MT	Básico	E	Amarela	Circular	R	O	PD	4
UFMT-559	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	M	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-560	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-561	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	I	O	PD	1
UFMT-562	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	I	O	PD	1
UFMT-563	Raiz	Rondonó polis/MT	Neutro	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-564	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-565	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-566	Raiz	Rondonó polis/MT	Neutro	E	Creme	Circular	R	O	PD	1
UFMT-567	Raiz	Rondonó polis/MT	Neutro	M	Creme	Circular	I	O	PD	1
UFMT-568	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	E	Creme	Circular	R	O	PD	1
UFMT-569	Raiz	Pedra Preta/MT	Neutro	E	Amarela c/ Borda Clara	Circular	R	O	PC	1
UFMT-570	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-571	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-572	Raiz	Rondonó	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1

polis/MT										
Isolados	Nódulo	Local Coleta	Reação pH	Muco*	Cor	Forma	Borda**	DO** *	Plantio	Dias
UFMT-573	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-574	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	I	O	PD	1
UFMT-575	Raiz	Rondonó polis/MT	Básico	S	Rosa	Circular	R	O	PD	4
UFMT-576	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-577	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-578	Raiz	Rondonó polis/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-579	Raiz	Pedra Preta/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-580	Raiz	Pedra Preta/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-581	Raiz	Pedra Preta/MT	Básico	S	Branca	Circular	R	O	PD	4
UFMT-582	Raiz	Pedra Preta/MT	Neutro	E	Branca	Circular	R	O	PD	1
UFMT-583	Raiz	Pedra Preta/MT	Neutro	A	Branca	Circular	I	O	PD	1
UFMT-584	Raiz	Pedra Preta/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-585	Raiz	Pedra Preta/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	I	O	PD	1
UFMT-586	Raiz	Pedra Preta/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	I	O	PD	1
UFMT-587	Raiz	Pedra Preta/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-588	Raiz	Pedra Preta/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	R	O	PD	1
UFMT-589	Raiz	Pedra Preta/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	I	O	PD	1
UFMT-590	Raiz	Pedra Preta/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	I	O	PC	1
UFMT-591	Raiz	Pedra Preta/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-592	Raiz	Pedra Preta/MT	Básico	E	Branca	Circular	R	O	PC	4
UFMT-593	Raiz	Pedra Preta/MT	Ácido	M	Amarela c/ Borda Clara	Circular	I	O	PC	1
UFMT-594	Raiz	Pedra Preta/MT	Ácido	E	Creme	Circular	I	O	PC	1
UFMT-595	Raiz	Pedra Preta/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-596	Raiz	Pedra Preta/MT	Básico	E	Branca	Circular	R	O	PC	4
UFMT-597	Raiz	Pedra Preta/MT	Básico	E	Branca	Circular	R	O	PC	4
UFMT-598	Raiz	Pedra Preta/MT	Básico	S	Branca	Circular	R	TR	PC	4
UFMT-599	Raiz	Pedra Preta/MT	Básico	S	Branca	Circular	I	O	PC	4

Isolados	Nódulo	Local Coleta	Reação pH	Muco*	Cor	Forma	Borda**	DO** *	Plantio	Dias
UFMT-600	Raiz	Pedra Preta/MT	Básico	E	Branca	Circular	R	O	PC	4
UFMT-601	Raiz	Pedra Preta/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-602	Raiz	Pedra Preta/MT	Ácido	A	Amarela c/ Borda Clara	Circular	R	O	PC	1
UFMT-603	Raiz	Pedra Preta/MT	Neutro	S	Branca	Circular	R	O	PC	1
UFMT-604	Raiz	Pedra Preta/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	I	O	PC	1
UFMT-605	Raiz	Pedra Preta/MT	Básico	S	Branca	Circular	R	O	PC	4
UFMT-606	Raiz	Pedra Preta/MT	Básico	M	Branca	Circular	I	O	PC	4
UFMT-607	Raiz	Pedra Preta/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-608	Raiz	Pedra Preta/MT	Neutro	S	Branca	Circular	R	O	PC	1
UFMT-609	Raiz	Pedra Preta/MT	Básico	S	Amarela	Circular	R	O	PC	4
UFMT-610	Raiz	Pedra Preta/MT	Ácido	S	Branca	Circular	I	O	PC	1
UFMT-611	Raiz	Pedra Preta/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-612	Raiz	Pedra Preta/MT	Básico	M	Branca	Circular	R	O	PC	4
UFMT-613	Raiz	Pedra Preta/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	I	O	PC	1
UFMT-614	Raiz	Pedra Preta/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-615	Raiz	Pedra Preta/MT	Básico	M	Branca	Circular	R	O	PC	4
UFMT-616	Raiz	Pedra Preta/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-617	Raiz	Pedra Preta/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-618	Raiz	Pedra Preta/MT	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-619	Raiz	Pedra Preta/MT	Básico	E	Branca	Circular	R	O	PC	4
UFMT-620	Raiz	Pedra Preta/MT	Neutro	E	Branca	Circular	R	O	PC	1
UFMT-621	Raiz	Pedra Preta/MT	Neutro	S	Amarela	Circular	I	O	PC	1
UFMT-622	Raiz	Pedra Preta/MT	Básico	E	Branca	Circular	R	O	PC	4
UFMT-623	Raiz	Pedra Preta/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-624	Raiz	Pedra Preta/MT	Básico	M	Branca	Circular	R	O	PC	4
UFMT-625	Raiz	Pedra Preta/MT	Neutro	E	Branca	Circular	I	O	PC	1
UFMT-626	Raiz	Pedra Preta/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	I	O	PC	1
UFMT-627	Raiz	Pedra	Ácido	A	Amarela	Circular	R	O	PC	1

Preta/MT										
Isolados	Nódulo	Local Coleta	Reação pH	Muco*	Cor	Forma	Borda**	DO** *	Plantio	Dias
UFMT-628	Raiz	Pedra Preta/MT	Neutro	S	Rosa	Circular	R	O	PC	1
UFMT-629	Raiz	Pedra Preta/MT	Neutro	S	Branca	Circular	I	O	PC	1
UFMT-630	Raiz	Pedra Preta/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-631	Raiz	Pedra Preta/MT	Básico	S	Branca	Circular	R	O	PC	4
UFMT-632	Raiz	Pedra Preta/MT	Ácido	M	Amarela	Circular	I	O	PC	1
UFMT-633	Raiz	Pedra Preta/MT	Ácido	S	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-634	Raiz	Pedra Preta/MT	Básico	E	Branca	Circular	R	O	PC	4
UFMT-635	Raiz	Pedra Preta/MT	Ácido	E	Amarela	Circular	R	O	PC	1
UFMT-636	Raiz	Pedra Preta/MT	Neutro	S	Branca	Circular	I	O	PC	1
UFMT-651	Raiz	Pedra Preta/MT	Básico	E	Branca	Circular	R	O	PC	4
UFMT-652	Raiz	Pedra Preta/MT	Básico	S	Branca	Circular	R	O	PC	4

*A-muco abundante; M- muco médio; E-muco escasso; S-sem produção de muco. **R-regular; I- irregular. ***DO- detalhe óptico; TL- translúcido; TR- transparente; O- opaco

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)