

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CÂMPUS DE JABOTICABAL  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**CARACTERIZAÇÃO, DIVERSIDADE GENÉTICA E  
NODULAÇÃO EM FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris*) DE  
ISOLADOS DE RIZÓBIOS DO BRASIL E DA VENEZUELA**

**Tehuni Orlando González**

Engenheiro Agrônomo

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2008

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CÂMPUS DE JABOTICABAL  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**CARACTERIZAÇÃO, DIVERSIDADE GENÉTICA E  
NODULAÇÃO EM FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris*) DE  
ISOLADOS DE RIZÓBIOS DO BRASIL E DA VENEZUELA**

**Tehuni Orlando González**

**Orientadora: Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Campus de Jaboticabal -UNESP, para a obtenção do título de Doutor em Agronomia área de concentração em Produção Vegetal

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2008

G635c González, Tehuni Orlando  
Caracterização, diversidade genética e nodulação em feijoeiro  
(*Phaseolus vulgaris*) de isolados de rizóbios do Brasil e da Venezuela  
/ Tehuni Orlando González. -- Jaboticabal, 2008  
xi, 72 f. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008

Orientador: Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Banca examinadora: Maria José Valarini, Miguel Luis Menezes  
Freitas, João Martins Pizauro Junior, Leandro Borges Lemos

Bibliografia

1. Seqüenciamento. 2. Filogenia. 3. *Rhizobium*. I. Título. II.  
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.461.5:635.652

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** CARACTERIZAÇÃO, DIVERSIDADE GENÉTICA E NODULAÇÃO EM FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris*) DE ISOLADOS DE RIZÓBIOS DO BRASIL E DA VENEZUELA

**AUTOR:** TEHUNI ORLANDO GONZÁLEZ

**ORIENTADORA:** Dra. ELIANA GERTRUDES MACEDO LEMOS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em AGRONOMIA (PRODUÇÃO VEGETAL) pela Comissão Examinadora:

Dra. ELIANA GERTRUDES MACEDO LEMOS

Dra. MARIA JOSÉ VALARINI

Dr. MIGUEL LUIZ MENEZES FREITAS

Dr. JOÃO MARTINS PIZAURO JUNIOR

Dr. LEANDRO BORGES LEMOS

Data da realização: 02 de julho de 2008.

Presidente da Comissão Examinadora

Dra. ELIANA GERTRUDES MACEDO LEMOS

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**TEHUNI ORLANDO GONZÁLEZ** - nascido em 22 de abril de 1962, em Caracas, Venezuela, é Engenheiro Agrônomo formado pela “Universidad Central de Venezuela” em julho de 1988, na qual obteve o título de Mestre em Agronomia, em maio de 1999. Realizou treinamentos em Melhoramento genético e Produção de Sementes no Brasil, e em Fertilidade de solos, na Universidade da Florida, EUA. Trabalhou nas áreas de Pesquisa e desenvolvimento de novos produtos na Venezuela, em Diproagro C.A., Del Monte Foods, e Syngenta Agroquímicos. Actualmente é professor “Agregado” nas disciplinas de culturas têxteis, oleaginosas, e técnica experimental de campo, da Faculdade de Agronomia da “Universidad Central de Venezuela”. Em agosto de 2004, iniciou o curso de doutorado em Agronomia (Produção Vegetal) na UNESP – FCAV, em Jaboticabal - SP, onde defendeu sua tese de Doutorado em julho de 2008. Durante os estudos de pós-graduação foi bolsista do “Consejo de Desarrollo Científico de La Universidad Central de Venezuela”.

**A Jesus Cristo, o caminho, a verdade e a vida,**

**Aos meus pais de coração, Carlos Emiro e Irama Quintana,**

**Aos meus irmãos de coração, Juan Carlos, Gretty e Daniel,**

**À Khyrsi e Patrícia,**

**À minha família,**

**À memória dos meus seres queridos, Yolanda, María e Teresa,**

**Ao Dr. Franklin Chacín Lugo,**

**Aos tantos amigos do Brasil e da Venezuela,**

**Pela força, amor e compreensão.**

**DEDICO.**

## AGRADECIMENTOS

Ao “Consejo de Desarrollo Científico e Humanístico de “La Universidad Central de Venezuela”, pela concessão da bolsa de doutorado.

À Profa. Dra. Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, pela oportunidade de fazer parte de sua equipe e em especial pela confiança e atenção dispensadas.

Ao Dr. Franklin Chacín Lugo, “Decano de La Facultad de Agronomía de La Universidad Central de Venezuela”, por todo o apoio para a materialização da bolsa de doutorado e pela amizade.

Ao Carlos Emiro Quintana, meu pai de coração, pelo apoio econômico, financeiro, amor e compreensão ao longo da minha vida.

Aos professores Dr. Pedro Luís da Costa Aguiar Alves, Dra. Leila Trevisan Braz, Arthur Bernardes Cecílio Filho e a Dra. Lúcia Maria Carareto Alves, pelas sugestões no Exame de Qualificação, as quais contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Quero expressar os meus sinceros agradecimento às pessoas que, de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste estudo, e especialmente:

Ao Dr. João Carlos Campanharo, pelo aprendizado na área laboratorial microbiológica e pela amizade.

À Profa. Dra. Lúcia Maria Carareto Alves, pelas sugestões ao longo do doutorado e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Orlando Di Mauro, pela concessão de acesso à casa de vegetação.

Ao Técnico Lázaro José Ribeiro da Silva, “Gabi”, pela amizade e apoio logístico para a realização dos experimentos em casa de vegetação, sem a ajuda do qual teria sido inviável a realização dos mesmos.

Ao Prof. Dr. Leandro Borges Lemos, pelas sugestões na condução dos ensaios em casa de vegetação e pela correção da tese.

Ao Técnico Geraldo Mangela de Assis e ao Ms. Marcelo Costa, pela ajuda na casa de vegetação.



A Ms. Eliamar Nascibhen Pedrinho, pela ajuda no seqüenciamento e amizade.

Aos Drs. Rodrigo Matheus Pereira e Maisa Boff Ciampi, pelas correções da tese e pela amizade.

À UNESP-FCAV, pela excelência do ensino e oportunidade de cursar o doutorado em Agronomia/Produção Vegetal.

Aos meus amigos do Laboratório de Bioquímica e Microrganismo e Plantas, pelo auxílio, convívio, carinho e amizade.

Aos meus amigos da pós-graduação, pelos momentos de convivência acadêmica, científica e de descontração.

Aos meus amigos da “Facultad de Agronomia de La Universidad Central de Venezuela”, Carmen Basso, Edgardo Monteverde-Penso, Francisco Zapata, Gustavo Rodríguez, Humberto Moratinos, José Mosquera, Manuel Morillo, Petra Madriz e Rómulo Salas, por todo apoio e amizade.

Ao Eng. MSc. Manuel Gamboa, pelas amostras de solo da Venezuela e amizade.

Ao Sr. Francisco Fernandez, pela oportunidade de ter-me enviado pela primeira vez para essa “terra dourada”, o Brasil, pela amizade e receptividade mostradas toda vez que tenho precisado dele.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	ix
<b>RESUMO</b> .....	x
<b>SUMMARY</b> .....	xi
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	4
2.1. Fixação biológica de nitrogênio pela simbiose rizóbio – leguminosa.....	4
2.2. Fixação de nitrogênio de estirpes de rizóbios no feijoeiro.....	6
2.3. Fatores que afetam a nodulação.....	8
2.4. Estrutura e caracterização molecular de estirpes de rizóbios.....	10
2.5. Classificação de bactérias diazotróficas simbióticas.....	14
2.6. Taxonomia e características das bactérias do gênero <i>Rhizobium</i> .....	15
2.7. Quantificação do nitrogênio fixado.....	16
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	18
3.1. Amostras de solo para obtenção de isolados bacterianos.....	18
3.2. Isolamento das bactérias dos nódulos provenientes do Brasil e da Venezuela.....	22
3.3. Preparo das células e extração do DNA genômico dos isolados.....	23
3.4. Quantificação do DNA.....	25
3.5. Amplificação do gene 16S rRNA.....	25
3.6. Purificação dos produtos da PCR e seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA.....	26

3.7. Análises das seqüências parciais do gene 16S rRNA.....	27
3.8. Avaliação agronômica dos isolados bacterianos da Venezuela.....	28
3.9. Avaliação agronômica dos isolados bacterianos do Brasil.....	29
3.10. Diversidade genética das estirpes selecionadas, através de ITS (16S-23S rRNA).....	30
3.11. Produtividade e nodulação no feijoeiro das quatro melhores estirpes.....	35
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
4.1. Diversidade fenotípica dos isolados do Brasil e da Venezuela.	38
4.2. Diversidade genética dos isolados do Brasil e da Venezuela...	38
4.3. Resultados da avaliação agronômica dos isolados da Venezuela e do Brasil.....	43
4.4. Diversidade genética das estirpes selecionadas, através de ITS (16S-23S rRNA).....	45
4.5. Produtividade e nodulação, no feijoeiro, das quatro melhores estirpes .....	48
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>53</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>54</b>
<b>7. APÊNDICE.....</b>	<b>65</b>

## ABREVIATURAS

BOD – Demanda biológica de oxigênio (Biologic Oxigen Demand)

DNA – Ácido desoxirribonucléico

RNA – Ácido ribonucleíco

dNTP – Trifosfato de deoxinucleotídeo (“2'-deoxynucleotides 5'triphosphates”)

EDTA – Ácido etileno diaminoacético (“Ethylenediaminetetracetic acid”)

Tris – “Hidroximetil aminometano (“Hydroxymethyl aminomethane”)

SDS – Duodecil sulfato de sódio (“Sodium duodecyl sulfate”)

RNAase – Ribonuclease A

$K_2HPO_4$  – fosfato de potássio dibásico

$KH_2PO_4$  – fosfato de potássio monobásico

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$  – sulfato de magnésio heptahidratado

NaCl – cloreto de sódio

REP – Seqüência Palindrômica Extragênica Repetitiva (“Repetitive Extragenic Palindromic”)

ERIC – Seqüência Consenso Intergênica Repetitiva Enterobacteriana (“Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus”)

NaOH – Hidróxido de Sódio

BOX – Elemento Box

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (“Polimerase Chain Reaction”)

REP-PCR – Referente à técnica de PCR utilizando os oligonucleotídeos correspondentes as seqüência repetitivas REP.

ITS – Espaço Intergênico Transcrito (“Intergenic Transcribed Spacer”)

UFC – Unidade Formadora de Colônia

## CARACTERIZAÇÃO, DIVERSIDADE GENÉTICA E NODULAÇÃO EM FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris*) DE ISOLADOS DE RIZÓBIOS DO BRASIL E DA VENEZUELA

**RESUMO** – A diversidade genética de quinze estirpes de rizóbios isoladas do feijoeiro, provenientes de várias localidades do Brasil e da Venezuela, foi determinada pelo seqüenciamento do gene 16S rRNA. Selecionaram-se as duas melhores estirpes de cada país, com base em nodulação, produção de massa seca e de nitrogênio total em plantas de feijão, e compararam-se as suas produtividades e nodulação no feijoeiro, com duas estirpes comerciais, CIAT-899 e PRF-81, em um solo Latossolo Vermelho-Escuro da região de Jaboticabal SP. Determinou-se ainda a diversidade genética das populações nativas do solo e das quatro estirpes, pelo seqüenciamento do espaço intergênico, entre os genes 16S e 23S rRNA. Experimentos foram conduzidos em blocos casualizados com três repetições, em casa de vegetação, na UNESP, em 2007. O primeiro foi realizado em tubetes com vermiculita e quinze tratamentos: sete diluições seriadas do solo de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ , as quatro estirpes, as comerciais e duas testemunhas com e sem nitrogênio. Das colônias isoladas extraiu-se o DNA genômico e realizou-se o seqüenciamento do espaço intergênico. O segundo experimento foi realizado em vasos contendo solo e treze tratamentos: as quatro estirpes isoladamente e misturadas com a estirpe PRF-81, as comerciais, a mistura delas, e duas testemunhas com e sem nitrogênio. Houve coincidência entre os marcadores moleculares do gene 16S rRNA e o espaço intergênico na identificação das espécies. Encontraram-se estirpes tão produtivas quanto as comerciais. A mistura com a estirpe PRF-81 não incrementou a produtividade e produziu um efeito antagônico com a estirpe LBMP-12BR. A população nativa do solo foi identificada como *Rhizobium* sp., sendo ineficiente na fixação de nitrogênio. Há estirpes promissoras que mostram uma resposta diferencial quando são misturadas nos inoculantes.

**Palavras-Chave:** seqüenciamento, espaço intergênico, filogenia, *Rhizobium*, fixação biológica de nitrogênio, *Phaseolus vulgaris*.

## CHARACTERIZATION, GENETIC DIVERSITY AND NODULATION ON COMMON BEAN (*Phaseolus vulgaris*) OF RHIZOBIA ISOLATES FROM BRASIL AND VENEZUELA

**SUMMARY** – The genetic diversity of 15 rhizobia strains isolated from common beans grown in Brazil and Venezuela was determined by sequencing the 16S rRNA gene. Two strains were selected from each country for further study based on nodulation, dry weight, and total nitrogen in the common bean plants, and productivity and nodulation on the common bean of these strains were evaluated in Latossolo Vermelho Escuro soil of Jaboticabal SP, in comparison to two commercial strains, CIAT-899 and PRF-81. The genetic diversity of the native soil population and the four strains was determined by sequencing of the intergenic space between the 16S and 23S rRNA genes. In 2007, experiments were carried out under glass house conditions at the UNESP. The first was conducted in tubs with vermiculite, and 15 treatments were examined: seven soil serial dilutions ( $10^{-1}$  to  $10^{-7}$ ), the four novel strains, two commercial strains, and two controls with and without nitrogen. From the pure isolated colonies, DNA was extracted, and the intergenic space was sequenced. The second experiment was conducted in pots filled with soil, and 13 treatments were examined: the four strains alone and in mixture with the PRF-81 strain, the two commercial strains alone and in mixture, and two controls with and without nitrogen. There was coincidence between the 16S rRNA gene and the intergenic space molecular markers for species identification. Strains that had productivity values equivalent to the commercial strains were identified. The mixture of PRF-81 strain to each one of the four strains did not increase productivity and produced an antagonistic effect on the LBMP-12BR strain. The native soil population was identified as *Rhizobium* sp. and was found to be inefficient in nitrogen fixation. This study identified promising new *Rhizobium* strains that exhibit differential responses in mixtures on inoculants.

**Keywords:** sequencing, intergenic space, phylogeny, *Rhizobium*, biological nitrogen fixation, *Phaseolus vulgaris*.

## 1. INTRODUÇÃO

Os grãos de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) representam uma importante fonte protéica na dieta de mais de 300 milhões de pessoas na América Latina e África (KASCHUK et al., 2006). O Brasil é o maior produtor e consumidor do feijão a nível mundial: 3.286.282 toneladas de grãos foram produzidas durante 2006/2007; com um rendimento médio de 859 kg ha<sup>-1</sup>, considerado baixo devido, entre outros fatores, ao baixo nível tecnológico empregado na cultura. Entretanto, a cultura se desenvolve durante três épocas de colheita, que varia segundo a região geográfica, e que em geral vão: a primeira colheita durante os meses de novembro, dezembro, janeiro, fevereiro e março; a segunda colheita durante abril, maio, junho e julho; e a terceira colheita durante agosto e setembro; sendo esta última a que mostra os maiores rendimentos médios 2184 kg ha<sup>-1</sup>, devido ao nível tecnológico e condições climáticas favoráveis durante a colheita dos grãos (IBGE, 2008).

Por outro lado na Venezuela, o feijoeiro constitui a leguminosa de maior importância destinada ao consumo humano, e sua produtividade também é considerada baixa, em torno de 900 kg ha<sup>-1</sup>, devido entre outros fatores a presença de doenças como *Alternaria solani* e *Fusarium* sp e de pragas como *Bemisia tabaci*, e *Trips palmi* ( (PLACENCIO & MORA-NUNEZ. 2002). A superfície do Feijão cultivada na Venezuela durante o ciclo 2006/2007 foi de 26.533 ha, a qual serviu para abastecer somente 8% do consumo local (FAO, 2008)

Dentre as alternativas tecnológicas disponíveis para incrementar a produtividade no feijoeiro, a associação simbiótica com estirpes de *Rhizobium* é considerada uma alternativa econômica atraente e ecologicamente sustentável de suprimento de nitrogênio na agricultura mundial. Pois reduz os custos econômicos da utilização de adubos nitrogenados e contribui para evitar a contaminação de

aqüíferos, lagos e rios causados pela lixiviação de adubos nitrogenados na agricultura (STRALIOTTO et al., 2002).

Para aproveitar as vantagens da biofertilização de nitrogênio no feijoeiro, várias pesquisas têm sido feitas à procura de estirpes eficientes e competitivas, para suprir os requerimentos de nitrogênio desta importante cultura. Contudo, a resposta à fixação biológica de nitrogênio no campo tem-se mostrado instável (MOSTASSO et al., 2002; HAFEEZ et al., 2005; SOARES et al., 2006).

Visando obter melhor resposta do processo de fixação biológica de nitrogênio, várias abordagens têm sido feitas, avaliando-as estirpes isoladamente (HUNGRIA et al., 2003; SOARES et al., 2006) ou em mistura de estirpes (HASSAN et al., 2004; HAFEEZ et al., 2005; RAPOSEIRAS et al., 2006).

Produtos das pesquisas realizadas no Brasil na área de biofertilizantes têm sido recomendadas desde junho de 1998, duas estirpes de *Rhizobium tropici*: a SEMIA 4077 (=CIAT 899) e a SEMIA 4080 (=PRF 81) para elaboração de inoculantes no feijoeiro (HUNGRIA et al., 2000). Porém, a procura por diversidade genética e eficiência de fixação de nitrogênio de novas estirpes continua sendo objeto de pesquisa. Nesse sentido, MOSTASSO et al. (2002) e HUNGRIA et al. (2003) avaliaram a estirpe H12 (=SEMIA 4088) e concluíram que ela era eficiente e competitiva, com elevado potencial de rendimento.

Vários autores têm realizado estudos de competição e/ou de eficiência agrônômica com novas estirpes de *Rhizobium* no feijoeiro, em diferentes localidades do Brasil, e encontraram somente estirpes com produtividade semelhante à CIAT-899 (RAPOSEIRAS et al., 2006; SOARES et al., 2006).

O processo de seleção de novas estirpes implica o conhecimento da estrutura e das relações genéticas das populações desses microrganismos. Neste contexto, a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem permitido grandes avanços na taxonomia e diversidade genética dos rizóbios, possibilitando a amplificação de fragmentos definidos da molécula do DNA, o que permite o seqüenciamento e a comparação das seqüências de nucleotídeos do DNA de regiões dos genes. Essas regiões exibem variabilidade suficiente para detectar, de



maneira precisa, diferenças entre gêneros e espécies como, por exemplo, a região dos genes ribossomais (16S e 23S rRNA) e do espaço intergênico (16S-23S rRNA) (LAGUERRE et al., 1996; CHUEIRE et al., 2003; GRANGE & HUNGRIA, 2004; YOUNG et al., 2004).

A região do espaço intergênico (ITS) entre os genes 16S-23S rRNA, por ser menos conservada do que a região dos genes 16S e 23S rRNA, vem sendo utilizada junto às regiões dos genes ribossomais em estudos de diversidade genética (SANTILLANA et al., 2008).

Os objetivos deste trabalho foram: (1) Avaliar a diversidade genética de quinze estirpes de rizóbios isoladas do feijoeiro, provenientes de várias localidades do Brasil e da Venezuela, pelo seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA. (2) Selecionar as duas melhores estirpes de cada um dos países quanto à nodulação, produção de matéria seca e nitrogênio total em plantas do feijoeiro, em condições axênicas em casa de vegetação. (3) Avaliar a produtividade e nodulação, no feijoeiro, dessas quatro melhores estirpes de rizóbios em comparação a duas estirpes recomendadas para produção de inoculantes a CIAT-899 e a PRF-81, em condições de um solo Latossolo Vermelho-Escuro em casa de vegetação. (4) Identificar a diversidade genética das populações de rizóbios nativas do solo Latossolo Vermelho-Escuro e das quatro melhores estirpes, pelo seqüenciamento do espaço intergênico 16S-23S rRNA.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Fixação biológica de nitrogênio pela simbiose rizóbio - leguminosa

Os organismos com habilidade para reduzir o nitrogênio atmosférico à amônia são considerados diazotróficos. As bactérias que formam associações simbióticas com hospedeiros específicos e fixam nitrogênio, formando estruturas especializadas nos hospedeiros, são chamadas diazotróficos simbióticos. Entretanto, as bactérias que podem fixar nitrogênio livre de associações simbióticas e utilizar esse nitrogênio fixado para o próprio crescimento, são chamadas diazotrofos de vida livre (SAWADA, et al., 2003).

A fixação biológica de nitrogênio no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L), assim como em outras leguminosas da família Fabaceae (=Leguminosae), é um processo diazotrófico simbiótico complexo, que envolve várias etapas, incluindo modificações fisiológicas e morfológicas, tanto na planta hospedeira como na bactéria. As bactérias diferenciam-se em bacteróides nos nódulos da planta hospedeira, fixando nitrogênio pela redução de enzimas do nitrogênio atmosférico à amônia. Em troca, a planta supre a bactéria com fontes de energia e carbono para sua manutenção (MERCANTE et al., 2002).

O processo de fixação biológica de nitrogênio é dividido em várias etapas: multiplicação do rizóbio no solo e na rizosfera da planta, emissão de sinais quimiotáticos entre o microssimbionte e o hospedeiro, reconhecimento do hospedeiro, formação do cordão de infecção, desenvolvimento do nódulo, fixação do nitrogênio e remoção da  $\text{NH}_3$  fixada (VARGAS & HUNGRIA, 1997; MATHESIUS, 2003).

A simbiose bactéria-planta começa pela produção de alguns compostos exsudados pela planta hospedeira, como aminoácidos, açúcares, ácidos

carboxílicos, polifenóis (flavonóides) e betaínas, cuja função é promover a quimiotaxia, atraindo o rizóbio e favorecendo a adesão da bactéria à superfície dos pêlos radiculares, desencadeando a expressão coordenada de uma série de genes da nodulação, *nod* /*nol*/ *noe*, referidos coletivamente como genes *nod*; que são essenciais para a infecção da raiz do hospedeiro e o estabelecimento do nódulo (TAÍZ & ZIEGER, 2004).

Com a ativação dos genes *nod* dos rizóbios, ocorre uma troca de sinais moleculares, onde as bactérias emitem sinais específicos para o hospedeiro, que induz algumas modificações radiculares, como a deformação e o aumento no número dos pêlos radiculares, levando à formação de nódulos. Após as modificações radiculares, ocorre a dissolução das paredes celulares, formando um cordão de infecção que propicia a entrada das bactérias nos nódulos, as quais se diferenciam, transformando-se em bacteróides. Atuam, então, as enzimas relacionadas com a quebra da tripla ligação do  $N_2$  e com a assimilação do nitrogênio fixado (CRAWFORD & GLASS, 1998).

Na fixação biológica, o  $N_2$  é reduzido à amônia ( $NH_3$ ) à custa de energia da planta. O complexo enzimático da nitrogenase é formado por duas unidades protéicas, a Ferro-proteína (Fe-proteína) e a Molibdênio-Ferro-proteína (MoFe-proteína) as quais são responsáveis pela fixação de nitrogênio no nódulo (BURRIS, 1999; TAÍZ & ZIEGER, 2004).

O primeiro produto estável contendo o  $N_2$  fixado é a amônia. Esta é imediatamente conduzida para fora do bacteróide e é incorporada ao ácido glutâmico, formando a glutamina mediada pela enzima glutamina sintetase, o ácido glutâmico é exportado para a parte aérea das plantas, em espécies como a soja e o feijoeiro, na forma de ureídeos (alantoína e ácido alantóico). Em outras leguminosas, como a alfafa e a ervilha, os produtos intermediários formados são as amidas (glutamina e asparagina); tanto os ureídeos quanto as amidas são transportados para as folhas das plantas pelo xilema e degradados nelas em amônia para formar aminoácidos e proteínas (CRAWFORD & GLASS, 1998).

## 2.2. Fixação de nitrogênio de estirpes de rizóbios no feijoeiro

O processo de fixação biológica de nitrogênio na cultura do feijoeiro tem mostrado um comportamento instável quanto à resposta na capacidade fixadora de nitrogênio em associação com bactérias do gênero *Rhizobium* (STRALIOTTO & RUMJANEK, 1999; HAFEEZ et al., 2005; LIRA et al. 2005; SOARES et al., 2006). Contudo, produto das pesquisas, no mercado brasileiro de inoculantes, desde junho de 1998, há duas estirpes de *Rhizobium tropici*, a SEMIA 4077 (=CIAT 899) e a SEMIA 4080 (=PRF 81), recomendadas do feijoeiro, as quais normalmente são formuladas misturadas (HUNGRIA et al., 2000).

Para aproveitar as vantagens da biofertilização de nitrogênio no feijoeiro, várias pesquisas têm sido feitas avaliando as novas estirpes isoladamente (HUNGRIA et al., 2003; SOARES et al., 2006) ou em mistura de estirpes (HASSAN et al., 2004; HAFEEZ et al., 2005; RAPOSEIRAS et al., 2006). No entanto, a procura por estirpes eficientes na fixação biológica de nitrogênio e mais competitivas que as estirpes nativas do solo, continuam sendo objeto de pesquisa.

Nesse sentido, MOSTASSO et al. (2002) realizaram uma seleção, no feijoeiro, de estirpes de rizóbios nas condições dos Cerrados, a quarta maior superfície de terras agrícolas do Brasil, submetendo as estirpes a condições de temperaturas ótimas (27/21 °C, dia/noite) e elevadas (37/21 °C, dia/noite), em casa de vegetação. Além disso, avaliaram a resposta das melhores estirpes quanto à capacidade de fixação de nitrogênio e competitividade no campo, em várias condições de manejo. Eles encontraram que as seqüências 16S rDNA das estirpes mais eficientes e competitivas foram geneticamente semelhantes a *Rhizobium tropici*, sugerindo que estudos com essa espécie deveriam ser apurados em condições de solos ácidos e nas temperaturas elevadas do Brasil e da África, destacando a estirpe H12 com potencialidades para ser incluída nos inoculantes. HUNGRIA et al. (2003) avaliaram a mesma espécie em oxissolos do Estado do Paraná, Brasil, e concluíram que ela era eficiente e competitiva, com elevado potencial de rendimento.

RAPOSEIRAS et al. (2006) e SOARES et al. (2006) realizaram estudos de competição e/ou de eficiência agrônômica com novas estirpes de rizóbios no feijoeiro, em diferentes localidades do Brasil e encontraram somente estirpes com produtividade semelhante à estirpe comercial CIAT-899.

PINTO et al. (2007) realizaram uma análise de genes simbióticos e não-simbióticos em 15 estirpes de *Rhizobium tropici*, isoladas de quatro distintas regiões geográficas do Brasil, destacando que, quando rizóbios efetivos foram isolados de plantas do feijoeiro crescendo em condições de campo, a maioria das estirpes foi de *R. tropici*. Essa espécie mostrou combinações de perfis únicos, os quais refletem uma estratégia evolucionária nesta espécie de maximização, na fixação de nitrogênio. Baseados em PCR-RFLP dos genes 16S e 23S rRNA, observaram dois grupos de *R. Tropici* denominados tipo A e tipo B, destacando que a diversidade nos genes ribossomais de ambos os tipos foi alta, sugerindo que o tipo A poderia representar uma nova espécie.

### **2.3. Fatores que afetam a nodulação**

As estirpes de rizóbios, para poder expressar sua capacidade de fixação de nitrogênio nas plantas, dependem tanto de fatores intrínsecos do processo de simbiose bactéria-leguminosa, quanto de fatores ambientais que afetam a sobrevivência da planta e da bactéria. Dentre os fatores mais relevantes, destacam-se a efetividade e a competitividade das estirpes presentes no inóculo ou no solo, a riqueza do inóculo em número de células, as técnicas de inoculação e os fatores ambientais (VARGAS & HUNGRIA, 1997; STRALIOTTO & RUMJANEK, 1999).

#### **2.3.1. Fatores intrínsecos que afetam a nodulação**

Na maioria das bactérias do gênero *Rhizobium*, um dos fatores intrínsecos que produzem irregularidades na resposta do feijoeiro à inoculação, é a

instabilidade genética do simbiote. Essa instabilidade genética é decorrente de freqüências elevadas de rearranjos genômicos e/ou deleções plasmidiais, devido aos genes que controlam a nodulação, a especificidade hospedeira e a fixação de nitrogênio, estar localizados num plasmídio grande, chamado plasmídio simbiótico-*pSym*' (BANFALVI et al., 1981; HOOYKAAS et al., 1981; RAPOSEIRAS et al., 2002). Em *Bradyrhizobium*, a informação genética para a simbiose encontra-se no cromossomo, o que torna as espécies desse gênero mais estáveis, podendo explicar, dentre outros fatores, o êxito da biofertilização em soja (NOTI et al., 1985; VAN DEN EEDE et al., 1987).

A promiscuidade do feijoeiro é apontada como outro fator intrínseco que afeta o processo de simbiose, já que uma variedade de espécies de rizóbios nodula essa leguminosa. No Brasil, têm sido reportadas simbioses com *Rhizobium tropici*, *R. etli*, *R. leguminosarum* e *R. giardinii*, e com outras bactérias dos gêneros *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium* (MOSTASSO et al., 2002; GRANGE & HUNGRIA, 2004).

### **2.3.2. Fatores ambientais que afetam a nodulação**

Dentre os principais fatores ambientais que interferem na fixação biológica de nitrogênio, citam-se: Condições extremas do pH: no caso de solos ácidos, essa condição, além de limitar o crescimento e a produtividade da cultura, origina interações negativas com nutrientes como cálcio, fósforo e molibdênio, que interferem no crescimento tanto da planta quanto dos rizóbios (STRALIOTTO & RUMJANEK, 1999). Por outro lado, em solos salinos com pH elevado, originam-se condições de estresse hídrico que afetam diretamente a taxa de fotossíntese da planta e o metabolismo do nódulo (BOTTOMLEY, 1991).

Na Venezuela, aproximadamente 70% das terras de uso agrícola possuem limitações por acidez e baixa fertilidade natural dos solos (LÓPEZ-HERNÁNDEZ et al., 1997). Nesse mesmo contexto, no Brasil, vários pesquisadores têm apontado a necessidade de se fazerem pesquisas à procura de estirpes de rizóbio

para o feijoeiro voltadas para solos ácidos e com temperaturas elevadas, onde normalmente se desenvolve a cultura (HUNGRIA et al., 2000; ANDRADE et al., 2002; CHUEIRE et al., 2003; RAPOSEIRAS et al., 2006; SOARES et al., 2006).

As temperaturas elevadas também são apontadas como um fator ambiental relevante da simbiose rizóbio - leguminosas, afetando a sobrevivência do rizóbio no solo, o processo de infecção, a formação dos nódulos e a atividade de fixação biológica de nitrogênio (ZAHARAN, 1999). RAPOSEIRAS et al. (2002) avaliaram o efeito da temperatura elevada sobre a capacidade fixadora de nitrogênio e a estrutura genética plasmidial de duas espécies de *Rhizobium*. Os resultados obtidos indicaram que a temperatura elevada acentuou a variabilidade no desempenho natural entre as colônias isoladas das estirpes testadas, especialmente da espécie *R. leguminosarum* bv. phaseoli. Os perfis plasmidiais das colônias derivadas das estirpes de *R. tropici* antes e após a exposição à temperatura elevada apresentaram-se idênticos entre si e em relação à estirpe original, indicando que as estirpes de *R. tropici* são mais estáveis e foram menos afetadas pela ação da temperatura que as estirpes de *R. leguminosarum*.

### **2.3.3. Interações entre estirpes que afetam a nodulação**

Além dos fatores ambientais, as interações entre as estirpes empregadas nos inoculantes, quando misturadas, e com os microrganismos do solo, incluindo os diazotróficos nativos, podem originar efeitos negativos, comprometendo a sobrevivência, o estabelecimento e as propriedades simbióticas dessas estirpes de rizóbios no campo (STRALIOTTO & RUMJANEK, 1999; MOSTASSO et al., 2002; HASSAN et al., 2004).

Na elaboração dos inoculantes para o feijoeiro, no Brasil, embora seja incluída a estirpe SEMIA 4080 (=PRF 81), isolada no Estado do Paraná, caracterizada por ter alta capacidade de competição contra estirpes nativas e alta eficiência de fixação simbiótica de nitrogênio (HUNGRIA et al., 2000), é provável que algum dos fatores apresentados anteriormente, ou a combinação deles, esteja

interferindo no desempenho dessa estirpe em condições de campo que torne o inoculante instável na sua resposta em campo.

#### **2.4. Estrutura e caracterização molecular de estirpes de rizóbios**

Em bactérias, o operon DNA ribossomal, é composto por três genes conservados funcional e evolutivamente: o gene da subunidade menor (*rrs*) 16S rRNA, seguido por um espaço; o gene da subunidade maior 23S rRNA, com um segundo espaço, e o gene 5S rRNA. Esses segmentos entre os genes são as regiões espaçadoras (Espaço Intergênico Transcrito - ITS), onde podem estar presentes também os genes tRNAs. Algumas regiões dentro desses espaços são mais variáveis do que os próprios genes 16S ou 23S rRNA, por estar, provavelmente, sob menor pressão de seleção do que os genes ribossomais (SCHMIDT, 1994).

A taxonomia e a diversidade genética dos rizóbios têm sido favorecidas pela análise da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a qual permite a amplificação de seqüências definidas da molécula do DNA, possibilitando o seqüenciamento e a comparação das seqüências de nucleotídeos do DNA de regiões dos genes. Essas regiões exibem variabilidade suficiente para detectar, de maneira precisa, as diferenças entre gêneros e espécies, como por exemplo, a região dos genes ribossomais (16S e 23S rRNA) e do espaço intergênico (16S-23S rRNA) (LAGUERRE et al., 1996; CHUEIRE et al., 2003; GRANGE & HUNGRIA, 2004; YOUNG et al., 2004).

##### **2.4.1. Filogenia de estirpes baseada no gene 16S rRNA**

A homologia entre as seqüências que codificam o gene 16S rRNA, têm sido o critério mais utilizado para estimar relações filogenéticas entre espécies de bactérias. Uma vantagem dessa abordagem é que seqüências do DNA e produtos



gênicos podem ser comparadas em um contexto evolucionário (sistemática molecular) (VAN BERKUN et al., 2000).

Na identificação taxonômica de estirpes de rizóbios, tem sido utilizada, mais freqüentemente a homologia entre seqüências de nucleotídeos do DNA que codifica o gene 16S rRNA ribossomal, para mostrar as relações filogenéticas entre as espécies, toda vez que as seqüências do DNA e os produtos gênicos podem ser comparados em um contexto evolucionário. Essa identificação tem sido favorecida pela disponibilidade das seqüências de nucleotídeos do gene 16S rRNA em bancos de dados on-line. Contudo, o número de espécies classificadas sistematicamente continua reduzido (AGUILAR et al., 1998; VAN BERKUN et al., 2000; CHUEIRE et al., 2003; MENNA et al., 2006).

Em sistemática molecular, acredita-se que a evolução de alguns genes de bactérias se processa numa taxa constante por mutação e seleção Darwiniana, e que a história evolutiva do gene de 16S rRNA se aproxima da história evolutiva do genoma total, tornando-se, dessa forma, aceitável reconstruir relações evolucionárias entre bactérias a partir da divergência das seqüências entre seus genes de 16S rRNA (WOESE, 2000; VAN BERKUN et al., 2000).

YOUNG et al. (2001) analisaram 20 seqüências de nucleotídeos do gene 16S rRNA de rizóbios e observaram que algumas seqüências podem esconder uma ou mais possíveis novas espécies. Em trabalho posterior, YOUNG (2004), através da análise comparativa do mesmo gene, demonstrou a necessidade de unir os gêneros *Rhizobium* e *Agrobacterium* em um só, já que as diferenças encontradas não deram suporte suficiente para a separação desses gêneros, motivando uma mudança na classificação taxonômica da espécie *Agrobacterium larrymoorei*, para *Rhizobium larrymoorei*.

Embora, em alguns casos, a classificação taxonômica baseada somente no gene 16S rRNA tenha sido apresentada como imprecisa, vários autores têm reportado resultados conclusivos na identificação de rizóbios usando esse gene. Neste contexto, MOSTASSO et al. (2002), baseados nas seqüências do gene 16S rRNA, identificaram que as estirpes de rizóbios mais eficientes e competitivas

foram geneticamente semelhantes a *Rhizobium tropici*, ressaltando que a estirpe H12 (SEMIA 4088) tinha alto potencial de fixação de nitrogênio em condições de solos ácidos do Cerrado Brasileiro.

CHUEIRE et al. (2003) realizaram a classificação taxonômica das estirpes de rizóbios recomendadas para elaboração de inoculantes nas culturas da soja e do feijoeiro no Brasil, baseados no seqüenciamento do gene 16S rRNA. O seqüenciamento permitiu definir que duas das estirpes recomendadas para a cultura da soja, SEMIA 587 e SEMIA 5019 (=29w), pertencem à espécie *Bradyrhizobium elkanii*, e as outras duas, SEMIA 5079 (=CPAC 15) e SEMIA 5080 (=CAPAC 7), à espécie *B. japonicum*. Determinaram ainda, que a estirpe SEMIA 4080 (=PRF 81), recomendada para a cultura do feijoeiro, pertence à espécie *Rhizobium tropici*.

FERNANDES et al. (2003) realizaram uma caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros, eficientes nas culturas do guandu e do caupí, usando a técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) da região do DNA que codifica o gene 16S rRNA e da região intergênica (16S- 23S rRNA), com cinco enzimas de restrição, bem como pelo seqüenciamento parcial da região do gene 16S rRNA. Eles concluíram que foi possível classificar as estirpes nos gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*, e que houve coerência entre as análises envolvendo a região do 16S rRNA; entretanto, o agrupamento com uma das estirpes diferiu pela análise do espaço intergênico.

Estudos recentes têm mostrado resultados controversos com relação à pertinência do gene 16S rRNA na identificação de espécies de rizóbios.

COENYE et al. (2005) apontaram que as seqüências do gene 16S rRNA são suficientes para separar gêneros e espécies próximas, mas não são capazes de diferenciar estirpes de uma mesma espécie.

Vários autores têm destacado que as seqüências de genes permitem a construção de árvores filogenéticas que refletem a história evolucionária das espécies, em grupos taxonômicos específicos, fornecendo uma taxonomia natural. Porém, apontam que o problema da análise filogenética é que ela é baseada

apenas nas seqüências de um gene, produzindo variação das árvores filogenéticas geradas quando são usados genes diferentes para o mesmo grupo de organismos comparados (SICHRITZ-PONTEN et al., 2001; KURTZMAN et al., 2003).

PINTO et al. (2007) realizaram uma caracterização polifásica de estirpes de *Rhizobium tropici* eficientes na fixação de nitrogênio no feijoeiro, destacando que os resultados do seqüenciamento do gene 16S rRNA proporcionaram dados tão consistentes quanto os oferecidos pela análise PCR-RFLP, confirmando a similaridade de 130 estirpes com *R. leguminosarum* e nenhuma das estirpes formando grupos com *R. gallicum* ou *R. etli*.

Por outro lado, SANTILLANA et al. (2008), baseados em estudos filogenéticos de diversidade com estirpes de *Rhizobium* em ervilha, concluíram que o gene 16S rRNA não é adequado para identificação de espécies dentro do gênero *Rhizobium*, e sugeriram a existência de uma nova espécie putativa dentro do grupo filogenético de *R. leguminosarum*.

#### **2.4.2. Filogenia de estirpes baseada no espaço Intergênico 16S-23S rRNA**

A região do espaço Intergênico, por ser menos conservada do que a região dos genes 16S e/ou 23S rRNA, tem sido usada com sucesso para caracterizar e identificar rizóbios a nível de gênero e espécie, devido às variações no comprimento das seqüências dessas regiões (LAGUERRE et al., 1996).

DEPRET et al. (2004) realizaram estudos de longo prazo, avaliando o efeito do manejo e da rotação de culturas, como trigo, milho e pastagem sobre a população de *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*, através de nódulos de plantas de ervilha. Eles encontraram que o maior nível de diversidade genética entre os isolados foi encontrado na monocultura de trigo, e mencionaram que o espaço intergênico (16S-23S rRNA) foi apropriado na identificação das estirpes de *Rhizobium leguminosarum*.

A análise do espaço intergênico 16S-23S rRNA e dos marcadores *atpD* e *recA* confirmou a identificação de estirpes pertencentes ao grupo I de *Rhizobium leguminosarum* bv trifolii; entretanto, os grupos II e III foram filogeneticamente divergentes de *R. leguminosarum* bv. viciae e *Rhizobium etli* (SANTILLANA et al., 2008).

#### **2.4.3. Análise filogenética de estirpes baseada em outros marcadores moleculares**

Devido ao elevado custo do seqüenciamento de genes, essa técnica não está disponível em todos os laboratórios. Assim, outras variações e combinações de métodos estão sendo utilizadas para verificar a posição taxonômica das bactérias; alguns deles têm mostrado boa correlação com o seqüenciamento do gene 16S rRNA. Destaca-se, entre esses métodos, a análise de PCR com oligonucleotídeos específicos, como REP, ERIC e BOX, e a análise de genes ribossomais, e o espaço intergênico associados ao método do RFLP, como os métodos que têm mostrado melhor a posição filogenética das bactérias fixadoras de nitrogênio, quando não há os recursos para o seqüenciamento (LAGUERRE et al., 1996; FERREIRA & HUNGRIA, 2002; DEPRET et al., 2004; GRANGE et al., 2007).

#### **2.5. Classificação taxonômica de bactérias diazotróficas simbióticas**

Na atualidade, baseados nas seqüências filogenéticas do gene 16S rRNA, no Manual de Bacteriologia Sistemática de BERGEY (2005), são definidos seis gêneros de rizóbios, os quais estão distribuídos em quatro famílias: Rhizobiaceae (*Rhizobium*, *Allorhizobium* e *Sinorhizobium*), Phyllobacteriaceae (*Mesorhizobium*), Bradyrhizobiaceae (*Bradyrhizobium*) e Xanthobacteraceae (*Azorhizobium*).

## 2.6. Taxonomia e características das bactérias do gênero *Rhizobium*

O gênero *Rhizobium* é descrito como bactérias gram-negativas, aeróbias, com capacidade de nodular as leguminosas. Pertencem à subdivisão alfa-proteobactérias, que inclui as bactérias de crescimento rápido, o que as diferencia do gênero *Bradyrhizobium*. Podem ter tanto flagelos peritríquios como subpolares e apresentam reação ácida em meio Extrato de Levedura Manitol Ágar (YMA) (ZAKHIA & LAJUDIE, 2001).

Na maioria das espécies do gênero *Rhizobium*, podem ser encontrados plasmídios (GARCÍA et al., 1996). Os genes responsáveis pela nodulação (*nod*) e fixação simbiótica de nitrogênio (*nif* e *fix*) estão localizados dentro do plasmídio simbiótico *pSym*. Esse plasmídio, nas estirpes de *Rhizobium leguminosarum* biovars phaseoli, que nodulam *P. vulgaris*, tem múltiplas cópias do gene da nitrogenase redutase (*nifH*), permitindo um grupo restrito de hospedeiros (MARTÍNEZ et al., 1985). Em contraste, em *R. tropici* e *R. gallicum* bv. Gallicum, o plasmídio *pSym* carrega uma simples cópia desse gene, permitindo maior grupo de hospedeiros (AMARGER & LAGUERRE, 1997).

No caso dos rizóbios que nodulam o feijoeiro, até 1984, estava definida uma única espécie, *Rhizobium leguminosarum* bv. Phaseoli (JORDAN, 1984). AMARGER (2001), baseado em um resumo da literatura disponível, apontou que pelo menos cinco espécies de *Rhizobium* têm sido reportadas como microssimbiontes de *P. vulgaris*, destacando que, potencialmente poderia haver outras espécies em simbiose com o mesmo, apresentando então cinco grupos característicos:

Um primeiro grupo de estirpes formado por *Rhizobium etli* bv. phaseoli com ampla distribuição em países como Argentina, Colômbia e México (SEGOVIA et al., 1993; EARDLY et al., 1995; AGUILAR et al., 1998).

Um segundo grupo representado por *Rhizobium tropici* presente nos solos ácidos da América do Sul (MARTINEZ-ROMERO et al., 1991) e alguns países da África (DIOUF et al., 2000).

Um terceiro grupo constituído por *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli comumente encontrado na Europa, e reportado na Tunísia e na Colômbia (EARDLY et al., 1995; MHAMDI et al., 2002).

Um quarto grupo formado por *Rhizobium gallicum* encontrado em simbiose com legumes na Europa (AMARGER et al., 1997; HERRERA-CERVERA et al., 1999), e uma estirpe do México (SESSITSCH et al., 1997), além de um quinto grupo constituído por *Rhizobium giardinii* encontrado em solos da Tunísia e da Europa (AMARGER et al., 1997; HERRERA-CERVERA et al., 1999).

## 2.7. Quantificação do nitrogênio fixado

Para estimar a contribuição das bactérias fixadoras de nitrogênio nas leguminosas, várias metodologias têm sido utilizadas. As mais empregadas, por sua facilidade e economia, são: o número e a massa de nódulos secos, a massa de planta seca e o rendimento e seus componentes, onde a correlação positiva entre as variáveis de nódulos e planta permite inferir sobre o nitrogênio fixado (MOHR et al., 1999; FERREIRA et al., 2000). No entanto, esses parâmetros só oferecem uma evidência indireta da fixação simbiótica e não proporcionam uma indicação precisa de quanto nitrogênio é fixado (DANSO, 1985).

O teor de nitrogênio em plantas leguminosas é outra variável importante, por estar relacionado à produção de matéria seca e, conseqüentemente, ao rendimento. O nitrogênio proveniente da fixação biológica tem sido amplamente estimado a partir da diferença entre o nitrogênio total e o proveniente de plantas não - noduladas (BODDEY et al., 1983). No entanto, esse método perde precisão quando os conteúdos de nitrogênio no solo são altos, já que as leguminosas noduladas também absorvem N disponível da solução do solo (DANSO, 1985).

A quantificação do nitrogênio total normalmente é feita pelo método de Kjeldahl, a partir do extrato obtido de 100 mg de massa seca com solução digestora de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) e posterior destilação hidróxido de sódio

(NaOH), titulando com  $H_2SO_4$  ou HCL como descrito por SILVA & QUEIROZ (2006).

A técnica isotópica, que utiliza o isótopo estável  $^{15}N$ , permite obter informações precisas da dinâmica do nitrogênio no sistema solo-planta, e uma vez marcadas a fonte de interesse com  $^{15}N$ , pode-se ter melhor estimativa do conteúdo de nitrogênio, produto da fixação biológica e, conseqüentemente, do balanço das entradas e saídas do nitrogênio no sistema solo-planta (AMBROSANO et al., 1997).

A técnica de redução de acetileno de HARDY et al. (1968) tem sido amplamente utilizada para quantificar o nitrogênio proveniente da fixação biológica, é simples, rápida e de baixo custo. Porém, seus resultados são controversos devido à atividade da enzima nitrogenase ter curta duração, o qual reduz as possibilidades de avaliação das variações diurnas, noturnas e de épocas de crescimento; subestimando a fixação biológica, em alguns casos, até 50 % (VAUGHN & JONES, 1976; AYANABA & LAWSON, 1977).

A determinação do conteúdo de nitrogênio na forma de N-ureídeo (alantoína e ácido alantoico) tem sido amplamente empregada para entender as variações metabólicas que ocorrem devido ao microssimbionte e ao hospedeiro, produto de alterações por estresses ambientais ou quando submetidas essas leguminosas noduladas a diferentes condições de manejo. (YOUNG & CONWAY, 1942; VOGELS & VAN DER DRIFT, 1970).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Amostras de solo para obtenção de isolados bacterianos**

Para a realização deste estudo, foram tomadas amostras representativas de solo (0- 20 cm), seguindo os procedimentos para coleta de amostra de solos (EMBRAPA, 2005), em sete diferentes localidades geográficas do Brasil (Tabela 1) e oito da Venezuela (Tabela 2), onde foi desenvolvida a cultura do feijoeiro, previamente, sem aplicação de inoculantes ou em áreas de vegetação natural. Obtidas as amostras de solo (aproximadamente 3 kg de cada uma), foi retirada uma subamostra de 200 gramas para posterior análise de solo e, em seguida, as amostras foram colocadas em sacos plásticos de 3 dm<sup>3</sup> de capacidade, procedendo-se à semeadura de plantas - iscas de feijão (*Phaseolus vulgaris*, L).

##### **3.1.2. Desenvolvimento das plantas - iscas de feijão em amostras de solo da Venezuela**

As amostras de solo da Venezuela com as plantas - iscas de feijão desenvolveram-se em uma casa de vegetação do Instituto de Agronomia, da Facultad de Agronomia de La Universidad Central de Venezuela, na cidade de Maracay Estado Aragua, durante os meses de novembro e dezembro de 2005. Foram semeadas três sementes de feijão da variedade “Montalban” de grão preto (ORTEGA et al., 1986), previamente desinfetadas superficialmente com etanol 95% por 1 minuto, solução de hipoclorito de sódio a 3%, por cinco minutos, e sete lavagens sucessivas com água destilada esterilizada (VINCENT, 1970).



**Tabela 1.** Sistema de uso da terra (SUT), origem, localização, características do solo e manejo relevante, de estirpes isoladas no feijoeiro, provenientes da Venezuela (VE), identificadas pelo Laboratório de Microorganismos e Plantas da UNESP Jaboticabal.

Identificação da estirpe	SUT/Município/Estado/País	Coordenadas Geográficas	Características do solo
LBMP-1VE	Feijão-Milho plantio convencional, Cagua, Aragua, VE.	10°10' 07,28" N 67°25' 45,41" W	Ácido, pH 6,3 sem aplicação de calcáreo.
LBMP-2VE	Feijão-Batata, plantio convencional Sanare, Lara, VE.	9° 43' 51,11" N 69°40'31,07" W	Ácido, pH 5,5, com aplicação de calcáreo.
LBMP-3VE	Feijão-Milho plantio convencional, Sabaneta, Barinas, VE.	8° 45' 31,75" N 69° 55' 12,36" W	Ácido, pH 6,2 sem aplicação de calcáreo.
LBMP-4VE	Feijão-Milho, plantio convencional, Tarragona, Monagas, VE.	9° 40' 14,47" N 63° 50' 59,50" W	Ácido, pH 5,5, com aplicação de calcáreo.
LBMP-5SVE	Feijão-Milho, plantio convencional, Turén, Portuguesa, VE.	9° 14' 55,74" N 69°06'17,56" W	Ácido, pH 6,2, sem aplicação de calcáreo.
LBMP-6VE	Feijão-Milho, plantio convencional, Tucutunemo, Aragua, VE.	10° 04' 57,64" N 67° 22' 48,99" W	Acido, pH 6,5 sem aplicação de calcáreo.
LBMP-7SVE	Feijão-Milho, plantio convencional, Libertad, Barinas, VE.	8° 33' 21,30" N 69° 31' 47,61" W	Acido, pH 5,9 com aplicação de calcáreo.
LBMP-8VE	Feijão-Milho plantio convencional, Samán Mocho, Carabobo, VE.	10° 07' 07,17" N 67° 53' 19,34" W	Ácido, pH 6,5 sem aplicação de calcáreo.

**Tabela 2.** Sistema de uso da terra (SUT), origem, localização, características do solo e manejo relevante, de estirpes isoladas no feijoeiro, provenientes do Brasil (BR), identificadas pelo Laboratório de Microorganismos e Plantas da UNESP Jaboticabal.

Identificação da estirpe	SUT/Município/Estado/País	Coordenadas Geográficas	Características do solo
LBMP-4BR	Milho plantio direto, Cristalina, GO, BR.	16° 10' 56,93" S 47° 28' 30,34" W	Ácido, pH 5,8, com aplicação de calcáreo.
LBMP-5BR	Milho plantio direto, Ponta Grossa, PR, BR.	25° 03' 36,26" S 50°07' 08,15" W	Ácido, pH 5,6, com aplicação de calcáreo.
LBMP-7BR	Cana de açúcar plantio direto, São Carlos, SP, BR.	22° 01' 24,91" S 47° 49' 13,90" W	Ácido, pH 5,8, com aplicação de calcáreo.
LBMP-8BR	Soja-Milho plantio convencional, Sorriso, Mato Grosso, MT, BR.	12° 31' 59,80" S 55° 40' 25,56" W	Ácido, pH 5,8 com aplicação de calcáreo.
LBMP-10BR	Pastagem natural não cultivado, Lavras, MG, BR.	21° 14' 36,09" S 44° 58' 49,84" W	Ácido, pH 5,4 sem aplicação de calcáreo.
LBMP-12BR	Pastagem natural não cultivado, Pouso Alegre, MG, BR.	22° 13' 51,18" S 45° 53' 19,98" W	Acido, pH 5,4 sem aplicação de calcáreo.
LBMP-16BR	Cana de açúcar plantio direto, Monte Alto, SP, BR.	21° 07' 10,07" S 48° 32' 23,97" W	Ácido, pH 5,7 com aplicação de calcáreo.

Aos sete dias após a semeadura, na fase de desenvolvimento V3 – (primeira folha triflhada) (FERNÁNDEZ et al., 1985), foi realizado o desbaste, deixando-se uma plântula por saco plástico. Realizou-se o manejo agrônômico apropriado para a cultura, seguindo as recomendações técnicas para o feijoeiro (AIDAR et al., 2002), até as plantas alcançarem a fase R6 –(floração) (FERNÁNDEZ et al., 1985), aos 44 dias após a semeadura.

Alcançada a fase R6, foi realizada a coleta e, em seguida, a lavagem do sistema radicular das plantas com água corrente, e retirada dos nódulos de cada planta, com o auxílio de uma tesoura, de maneira a não feri-los. Esses nódulos foram transferidos para tubos estéreis, procedendo-se à desinfecção superficial dos mesmos com etanol a 95%, por 1 minuto, solução de hipoclorito de sódio a 3% por cinco minutos, e sete lavagens sucessivas com água destilada esterilizada (VINCENT, 1970). Após a desinfecção, os nódulos foram transferidos para tubos Falcon estéreis contendo glicerol a 40% estéril e estocados a 20°C.

Terminado o processo de obtenção dos nódulos, solicitou-se à Organização de Proteção Fitossanitária da Venezuela o certificado fitossanitário, para o traslado dos nódulos ao Laboratório de Microrganismos e Plantas (LBMP) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Jaboticabal, Brasil; para posterior análise. A autorização foi concedida segundo consta no pedido N° 17572, de 03 de janeiro de 2006 (Apêndice A).

### **3.1.3. Desenvolvimento das plantas - iscas de feijão em amostras de solo do Brasil**

As amostras de solo do Brasil com as plantas - iscas de feijão desenvolveram-se em uma casa de vegetação do LBMP da UNESP Jaboticabal, durante os meses de março e abril de 2006. Foram semeadas três sementes de feijão da variedade Pérola (YOKOYAMA et al., 1999), previamente desinfetadas como descrito no item 3.1.2.

Aos seis dias após a semeadura, na fase de desenvolvimento V3 foi realizado o desbaste, deixando uma plântula por saco plástico. Realizou-se o manejo agrônômico apropriado para a cultura, seguindo as recomendações técnicas para o feijoeiro (AIDAR et al., 2002), até as plantas alcançarem a fase de desenvolvimento R6, aos 38 dias após a semeadura. Nessa fase realizou-se o processo de obtenção dos nódulos, como descrito para os isolados da Venezuela no item 3.1.2., até a estocagem, a 20°C, dos nódulos em tubos Falcon contendo glicerol a 40% estéril.

### **3.2. Isolamento das bactérias dos nódulos provenientes do Brasil e da Venezuela**

Todas as estirpes analisadas no presente trabalho foram isoladas a partir de nódulos de feijoeiro, coletados como descrito previamente no item 3.1. Os nódulos foram esmagados isoladamente com pinças estéreis e o fluido bacteriano, distribuído com uma alça microbiológica de platina devidamente flambada em placas de Petri contendo meio de cultura Extrato de Levedura Manitol Ágar (YMA), constituído por manitol, 10,0 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,5 g; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,2 g; NaCl, 0,1 g; extrato de levedura, 0,5 g; ágar, 8 g; vermelho Congo, 2,5 mL (solução estoque de 0,25g / 100 mL<sup>-1</sup>), dissolvidos em quantidade suficiente para um litro de água destilada e pH 6,8 (VINCENT, 1970).

Em seguida, as placas de Petri foram colocadas em câmara de crescimento de demanda biológica de oxigênio (BOD), a 28°C, durante seis dias. À medida que apareceram as colônias, foram replicadas varias vezes para isolá-las de contaminantes, que foram facilmente reconhecíveis, já que eles adquiriram coloração vermelha na presença do corante vermelho congo, até a obtenção de colônias isoladas puras.

### **3.2.1. Caracterização fenotípica e estocagem das colônias isoladas puras**

Obtidas as colônias isoladas puras, procedeu-se à descrição das colônias isoladas, baseando-se nas seguintes características: taxa de crescimento, medida pelo tempo de aparecimento de colônias isoladas (rápido: 2 a 3 dias; intermediário: 4 a 5 dias; lento: 6 a 10); diâmetro médio das colônias isoladas (< 1 mm, 1 a 2 mm e > 2 mm); modificação do pH do meio, em meio de cultura azul de bromotimol, produção de goma (baixa, média e alta) e coloração das colônias (SOARES et al., 2006). Para cada um dos isolados, também foram realizadas diluições seriadas e curvas de crescimento, para definir o número de células viáveis mL<sup>-1</sup> (método de unidades formadoras de colônias), seguindo os procedimentos citados por VINCENT (1970) e HUNGRIA & ARAUJO (1994).

Cada um dos isolados foi estocado em tubos contendo 600 µL de meio de cultura YM líquido mais 400 µL de glicerol 40%, previamente autoclavados a 120 Kgf cm<sup>-2</sup> durante 20 minutos. Nos tubos foram colocadas as células de cada bactéria crescida em YMA, com ajuda da alça microbiológica de platina, sendo os frascos posteriormente estocados em freezer – 80°C, para posteriores análises.

### **3.3. Preparo das células e extração do DNA genômico dos isolados**

Para extração do DNA, os estoques dos isolados bacterianos foram replicados em meio YMA. Posteriormente, as células das estirpes avaliadas foram transferidas para meio Triptona Extrato de Levedura (TY) solidificado com Ágar, constituído por triptona, 5,0 g; CaCl<sub>2</sub>, 0,9 g; extrato de levedura, 3,0 g; ágar, 8 g; (BERINGER, 1974) e cultivadas em câmara BOD a 28°C, e replicadas a cada dois dias, por cinco vezes sucessivas, para diminuir o excesso de exopolissacarídeos que se apresentam como interferentes na extração de DNA (CASTELLANE, 2007). Em seguida, as bactérias foram crescidas em 50 mL de meio TY líquido, a 28°C, sob agitação constante, a 120 rpm por 48 horas.

A partir do cultivo das bactérias em meio TY líquido, procedeu-se à extração e purificação do DNA genômico pelo método de SAMBROOK et al. (1989) com algumas modificações. As células crescidas em TY líquido foram centrifugadas a 12.000 g a 4°C, por 30 minutos. Desprezou-se o sobrenadante, e o pellet foi ressuspenso em 1 mL de NaCl a 0,85% e centrifugado novamente a 15.600 g, por cinco minutos. Descartou-se o sobrenadante, e o pellet foi ressuspenso em solução salina EDTA pH 8,0 e incubado a 37°C, por 10 min. Em seguida, colocou-se lisozima 5mg/mL (preparada em tampão Tris 24 mM – EDTA 10 mM – Dextrose 50 mM x 100 mL<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O ) e 25mL de RNase (25mg/ml), incubando-se a 37°C, por 40 minutos.

Percorrido o tempo da incubação com lisozima e RNase, acrescentaram-se 500 µL de solução SDS 20%, sendo incubado novamente a 55°C, por 20 min. Colocaram-se 500 µL de perclorato de sódio 5M, em seguida 2,0 mL de solução fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e incubou-se a 8°C, em agitador orbital a 220 rpm, durante 60 min. Centrifugou-se a 12.000 g a 4°C, por 20 min. Após essa centrifugação, retirou-se o sobrenadante para tubos limpos, e foram colocados 2 mL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e incubada a 8°C, em agitador orbital a 220 rpm, durante 20 min. Centrifugou-se novamente a 5.860 g a 4°C, por 20 min. Retirou-se o sobrenadante e repetiu-se o processo com clorofórmio: álcool isoamílico.

Por último, retirou-se o sobrenadante e acrescentaram-se dois volumes de etanol a 95%, gelado, e esperou-se a precipitação do material. Esse processo foi realizado a -20°C (over-night). Após a precipitação, centrifugou-se a 12.000 g por 20 min, eliminou-se o sobrenadante, lavaram-se rapidamente os tubos com etanol a 70%, gelado, e secaram-se os tubos à temperatura ambiente, o DNA foi solubilizado em 50 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0), gelado, e transferido para tubos Eppendorf e estocados a -20°C.

### 3.4. Quantificação do DNA

Para quantificação do DNA, foi utilizado um biofotômetro (Eppendorf), fazendo-se a leitura no comprimento de onda de 260 nm e de 280 nm para proteína. A relação 260/280 foi estimada para caracterizar a pureza do DNA, ou seja, se o material estava contaminado por proteínas ou fenóis. Preparações puras do DNA têm o valor estimado da relação DO 260/280 de 1,8 (SAMBROOK et al., 1989). A concentração do DNA foi calculada pela fórmula:

Concentração do DNA = leitura 260 nm x diluição da amostra x 50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ .

A quantificação do DNA também foi realizada em gel de agarose a 0,8% com o intuito de verificar a integridade do material e a contaminação por moléculas de RNA de baixa massa molecular. A corrida eletroforética foi conduzida em tampão TEB 1X (Tris 89 mM, Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3), e a visualização possível, graças ao brometo de etídio (0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), com uma corrida a 80V. Uma alíquota de 5  $\mu\text{L}$  do DNA mais 3  $\mu\text{L}$  de tampão de carregamento (0,025% de azul de bromofenol e 50% de glicerol) foram aplicados no gel. Um DNA de concentração conhecida pGEM (50 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ ) foi aplicado em diferentes volumes para a comparação visual da intensidade de fluorescência emitida pelo brometo de etídio, para estimar a concentração do material.

Após a quantificação dos DNAs, uma solução - trabalho foi preparada onde cada um dos DNAs foi diluído em água milli-Q, estéril, para se obter uma concentração de 25 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ , os quais foram armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento do uso.

### 3.5. Amplificação do gene 16S rRNA

As soluções de trabalho dos DNAs dos 15 isolados bacterianos foram amplificadas com os oligonucleotídeos iniciadores FD1 e RD1 que codificam o

gene 16S rRNA (WEISBURG et al.,1991) e amplificam um fragmento de 1.500 pb em bactérias fixadoras de nitrogênio.

As seqüências dos oligonucleotídeos foram:

- FD1-5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'.

- RD1-5'-CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3'.

A reação de amplificação por PCR foi realizada com duas repetições em volume final de 20  $\mu\text{L}$ , contendo 12,7  $\mu\text{L}$  de água ultrapura (Milli-Q, Millipore, EUA), esterilizada; 0,4  $\mu\text{L}$  da mistura de dNTPs (1,5  $\text{mmol L}^{-1}$  de cada); 2,0  $\mu\text{L}$  de tampão 10X; 0,6  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50  $\text{mmol L}^{-1}$ ); 1,0  $\mu\text{L}$  de cada oligonucleotídeo iniciador (na concentração de 5  $\text{pmol } \mu\text{L}^{-1}$ ); 0,3  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase (5 U  $\mu\text{L}^{-1}$ ); 2,0  $\mu\text{L}$  de DNA da amostra (contendo aproximadamente 50 ng).

Os ciclos utilizados para a amplificação por PCR foram: 1ciclo de desnaturação inicial a 95°C, por 2 min; 35 ciclos de desnaturação (1 min a 95°C), anelamento (1 min a 55°C) e extensão (2 min a 72°C); um ciclo de extensão final de 4 min a 72°C e manutenção a 4 °C (WEISBURG et al.,1991).

### **3.6. Purificação dos produtos da PCR e seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA**

Os produtos da PCR foram purificados e seqüenciados diretamente, utilizando o ABI PRISM Big Dye Terminator kit (Applied Biosystems, EUA), de acordo com instruções do fabricante, em seqüenciador de DNA ABI 3700. Foram seqüenciados os fragmentos de 16S rRNA iniciados pelos oligonucleotídeos FD1 (forward) e RD1 (reverse). Os ciclos de amplificação da PCR, citados anteriormente, também foram usados nas reações de PCR - seqüenciamento.

A reação de amplificação foi realizada com duas repetições em volume final de 10  $\mu\text{L}$ , contendo 2,5  $\mu\text{L}$  de água ultrapura (Milli-Q, Millipore, EUA), esterilizada;



Terminator Dinamic 1,0  $\mu\text{L}$ ; tampão 10X 1,0  $\mu\text{L}$ ; oligonucleotídeo iniciador FD1 ou RD1 1,0  $\mu\text{L}$  (na concentração de 5 pmol  $\mu\text{L}^{-1}$ ); 2,0  $\mu\text{L}$  de DNA (produto da PCR), contendo aproximadamente 50 ng.

### **3.7. Análises das seqüências parciais do gene 16S rRNA**

Os eletroferogramas gerados foram verificados quanto à qualidade através do software Sequencing Analysis 3.4 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A análise dos eletroferogramas foi realizada por meio dos programas "Phred, Phrap and Consed" (GORDON et al., 1998), através do ContGEN, com um mínimo de 400 bases e qualidade "Phred" superior a 20.

As seqüências de nucleotídeos geradas (Apêndice B) foram comparadas com outras seqüências previamente depositadas no banco de dados internacional "GenBank" do National Center for Biotechnology Information (NCBI) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), usando a ferramenta BLASTN (ALTSCHUL et al., 1997). Para o alinhamento seqüencial múltiplo do gene 16S rRNA, obtidos neste estudo, e outros selecionados no banco de dados, foi utilizada a técnica de alinhamento global com o auxílio do programa BioEdit (HALL, 1999), selecionando a opção de alinhamento do programa Clustal X (THOMPSON et al., 1997).

A partir das seqüências alinhadas foi gerada uma árvore filogenética pelo método de distância "neighbor-joining", usando o programa MEGA V 2.1 (KUMAR et al., 2001) com 1.000 repetições do tipo "bootstraps". Para a realização da árvore, somente foi incluída a estirpe comercial PRF-81 (=SEMIA 4080), porque a que a seqüência da CIAT-899 (=SEMIA 4077), não se encontrou disponível no banco de dados GenBank.

### 3.8. Avaliação agrônômica dos isolados bacterianos da Venezuela

Para avaliar a capacidade de nodulação, produção de matéria seca e capacidade de fixação de nitrogênio em plantas de feijão, dos oito isolados da Venezuela, foi realizado um experimento em condições axênicas, usando como substrato vermiculita, previamente autoclavada, em casa de vegetação climatizada (28/24°C dia-noite e  $60 \pm 5$  % UR), do Departamento de Produção Vegetal, UNESP Jaboticabal, desde o dia primeiro de dezembro de 2006 até o oito de janeiro de 2007.

O desenho experimental utilizado foi em blocos ao acaso, com três repetições, e treze tratamentos, que foram: os oito isolados da Venezuela LBMP-1VE, LBMP-2VE, LBMP-3VE, LBMP-4VE, LBMP-5SVE, LBMP-7SVE e LBMP-8VE (Tabela 1), duas estirpes comerciais de *Rhizobium tropici* CIAT- 899 (=SEMIA 4077) e PRF- 81 (=SEMIA 4080), a mistura das duas estirpes comerciais na proporção 1:1, mais duas testemunhas não-inoculadas, uma sem adubação nitrogenada e a outra com  $70 \text{ kg ha}^{-1}$  de Nitrogênio, dose empregada em experimento prévio com bons resultados (SOARES et al., 2006); a fonte foi uréia, parcelada em cinco vezes, em intervalos de seis dias.

Os oito isolados da Venezuela e as duas estirpes comerciais, disponíveis no Laboratório de Bioquímica e Microrganismos de Plantas (LBMP), foram replicados em meio extrato de Levedura Manitol Ágar (YMA) (preparado como descrito no item 3.2.). Em seguida, prepararam-se os inoculantes em meio líquido com Extrato de Levedura e Manitol (YM), a 28°C, em agitação de 120 rpm (em agitador orbital), por 48 horas (VINCENT, 1970). Essas suspensões foram padronizadas para uma mesma densidade ótica, utilizando-se um colorímetro fotoelétrico, resultando numa população com aproximadamente  $10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$  (método de Unidades Formadoras de Colônias).

O tamanho da unidade experimental foi de três plantas por parcela, crescendo cada uma em um tubete. Foram semeadas duas sementes da variedade Pérola, (desinfetadas, como descritas anteriormente) por tubete,

deixando-se uma plântula aos seis dias após a semeadura, na fase de desenvolvimento V3. Realizado o desbaste, foi aplicado 1 mL dos tratamentos inoculantes na base das plantas. As plantas cresceram nos tubetes plásticos de 250 cm<sup>3</sup> de capacidade, os quais continham vermiculita (Figura 1), previamente esterilizada por autoclavagem a 120 kgf cm<sup>-2</sup>, durante 20 min e valores de pH de 6,8.

Realizaram-se irrigações freqüentes, com água destilada esterilizada, de maneira a manter os tubetes próximos da capacidade de campo. Todos os tratamentos receberam solução nutritiva sem nitrogênio aplicada semanalmente (GIBSON, 1987). Na fase de desenvolvimento R6 (aos 38 dias após a semeadura), procedeu-se à colheita das três plantas, determinando-se o número (NN) e a massa de nódulos secos (MNS) por planta, a massa da parte aérea seca (MPAS) e o teor e o acúmulo de nitrogênio (NPA), determinadas pelo método semimicrokjeldahl, de acordo com SILVA & QUEIROZ (2006). Os resultados obtidos submeteram-se à análise da variância pelo teste F, e as médias, comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, usando o programa Sistema de Análise da Variância (SISVAR), (FERREIRA, 1999).

Com base nos resultados obtidos, foram selecionados os dois melhores isolados, considerando-os novas estirpes bacterianas, para serem avaliados posteriormente.

### **3.9. Avaliação agrônômica dos isolados bacterianos do Brasil**

Para avaliar a capacidade de nodulação, produção de matéria seca e capacidade de fixação de nitrogênio em plantas de feijão dos sete isolados do Brasil, foi realizado, no mesmo local e em condições semelhantes às descritas no item 3.8., outro experimento do dia dez de janeiro até o dia dezessete de fevereiro de 2007. Os doze tratamentos avaliados foram: os sete isolados do Brasil LBMP-4BR, LBMP-5BR, LBMP-7BR, LBMP-8BR, LBMP-10BR, LBMP-12BR e LBMP-16BR (Tabela 2), duas estirpes comerciais de *Rhizobium tropici* CIAT 899

(=SEMIA 4077) e PRF 81 (=4080), a mistura das duas estirpes comerciais, na proporção de 1:1, e duas testemunhas não-inoculadas, uma sem adubação nitrogenada e a outra com 70 kg ha<sup>-1</sup> de Nitrogênio (fonte uréia, parcelada em cinco vezes, em intervalos de seis dias).

Todos os procedimentos, condições experimentais e variáveis medidas no experimento com os isolados da Venezuela (item 3.8.) também foram realizados neste experimento, razão pela qual não serão descritos novamente. As plantas, neste experimento, também foram colhidas aos 38 dias após a semeadura, na fase de desenvolvimento R6. Com base nas respostas dos isolados, também foram selecionadas as duas melhores estirpes do Brasil, para posterior estudo.

### **3.10. Diversidade genética das estirpes selecionadas, através de ITS (16S-23S rRNA)**

Quatro estirpes de rizóbios, duas do Brasil e duas da Venezuela, previamente selecionadas (dos experimentos de avaliação agrônômica, neste estudo), quanto à capacidade de nodulação e fixação de nitrogênio, LBMP-4BR, LBMP-12BR, LBMP-3VE e LBMP-4VE, foram avaliadas para identificá-las taxonomicamente através do seqüenciamento do espaço intergênico (16S-23S rRNA). Além disso, identificou-se a população nativa de um solo Latossolo Vermelho-Escuro por meio da técnica assinalada.

#### **3.10.1. Condução experimental**

O experimento foi realizado na casa de vegetação descrita nos experimentos anteriores, do dia vinte de fevereiro até o dia trinta e um de março de 2007, sendo conduzido em tubetes de plástico de 250 cm<sup>3</sup> de capacidade, os quais continham vermiculita previamente esterilizada por autoclavagem (como mostrado na Figura 1).



**Figura 1.** Experimento com plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*), conduzido em tubetes plásticos de 250 cm<sup>3</sup> de capacidade, contendo vermiculita previamente em autoclavada.

Foram avaliados quinze tratamentos: sete deles foram as diluições seriadas de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  de suspensões do solo Latossolo Vermelho-Escuro, em solução salina estéril a 0,85%, preparadas de acordo com VINCENT (1970); os outros oito tratamentos foram: quatro estirpes, LBMP-3VE, LBMP-4VE, LBMP-4BR, e LBMP-12BR (Tabelas 1 e 2), mais as estirpes CIAT-899 e PRF-81, formuladas isoladamente, mais duas testemunhas não-inoculadas, uma sem adubação nitrogenada e a outra com 70 kg ha<sup>-1</sup> de Nitrogênio (fonte uréia, parcelada em cinco vezes, em intervalos de seis dias).

A partir das estirpes, prepararam-se os inoculantes em meio líquido com Extrato de Levedura e Manitol (YM), a 28 °C, em agitação de 120 rpm (em agitador orbital), por 48 horas (VINCENT, 1970). Essas suspensões foram padronizadas para uma mesma densidade ótica, utilizando-se de um colorímetro

fotoelétrico, resultando numa população com aproximadamente  $10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$  (método de Unidades Formadoras de Colônias).

O tamanho da unidade experimental foi de três plantas por parcela, crescendo cada uma em um tubete. Foram semeadas duas sementes da variedade Pérola, (desinfetadas, como descritas anteriormente) por tubete, deixando-se uma plântula aos seis dias após a semeadura, na fase de desenvolvimento V3. Realizado o desbaste, foi aplicado 1 mL das diluições seriadas e dos inoculantes na base das plantas. Realizaram-se irrigações freqüentes, com água destilada esterilizada, de maneira a manter os tubetes próximos da capacidade de campo. Todos os tratamentos receberam solução nutritiva sem nitrogênio, aplicada semanalmente (GIBSON, 1987).

Na fase de desenvolvimento R6 - floração, procedeu-se à colheita das plantas e foi conferida a presença de nodulação, nos tratamentos de diluição seriada, para a determinação da população nativa de rizóbios no solo, realizada pelo método do número mais provável, de acordo com o procedimento descrito por VINCENT (1970).

### **3.10.2. Colheita dos nódulos e obtenção de colônias isoladas puras**

Os nódulos dos tratamentos das diluições seriadas, e das estirpes avaliadas foram utilizados para posterior identificação por seqüenciamento do espaço intergênico (ITS). Para isto, dois nódulos de cada planta foram desinfetados superficialmente, conforme já descrito anteriormente. Em seguida, os nódulos foram esmagados em placas de Petri, que continham meio de cultura Extrato de Levedura Manitol Ágar (YMA) com vermelho congo (VINCENT, 1970), sendo as placas colocadas em câmara de crescimento de demanda biológica de oxigênio (BOD), a  $28^{\circ}\text{C}$ , por 48 horas, e replicados até a obtenção de colônias puras.

Obtidas as colônias isoladas puras dos nódulos dos tratamentos das diluições seriadas, procedeu-se à separação delas em grupos homogêneos,

baseando-se nas características microbiológicas dos isolados (como descrito no item 3.2.1.).

Os grupos homogêneos dos isolados nativos do solo e as estirpes avaliadas (re-isoladas) foram cultivados em meio Triptona Extrato de Levedura (TY) solidificado com Agar (BERINGER, 1974) em câmara BOD a 28°C, e replicados a cada dois dias, por cinco vezes sucessivas. Em seguida, as bactérias foram crescidas em 50 mL de meio TY líquido, a 28°C sob agitação constante a 120 rpm, por 48 horas.

A partir do cultivo de células em meio TY líquido, usou-se o método de SAMBROOK et al. (1989) para extração e purificação do DNA genômico (como descrito no item 3.3.).

### **3.10.3. Amplificação do espaço intergênico (16S-23S rRNA)**

O DNA das bactérias nativas do solo e das quatro estirpes (re-isoladas) foi amplificado em termociclador para PCR, com os oligonucleotídeos iniciadores FGPS 1490 e FGPS132' que amplificam um fragmento entre 450 e 700 pb, e codificam o espaço intergênico entre os genes 16S rRNA e 23S rRNA (LAGUERRE et al., 1996).

As seqüências dos oligonucleotídeos foram:

-FGPS 1490 5'-TGCGGCTGGATCACCTCCTT-3'

-FGPS132' 5'-CCGGGTTTCCCCATTCGG-3'

A reação de amplificação por PCR foi realizada com duas repetições em volume final de 20 µL, contendo 12,7 µL de água ultrapura (Milli-Q, Millipore, EUA), esterilizada; 0,4 µL da mistura de dNTPs (1,5 mmol L<sup>-1</sup> de cada); 2,0 µL de tampão 10X; 0,6 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mmol L<sup>-1</sup>); 1,0 µL de cada oligonucleotídeo

iniciador (na concentração de  $5 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$ );  $0,3 \text{ } \mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase ( $5 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$ );  $2,0 \text{ } \mu\text{L}$  de DNA da amostra (contendo aproximadamente  $50 \text{ ng}$ ).

Os ciclos utilizados para a amplificação por PCR foram: 1 ciclo de desnaturação inicial a  $95^\circ\text{C}$  por  $3 \text{ min}$ ; 35 ciclos de desnaturação ( $1 \text{ min}$  a  $94^\circ\text{C}$ ), anelamento ( $1 \text{ min}$  a  $55^\circ\text{C}$ ) e extensão ( $2 \text{ min}$  a  $72^\circ\text{C}$ ); um ciclo de extensão final de  $3 \text{ min}$ , a  $72^\circ\text{C}$ , e manutenção a  $4^\circ\text{C}$  (LAGUERRE et al., 1996).

#### **3.10.4. Purificação dos produtos da PCR e seqüenciamento do espaço intergênico (16S-23S rRNA)**

Os produtos de PCR foram purificados e seqüenciados diretamente, utilizando o ABI PRISM Big Dye Terminator kit (Applied Biosystems, EUA), de acordo com instruções do fabricante, em seqüenciador de DNA ABI 3700. Foi realizado o seqüenciamento completo do espaço intergênico, ou seja, tanto do oligonucleotídeo iniciador “forward” FGPS 140 quanto do “reverse” FGPS 132, para montagem posterior das seqüências consenso. Os ciclos de amplificação da PCR, anteriormente citados, também foram usados nas reações de seqüenciamento.

A reação de amplificação por PCR foi realizada com duas repetições em volume final de  $10 \text{ } \mu\text{L}$ , contendo  $2,5 \text{ } \mu\text{L}$  de água ultrapura (Milli-Q, Millipore, EUA), esterilizada; Terminator Dinamic  $1,0 \text{ } \mu\text{L}$ ; tampão 5X ( $400 \text{ mM Tris-HCl}$ , pH9;  $10 \text{ mM MgCl}_2$ )  $1,0 \text{ } \mu\text{L}$ ; oligonucleotídeo do iniciador FGPS 1490 ou do FGPS132'  $1,0 \text{ } \mu\text{L}$  (na concentração de  $5 \text{ pmol } \mu\text{L}^{-1}$ );  $2,0 \text{ } \mu\text{L}$  de DNA (produto da PCR), contendo aproximadamente  $50 \text{ ng}$ .

#### **3.10.5. Análises das seqüências do espaço intergênico (16S-23S rRNA)**

Os eletroferogramas gerados foram verificados, quanto à qualidade, através do programa Sequencing Analysis 3.4 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A análise dos eletroferogramas foi realizada por meio dos programas



"Phred, Phrap and Consed" (GORDON et al., 1998), através do ContGEN, com um mínimo de 400 bases, e qualidade "Phred" superior a 20. Os consensos das seqüências foram obtidos pela sobreposição mínima de 50 pb, usando os programas citados anteriormente.

As seqüências de nucleotídeos geradas neste experimento (Apêndice C), foram submetidas e comparadas com outras seqüências previamente depositadas no banco de dados internacional "GenBank" do National Center for Biotechnology Information (NCBI), usando a ferramenta BLASTN (ALTSCHUL et al., 1997). As seqüências foram aceitas no GenBank, recebendo seus respectivos números de acessos.

Para o alinhamento seqüencial múltiplo dos genes de 16S-23S rRNA, obtidos neste estudo, e outros selecionados no banco de dados, foi utilizada a técnica de alinhamento global com o auxílio do programa BioEdit (HALL, 1999), selecionando a opção de alinhamento do programa Clustal X (THOMPSON et al., 1997).

A partir das seqüências alinhadas, foi gerada uma árvore filogenética pelo método de distância "neighbor-joining," usando o programa MEGA V 2.1 (KUMAR et al., 2001) com 1.000 repetições do tipo "bootstraps". Para a realização da árvore, somente foi incluída a estirpe comercial CIAT-899, porque a seqüência da PRF-81 não se encontrou disponível no banco de dados GenBank.

### **3.11. Produtividade e nodulação do feijoeiro das quatro melhores estirpes**

Para determinar a capacidade produtiva das duas melhores estirpes do Brasil e da Venezuela (identificadas nos experimentos de avaliação agrônômicas anteriores item 3.8., e 3.9.), realizou-se um experimento em delineamento experimental de blocos ao acaso com três repetições, em casa de vegetação climatizada (28/24°C dia-noite e 60 ± 5% UR), na UNESP Jaboticabal, durante os meses de abril a julho de 2007.

O experimento foi realizado em vasos plásticos com capacidade para 7,5 dm<sup>3</sup> (Figura 2), contendo um solo Latossolo Vermelho-Escuro de textura média, sem cultura estabelecida durante os últimos cinco anos, com valores de pH em CaCl<sub>2</sub> 5,9; H +Al 11 mmolc dm<sup>-3</sup>; Ca 30 mmolc dm<sup>-3</sup>; Mg 18 mmolc dm<sup>-3</sup>; K 2,4 mmolc dm<sup>-3</sup>; P 32 mg dm<sup>-3</sup>; matéria orgânica 11 g dm<sup>-3</sup>; Cu 0,6 mg dm<sup>-3</sup>; Fe 8,0 mg dm<sup>-3</sup>; Mn 5,2 mg dm<sup>-3</sup>; Zn 0,6 mg dm<sup>-3</sup>; e V% 81. Com base nas características do solo e dos requerimentos nutricionais do feijoeiro (OLIVEIRA et al., 2002), não foi necessária a realização da calagem, e aplicaram-se 200 kg ha<sup>-1</sup> da formulação NPK 00-20-20 antes da semeadura.

Foram avaliados treze tratamentos: as quatro novas estirpes de rizóbios, LBMP-3VE, LBMP-4VE, LBMP-4BR, e LBMP-12BR (Tabelas 1 e 2), as duas estirpes comerciais CIAT-899 e PRF-81, inoculadas isoladamente; quatro tratamentos contendo cada um deles a mistura de uma das estirpes do LBMP com a PRF-81 em proporção 1:1, a mistura das comerciais em proporção 1:1, e duas testemunhas, não-inoculadas, uma sem adubação nitrogenada e a outra com 70 kg ha<sup>-1</sup> de Nitrogênio (fonte uréia, sendo aplicada metade após o desbaste e a outra aos 25 dias após a semeadura).

Os tratamentos inoculantes foram preparados, como descritos nos outros experimentos, e aplicou-se 1 mL nas sementes, antes da semeadura. Colocaram-se duas sementes (variedade Pérola, previamente desinfetada) por vaso, deixando-se uma plântula aos seis dias após a semeadura, na fase de desenvolvimento V3. A irrigação foi realizada por gotejamento, com auxílio de tensiômetros, irrigando aos 40 kPa e repondo a água até a capacidade de campo

A unidade experimental foi composta por seis plantas, duas das quais foram colhidas em R6 – floração, (aos 38 dias após a semeadura), determinando-se nelas o número (NN) e a massa de nódulos secos (MNS) por planta, a massa da parte aérea seca (MPAS) e o teor e o acúmulo de nitrogênio (NPA), determinados pelo método semimicrokjeldahl, de acordo com SILVA & QUEIROZ (2006).



**Figura 2.** Experimento com plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*), conduzido em vasos plásticos de 7,5 dm<sup>3</sup> de capacidade, contendo um solo Latossolo Vermelho-Escuro, com sistema de irrigação por gotejamento.

Na fase de desenvolvimento R9 – (maturação) (FERNÁNDEZ et al., 1985), aos 81 dias após a semeadura, colheram-se as quatro plantas restantes, determinando-se a produtividade de grãos por planta (PG), com sua umidade corrigida para 13%, e o teor de nitrogênio em grãos (NTG). Os resultados obtidos submeteram-se à análise da variância pelo teste F, e as médias, comparadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade, usando-se o programa Sistema de Análise da Variância (SISVAR), (FERREIRA, 1999).

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Diversidade fenotípica dos isolados do Brasil e da Venezuela**

Os isolados bacterianos do Brasil e da Venezuela apresentaram poucas diferenças entre si para as características fenotípicas avaliadas neste trabalho (Tabela 3). Eles tiveram reação ácida (coloração amarela na presença do indicador azul de bromotimol) (VINCENT, 1970). O tempo de aparecimento de todas as colônias avaliadas foi rápido (2 a 3 dias). ZAKHIA & LAJUDIE (2001) encontraram que dentre os isolados bacterianos que avaliaram, os de crescimento rápido corresponderam ao gênero *Rhizobium*.

### **4.2. Diversidade genética dos isolados do Brasil e da Venezuela**

A comparação das seqüências parciais de nucleotídeos (Forward FD1) do gene 16S rRNA dos sete isolados do Brasil e dos oito da Venezuela, com as seqüências do banco de dados do NCBI, atribuiu altos valores de similaridade aos isolados (Tabela 4), permitindo afirmar que a maioria das espécies pertence ao gênero *Rhizobium*, e somente uma delas ao gênero *Sinorhizobium*. Esses resultados coincidem com os obtidos por COENYE et al. (2005), que relataram que as seqüências do gene 16S rRNA são apropriadas para separar em nível de gêneros e de espécies próximas, mas não são capazes de diferenciar estirpes de uma mesma espécie.

**Tabela 3.** Caracterização fenotípica dos isolados do Brasil (BR) e da Venezuela (VE), baseada em <sup>(1)</sup> Tempo em dias de crescimento de colônias isoladas; <sup>(2)</sup> Diâmetro da colônia (mm); <sup>(3)</sup> Produção de goma; <sup>(4)</sup> Alteração do pH do meio de cultivo; <sup>(5)</sup> Coloração das colônias.

Isolados	TCD <sup>(1)</sup>	D <sup>(2)</sup>	PrG <sup>(3)</sup>	pH <sup>(4)</sup>	COR <sup>(5)</sup>
LBMP-4BR	2	>2mm	Alta	Ácido	Branca
LBMP-5BR	2	>2mm	Alta	Ácido	Branca
LBMP-7BR	3	>2mm	Alta	Ácido	Branca
LBMP-8BR	2	>2mm	Alta	Ácido	Branca
LBMP-10BR	3	>2mm	Alta	Ácido	Branca
LBMP-12BR	3	2mm	Média	Ácido	Branca
LBMP-16BR	2	>2mm	Alta	Ácido	Branca
LBMP-1VE	3	2mm	Média	Ácido	Branca
LBMP-2VE	2	>2mm	Alta	Ácido	Branco
LBMP-3VE	2	>2mm	Alta	Ácido	Branca
LBMP-4VE	2	>2mm	Alta	Ácido	Branca
LBMP-5SVE	3	>2mm	Alta	Ácido	Amarela
LBMP-6VE	2	>2mm	Alta	Ácido	Branca
LBMP-7SVE	3	>2mm	Média	Ácido	Amarela
LBMP-8VE	3	>2mm	Alta	Ácido	Branca

Houve variabilidade genética em nível de espécies dos isolados (Brasil e Venezuela), sendo classificados como: *Rhizobium tropici* (33,3%), *R. leguminosarum* (27,4%), *R. etli* (20,3%), *Rhizobium sp.* (13%) e *Sinorhizobium sp.* (6%). Esta última espécie foi encontrada somente entre os isolados da Venezuela; entretanto, *Rhizobium sp.* foi exclusiva nos isolados do Brasil (Tabela 4). Vários autores têm evidenciado a presença das espécies identificadas neste estudo, nas condições do Brasil e/ou da Colômbia (MARTÍNEZ et al., 1985;

EARDLY et al., 1995; MOSTASSO et al., 2002; GRANGE & HUNGRIA, 2004; PINTO et al., 2007).

A presença de *R. tropici* em maior porcentagem, tanto em isolados do Brasil quanto da Venezuela, permite suportar os resultados obtidos por MARTÍNEZ-ROMERO et al. (1991), de que essa espécie parece ser originária de regiões tropicais da América do Sul.

As seqüências das 15 estirpes avaliadas foram comparadas com as seqüências disponíveis no NCBI, e construída uma árvore filogenética (Figura 3). Dentre as cinco estirpes identificadas como *Rizhobium tropici*, somente a LBMP-4BR e a LBMP-5BR foram agrupadas dentro do mesmo grupo filogenético. Entretanto, as outras três estirpes não apresentaram homologia com nenhuma das estirpes consideradas no estudo. Além disso, a estirpe comercial SEMIA 4080 (=PRF-81) somente se agrupou com *Rhizobium* sp. do banco de dados NCBI, sugerindo que houve variabilidade entre as espécies de *R. tropici*, como descrito por outros autores (MOSTASSO et al., 2002; PINTO et al., 2007).

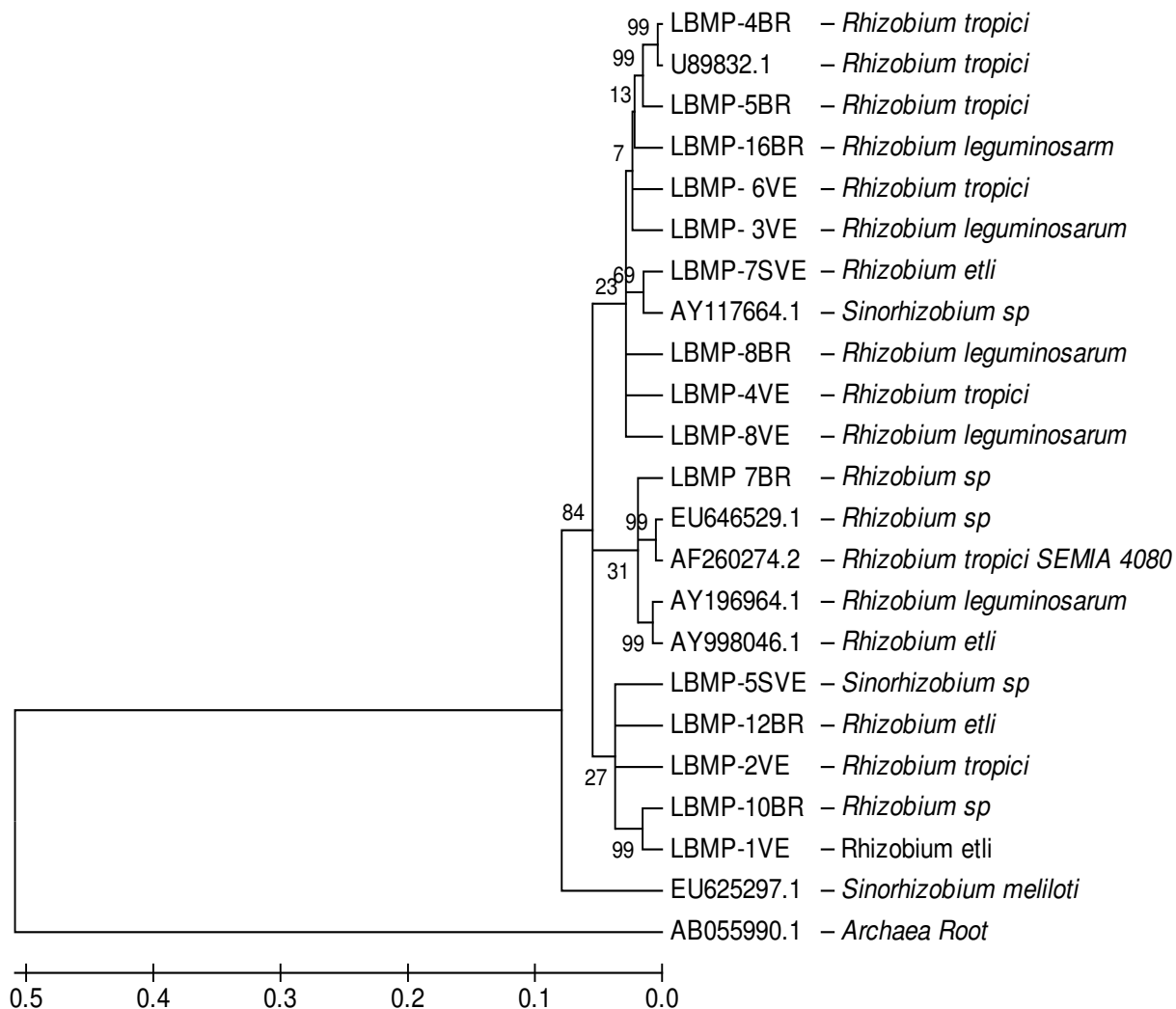
Dentre as três seqüências identificadas como *Rhizobium etli* neste estudo, duas formaram agrupamentos significativos e diferentes, sendo que a LBMP-1VE se agrupou com a LBMP-10BR (*Rhizobium* sp.), e a LBMP-7SVE, com *Sinorhizobium* sp., do banco de dados NCBI.

Entretanto, nenhuma das espécies identificadas como *Rhizobium leguminosarum* formou agrupamento significativo com as seqüências dos organismos incluídos na árvore filogenética (Figura 3).

Considerando que nove das quinze estirpes avaliadas não formaram agrupamentos filogenéticos com “bootstraps” maiores a 60 (Figura 3), pode-se considerar que o seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA foi pouco adequado para o agrupamento filogenético a nível de espécie, das estirpes de *Rhizobium* e *Sinorhizobium* estudadas. Esses resultados coincidem com os reportados por SANTILLANA et al. (2008), que afirmaram que o gene 16S rRNA não é adequado para identificação, a nível de espécie, dentro do gênero *Rhizobium*.

**Tabela 4.** Resultados das seqüências parciais do gene 16S rRNA, dos isolados do Brasil (BR) e da Venezuela (VE), utilizando o programa BLAST-N, comparando com as seqüências depositadas no NCBI.

Isolados	BlastN	% Similaridade
LBMP-4BR	U89832.1 <i>Rhizobium tropici</i> 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	97
LBMP-5BR	EU399920.1 <i>Rhizobium tropici</i> strain CAF279 16S ribosomal RNA gene, partial	97
LBMP-7BR	EU646529.1 <i>Rhizobium sp.</i> PB327_CPI-534 16S ribosomal RNA gene,	96
LBMP-8BR	DQ660317.1 <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii strain V-3 16S ribosomal RNA	97
LBMP-10BR	AY775169.1 <i>Rhizobium sp.</i> CCBAU 65255 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94
LBMP-12BR	EU145979.1 <i>Rhizobium etli</i> strain CCBAU 83475 16S ribosomal RNA gene,	95
LBMP-16BR	DQ660317.1 <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii strain V-3 16S ribosomal RNA	97
LBMP-1VE	AY221176.1 <i>Rhizobium etli</i> EBRI 21 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	94
LBMP-2VE	AF260298.2 <i>Rhizobium tropici</i> strain PRF35 16S ribosomal RNA gene, complete	94
LBMP-3VE	EU618030.1 <i>Rhizobium leguminosarum</i> strain CCBAU 65761 16S ribosomal RNA	97
LBMP-4VE	EU399935.1 <i>Rhizobium tropici</i> strain CAF438 16S ribosomal RNA gene, partial	94
LBMP-5SVE	AY117664.1 <i>Sinorhizobium sp.</i> PRF129 16S ribosomal RNA gene, complete	94
LBMP-6VE	EU399935.1 <i>Rhizobium tropici</i> strain CAF438 16S ribosomal RNA gene,	93
LBMP-7SVE	AY117636.1 <i>Rhizobium etli</i> strain PRF164 16S ribosomal RNA gene, complete	96
LBMP-8VE	AY509900.1 <i>Rhizobium leguminosarum</i> strain ATCC 14480 16S ribosomal RNA	97



**Figura 3.** Árvore filogenética construída pelo método "Neighbour joining" das seqüências parciais do gene 16S rRNA, de espécies de *Rhizobium* isoladas em *Phaseolus vulgaris*, de localidades do Brasil (BR) e da Venezuela (VE). Os números acima dos ramos indicam valores de "bootstrap" de 1000 pseudo-replicações. Todas as seqüências estão numeradas e as seqüências do banco de dados estão indicadas pelo número de acesso no GenBank.



### **4.3. Resultados da avaliação agronômica dos isolados da Venezuela e do Brasil**

Devido à identificação dos isolados pelo seqüenciamento parcial do gene 16S RNA, na seqüência, eles foram considerados estirpes. No experimento de avaliação agronômica das estirpes da Venezuela (Tabela 5), as que proporcionaram os maiores número de nódulos, massa seca de plantas e porcentagem de nitrogênio na parte aérea, foram a LBMP-3VE e a LBMP-4VE, sendo suas respostas estatisticamente iguais à estirpe - padrão PRF-81 (=SEMIA 4080), e superiores à CIAT-899 (=SEMIA 4077).

A ausência de nódulos nas testemunhas não - inoculadas com e sem nitrogênio foi um indicativo de que as condições axênicas foram mantidas ao longo do experimento. Por outro lado, encontrou-se que a resposta da mistura das estirpes comerciais não foi estatisticamente superior à resposta oferecida pela estirpe PRF-81, isoladamente (Tabela 5).

As estirpes do Brasil com as melhores respostas na avaliação agronômica quanto a: número de nódulos, massa seca de plantas e porcentagem de nitrogênio na parte aérea foram às estirpes LBMP-12BR e LBMP-4BR (Tabela 6), com valores estatisticamente equivalentes as estirpes comerciais (CIAT-899 e PRF-81).

Nos experimentos de avaliação agronômica das estirpes, tanto da Venezuela quanto do Brasil, em condições axênicas e ambiente controlado, a mistura das estirpes comerciais CIAT-899 e PRF-81 não ofereceu melhor resposta que as oferecidas pelas estirpes, isoladamente. Esses resultados diferem dos encontrados por HUNGRIA et al. (2000) que observaram que a mistura das mesmas estirpes comerciais nos inoculantes proporcionou resposta positiva à inoculação em condições de campo no Brasil.

**Tabela 5.** Valores médios por planta para número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA) e nitrogênio total da parte aérea (NTPA) em cultivar de feijão Pérola, com estirpes de *Rhizobium*, isoladas da Venezuela (VE).

Tratamentos	NN (Nº)	MSN (mg)	MSPA (mg)	NTPA (mg)
LBMP-1VE	27 b	147 b	1360 c	35,36 c
LBMP-2VE	20 b	152 b	1380 c	38,60 c
LBMP-3VE	37 a	215 a	1903 b	51,38 b
LBMP-4VE	34 a	187 a	1871 b	49,76 b
LBMP-5SVE	18 b	95 c	1090 d	50,22 b
LBMP-6VE	26 b	128 c	1414 c	32,52 c
LBMP-7SVE	16 b	98 c	1118 d	26,83 c
LBMP-8VE	21 b	145 b	1371 c	34,28 c
CIAT-899	25 b	162 a	1400 c	37,80 c
PRF-81	37 a	176 a	1860 b	50,22 b
CIAT-899+PRF-81	28 b	152 b	1442 c	38,64 c
Testemunha SEM N	0*	0*	393 e	07,07 e
Testemunha COM N	0*	0*	2227 a	69,05 a
CV %	12,3	14,2	15,4	13,3

Médias na coluna seguidas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

\*Na análise estatística, não foram considerados os valores desses tratamentos.

As estirpes que ofereceram as melhores respostas, em ambos os experimentos de avaliação agrônômica, foram identificadas pelo seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA, como *Rhizobium tropici*, a LBMP-4VE e a LBMP-4BR; como *R. leguminosarum*, a LBMP-3VE; e como *R. etli*, a LBMP-12BR, mostrando que há variabilidade genética entre as estirpes fixadoras de nitrogênio em simbiose com o feijoeiro. Essas estirpes poderiam representar alternativas biotecnológicas para produção de inoculantes nesta importante cultura.

O tratamento não - inoculado que recebeu 70 kg ha<sup>-1</sup> de nitrogênio via fertirrigação aplicado manualmente (em ambos os experimentos), produziu os maiores valores de massa seca de planta e nitrogênio total, provavelmente devido à eficiência na utilização do nitrogênio, já que as perdas desse nutriente acontecem principalmente por excessos de água de chuva e/ou irrigação que causam lixiviação do adubo (STRALIOTTO et al ., 2002).

#### **4.4. Diversidade genética das estirpes selecionadas, através de ITS (16S-23S rRNA)**

A população estimada de rizóbios nativos do solo Latossolo Vermelho-Escuro variou de  $0,64 \times 10^4$  a  $4,80 \times 10^4$  células por grama de solo. Esses valores assemelham-se aos obtidos por SOARES et al. (2006) em solo ácido de Minas Gerais, onde encontraram uma população de rizóbios considerada por eles como relativamente alta ( $1,4 \times 10^3$  a  $4,2 \times 10^3$  de rizóbios por grama de solo).

Os isolados nativos, provenientes dos nódulos das diluições seriadas do solo Latossolo Vermelho-Escuro, produziram apenas um grupo de morfologia de colônia. Esta apresentou uma coloração amarela, crescimento rápido (três dias), diâmetro da colônia maior de 2 milímetros, alta produção de exopolissacarídeos e alteração ácida do pH do meio de cultura.

**Tabela 6.** Valores médios por planta para número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA) e nitrogênio total da parte aérea (NTPA) em cultivar de feijão Pérola, com estirpes de *Rhizobium*, isoladas do Brasil (BR).

Tratamentos	NN (N°)	MSN (mg)	MSPA (mg)	NTPA (mg)
LBMP-4BR	51 a	213 a	1971 b	51,25 b
LBMP-5BR	30 b	134 b	1503 c	39,60 c
LBMP-7BR	35 b	129 b	1238 c	33,43 c
LBMP-8BR	30 b	145 b	1484 c	31,67 c
LBMP-10BR	18 c	91 c	1213 d	30,35 c
LBMP-12BR	47 a	198 a	2002 b	56,06 b
LBMP-16BR	16 c	98 c	1540 c	32,52 c
CIAT-899	44 a	182 a	1995 b	49,88 b
PRF-81	36 b	176 a	1989 b	51,74 b
CIAT-899+PRF-81	49 a	188 a	2010 b	52,56 b
Testemunha SEM N	0*	0*	270 e	04,86 d
Testemunha COM N	0*	0*	2370 a	68,19 a
CV %	19,4	11,2	17,2	16,7

Médias na coluna seguidas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

\*Na análise estatística, não foram considerados os valores desses tratamentos.

O seqüenciamento do espaço intergênico 16S-23S rRNA permitiu identificar a posição taxonômica do grupo homogêneo de morfologia de colônia (denominado como LBMP solo-BR) e das quatro estirpes avaliadas. Estes resultados coincidem com os reportados por DEPRET et al. (2004), que mencionaram que esse mesmo marcador molecular foi apropriado na identificação de estirpes de *Rhizobium leguminosarum*.

Com base nas seqüências do espaço intergênico submetidas ao banco de dados GenBank, identificou-se que a estirpe nativa LBMP solo-BR (Nº de acesso EU556746) é *Rhizobium* sp., com similaridade de 93% com o acesso AF364839.1, e diferente das estirpes avaliadas neste experimento (Figura 4).

Dentre as quatro estirpes avaliadas a LBMP-4BR (Nº de acesso EU556742) e a LBMP-4VE (Nº de acesso EU556744) foram identificadas como *Rhizobium tropici*, com 93% e 97% de similaridade com os acessos AY491966.1 e DQ682654.1, respectivamente. Entretanto, as estirpes formaram grupos com posições filogenéticas diferentes (Figura 4). A consistência na identificação dessas estirpes como *Rhizobium tropici*, tanto pelo espaço intergênico 16S-23S rRNA, quanto pelo gene 16S rRNA (Figura 3), admite a idéia de que essa espécie parece ser originária de regiões tropicais da América do Sul, como citado por MARTÍNEZ-ROMERO et al. (1991).

A estirpe LBMP-12BR (Nº de acesso EU556745) teve uma similaridade de 96% com o acesso AY491965.1 de *Rhizobium etli*, e a estirpe LBMP-3VE (Nº de acesso EU556743) foi semelhante à *Rhizobium leguminosarum*, com 94% de similaridade com o acesso AY491959.1, porém, na árvore gerada neste estudo, esta última ficou filogeneticamente próxima do *Rhizobium etli* (Figura 4). Esses resultados obtidos, agrupando-se algumas estirpes de *R. leguminosarum* com *R. etli*, confirmam a proximidade entre essas espécies, como citado por SANTILLANA et al. (2008).

Vários autores têm evidenciado que a variabilidade entre espécies que nodulam o feijoeiro, é devida, entre outros fatores, ao tipo de solo e/ou região

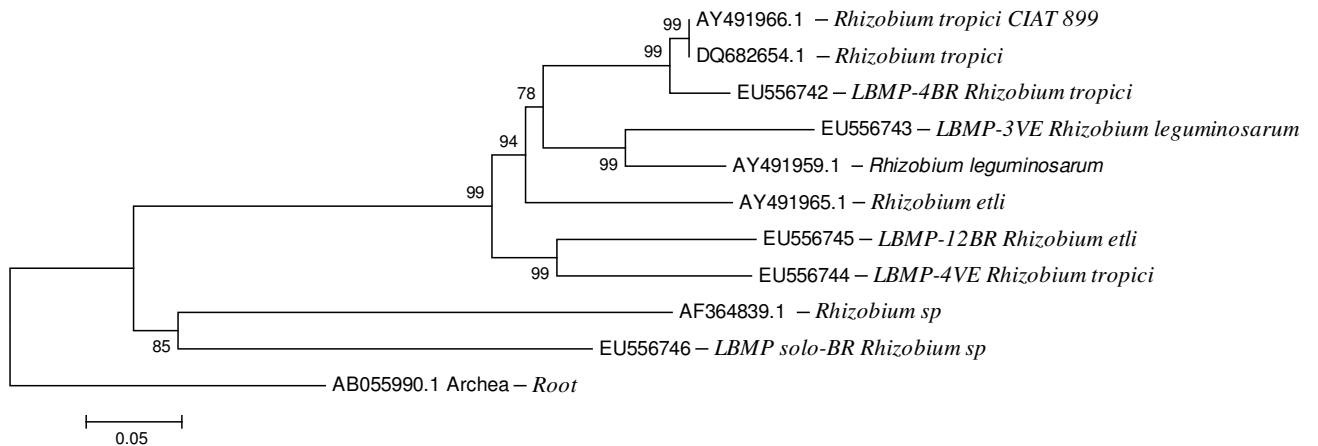
estudada. Nesse contexto, DEPRET et al. (2004) evidenciaram uma diminuição de *Rhizobium leguminosarum* em solo submetido à monocultura de milho. Esses resultados poderiam explicar a presença da espécie *Rhizobium tropici* no solo com monocultura de milho, em plantio direto, utilizada neste estudo (Tabela 2). Por outro lado, os resultados obtidos por ANDRADE et al. (2002), em relação à predominância de *Rhizobium leguminosarum* em solos ácidos que não receberam calagem, coincidem com os encontrados neste estudo em relação à estirpe LBMP-3VE, também isolada de um solo ácido que não recebeu calagem (Tabela 1).

Houve coincidência na identificação das estirpes LBMP-3VE, LBMP-4VE, LBMP-4BR e LBMP-12BR (Figuras 3 e 4), tanto pelo seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA, quanto pelo seqüenciamento do espaço intergênico (16S-23S rRNA), indicando que, ambos os marcadores foram eficientes na identificação/classificação a nível de espécie.

#### **4.5. Produtividade e nodulação, no feijoeiro, das quatro melhores estirpes**

No experimento de produtividade e nodulação conduzido em vasos contendo o solo Latossolo Vermelho-Escuro, as estirpes LBMP-4BR e LBMP-12BR foram tão produtivas e com valores de nitrogênio totais em grãos quanto às estirpes comerciais (CIAT-899 e PRF-81), e suas respostas não foram incrementadas, quando misturadas à estirpe comercial PRF-81 (Tabela 7).

Por outro lado, encontrou-se que a mistura da estirpe LBMP-12BR (*R. etli*) com a PRF-81 (*R. tropici*) produziu um efeito antagônico (Tabela 7). Estes resultados coincidem com os obtidos por HASSAN et al. (2004), os quais evidenciaram que nem sempre a mistura de estirpes nos inoculantes foi tão boa quanto as estirpes de inoculantes, isoladamente. HAFEEZ et al. (2005) apontaram que esse efeito antagônico pode ser devido à produção de bacteriocina, proteínas ou complexo de proteínas com atividade bactericida contra uma das espécies diretamente relacionadas com a bactéria produtora.



**Figura 4.** Árvore filogenética construída pelo método "Neighbour joining" das seqüências completas do espaço intergênico 16S-23S rRNA, de espécies de *Rhizobium* isoladas em *Phaseolus vulgaris*, de localidades do Brasil (BR) e da Venezuela (VE). Os números acima dos ramos indicam valores de "bootstrap" maiores de 75% de 1000 pseudo-replicações. Todas as seqüências estão numeradas e as seqüências do banco de dados estão indicadas pelo número de acesso no GenBank.

Os tratamentos inoculantes que ofereceram os menores valores de produtividade de grãos, nitrogênio total em grãos, número de nódulos e massa da parte aérea seca, foram as estirpes da Venezuela (Tabela 7), sugerindo uma possível instabilidade ambiental dessas estirpes às condições do solo brasileiro estudado, já que uma delas, a LBMP-4VE, embora identificada pelo gene 16S rRNA e o espaço intergênico como *Rhizobium tropici*, não obteve uma resposta positiva, no solo ácido avaliado (pH 5,9), embora MOSTASSO et al. (2002), enfatizassem que estudos com *R. tropici*, em solos ácidos, deviam ser apurados à procura de estirpes eficientes.

A mistura das estirpes comerciais CIAT-899 e PRF-81 não ofereceu melhor resposta que as oferecidas pelas estirpes isoladamente. Esses resultados diferem dos encontrados por HUNGRIA et al. (2000), que observaram que a mistura das mesmas estirpes comerciais nos inoculantes proporcionou resposta positiva à inoculação, no Brasil.

A baixa produtividade de grãos, o pouco acúmulo de nitrogênio em grãos e da massa da parte aérea seca, assim como a pouca nodulação da testemunha sem inoculação e sem nitrogênio (Tabela 7), que mede a resposta da população nativa do solo (identificada como *Rhizobium* sp.), permitem afirmar que essa população foi ineficiente na fixação de nitrogênio, com pouca habilidade para nodular o feijoeiro. Resultados semelhantes foram obtidos por SOARES et al. (2006).



**Tabela 7.** Valores médios por planta para número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA), nitrogênio total da parte aérea (NTPA), produtividade em grãos (RG) e nitrogênio total em grãos (NTG) em cultivar de feijão Pérola, com estirpes de *Rhizobium* em casa de vegetação.

TRATAMENTO	NN planta <sup>-1</sup>	MNS ----- -----	MPAS ----- -----	NTPA ----- -----	PG <sup>(1)</sup> ----- -----	NTG ----- -----
				mg planta <sup>-1</sup>		
1. CIAT 899	95a	223b	4833c	119c	17017b	571b
2. PRF 81	81b	209c	4800c	125c	16140b	507b
3. LBMP-3VE	67c	190c	4433d	114b	14033c	437c
4. LBMP-4VE	63d	190c	4466d	116b	14967c	479c
5. LBMP-4BR	77b	192c	4800c	135c	16567b	545b
6. LBMP-12BR	58d	172c	4733c	134c	15733b	518b
7. CIAT-899 x PRF-81	72c	224b	5200b	145a	18967b	616b
8. LBMP-3VE x PRF-81	68c	195c	4866c	133c	18133b	585b
9. LBMP-4VE x PRF-81	61d	196c	4900c	132c	17867b	570b
10. LBMP-4BR x PRF-81	73c	229a	5600a	151a	19187b	613b
11. LBMP-12BR x PRF-81	47e	149e	4266d	96 d	12667c	405c
12. Testemunha SEM N	30f	33f	1933e	39e	7667 d	231d
13. Testemunha COM N	11g	21g	5533 a	148a	23333a	799a
CV( %)	15,71	16,15	12,35	11,2	9,16	10,47

Médias na coluna seguidas por letras iguais não diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott.

<sup>(1)</sup> Produtividade em grãos, com a umidade corrigida para 13%.

A testemunha, com  $70 \text{ kg ha}^{-1}$  de nitrogênio, inibiu a nodulação, tendo em vista que este tratamento apresentou os menores números e massa de nódulos secos (Tabela 7). Esses resultados coincidem com os encontrados por SOARES et al. (2006). No entanto, este tratamento ofereceu a maior produtividade, provavelmente devido à eficiência na utilização do nitrogênio, já que as perdas de nitrogênio acontecem principalmente por excessos de água de chuva e/ou irrigação, que causam lixiviação do adubo (STRALIOTTO et al ., 2002), e neste estudo empregou-se um sistema eficiente de irrigação por gotejamento.

## 5. CONCLUSÕES

A análise dos resultados permitiu as seguintes conclusões:

1. O seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA permitiu afirmar que a maioria das estirpes avaliadas pertence ao gênero *Rhizobium* e somente uma delas ao gênero *Sinorhizobium*.
2. As espécies *Rhizobium tropici*, *R. leguminosarum* e *R. etli* foram encontradas tanto nos isolados do Brasil quanto da Venezuela.
3. A espécie *Rhizobium* sp. foi identificada somente nos isolados do Brasil, entretanto *Sinorhizobium* sp. esteve presente apenas entre os isolados da Venezuela.
4. Tanto o seqüenciamento parcial do gene 16S rRNA quanto o seqüenciamento total do espaço intergênico (16S-23S rRNA) foram pertinentes na identificação das estirpes LBMP-3VE, LBMP-4VE, LBMP-4BR e LBMP-12BR a nível de espécies neste estudo.
5. Há estirpes promissoras, como a LBMP-4BR e a LBMP-12BR, que mostraram resposta diferencial quando misturadas nos inoculantes.
6. As estirpes comerciais CIAT-899 e PRF-81 foram produtivas e a mistura delas não incrementou a produtividade.
7. A população nativa do solo Latossolo Vermelho-Escuro estudado pertence a espécie *Rhizobium* sp. e mostrou-se ineficiente na fixação de nitrogênio.

## 6. REFERÊNCIAS

- AGUILAR, O. M.; LOPEZ, M. V.; RICCILLO, P. M.; GONZÁLEZ, R. A.; PAGANO, M.; GRASSO, D. H.; PUHLER, A.; FAVELUKES, G. Prevalence of the *Rhizobium etli*-like allele in genes coding for 16S rRNA among the indigenous rhizobial populations found associated with wild beans from the southern Andes in Argentina. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 9, p. 3520–3524, 1998.
- AIDAR, H.; KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L. F. **Produção do feijoeiro comum em várzeas tropicais**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2002. 305 p.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped blast and psi-blast: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.25, p.3389-3402, 1997.
- AMARGER, N.; BOURS, M.; REVOY, F.; ALLARD, M. R.; LAGUERRE, G. *Rhizobium tropici* nodulates field-grown *Phaseolus vulgaris* in France. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 161, p.147–156, 1994.
- AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 47, p. 996–1006, 1997.
- AMARGER, N. Rhizobia in the Field. **Advances in Agronomy**, Newark, Chapter 4, v. 73, p. 109-165, 2001.
- AMBROSANO, E. J.; TRIVELIN, P. C. O.; MURAOKA, E. T. Técnica para marcação dos adubos verdes *Crotalária júncea* e *Mucuna-preta* Com <sup>15</sup>N para Estudos de dinâmica do nitrogênio. **Bragantia**, Campinas. v. 56, n. 1, p. 1-5, 1997.

- ANDRADE, D. S.; MURPHY, P. J.; GILLER, K. E. Diversity of *Phaseolus*-Nodulating rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v, 68, n. 8, p. 4025–4034, 2002.
- AYANABA, A.; LAWSON, T. L. Diurnal changes in acetylene reduction in field-grown cowpeas and soybeans. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 9, p. 125-129, 1977.
- BANFALVI, Z.; SAKANYAN, V.; KONCZ, C.; DUSHA, I.; KONDOROSI, A. Location of nodulation and nitrogen fixation genes on a high molecular weight plasmid of *Rhizobium meliloti*. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v.184, p. 318-325, 1981.
- BERGEYS'S manual of systematic bacteriology, 2<sup>nd</sup>. Ed. New York, **Springer**, 2005. v. 2. 1388p.
- BERINGER, J. E. R. Factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 84, p, 188-198, 1974.
- BODDEY, R. M.; CHALK, P. M.; VICTORIA, R.; MATSUI, K. The <sup>15</sup>N-isotope dilution technique applied to the estimation of biological nitrogen fixation associated with *Paspalum notatum* cv. Batatais in the field. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 15, n. 3, p. 25-32, 1983.
- BOTTOMLEY, P. Ecology of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, In: STACEY, G.; BURRIS, R. H. (Ed.), **Biological nitrogen fixation**, New York: Chapman & Hall, 1991, p. 292–347.
- BURRIS, R. H. Advances in biological nitrogen fixation. **Journal of Industrial of Microbiology & Biotechnology**, Reading, v. 22, p.381-393, 1999.
- CASTELLANE, T. C.; LEMOS, E.G. Composição de exopolissacarídeos produzidos por estirpes de rizóbios cultivados em diferentes fontes de carbono. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília v. 42, n. 10, p. 1503-1506, 2007.
- CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E.; MOSTASSO, F. L.; CAMPO, R. J.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no seqüenciamento

do gene 16S rRNA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 27, n. 5, p. 833–840, 2003.

COENYE, T.; GEVERS, D.; VAN DE PEER, Y.; VANDAMME, P.; SWINGS, J. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. **FEMS Microbiology Review**, Amsterdam, v.29, p.147-167, 2005.

CRAWFORD, N.M.; GLASS, A. D. M. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. **Trends Plant Science**, London, v.3, p.389-395, 1998.

DANSO, S. K. A. Methods of estimating biological nitrogen fixation. In: SALI, H.S.; KEYA, S.O. (Ed.). **Biological nitrogen fixation in Africa**, Nairobi, 1985. p. 224-244.

DEPRET, G.; HOUOT, S.; ALLARD, M. R.; BREUIL, M. C.; NOUAÏM, R., LAGUERRE, G. Long-term effects of crop management on *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam. 51, p. 87-97, 2004.

DIOUF, A., P.; DE LAJUDIE, M.; NEYRA, K.; KERSTERS, M.; GILLIS, E.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; GUEYE, M. Polyphasic characterization of rhizobia that nodulate *Phaseolus vulgaris* in West Africa (Senegal and Gambia). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 50, p.159–170, 2000.

EARDLY, B. D.; WANG, F. S.; WHITTAM, T. S.; SELANDER, R. K. Species limits in *Rhizobium* populations that nodulate the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 507–512, 1995.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Procedimento para coleta de amostra de solos. **Ministério de agricultura pecuária e desenvolvimento, EMBRAPA Agrobiologia**. 2005.

[http://www.cnpab.embrapa.br/servicos/analise\\_solos\\_coleta.html](http://www.cnpab.embrapa.br/servicos/analise_solos_coleta.html)

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Annual Statistics 2008. Disponível em: [www.fao.org/statistics](http://www.fao.org/statistics). Acesso em: 10 de março de 2008.

- FERNANDES, M.; FERNANDES, R.; 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.
- FERNÁNDEZ, F.; GEPTS, P.; LÓPEZ, M. Etapas de desarrollo en la planta de frijol. In: LÓPEZ, M.; FERNÁNDEZ, F.; SCHOONHOVEN, A. VAN. **Frijol: investigación y producción**. Cali, CIAT, 1985. p. 61-78.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR**: sistema de análise de variância para dados balanceados, versão 4.0. Lavras: DEX/UFLA, 1999. Software estatístico.
- FERREIRA, A. N.; CARVALHO, M. A. C.; ARAÚJO, B. R. S.; SÁ, M. E.; BUZETTI, S. Estirpes de *Rhizobium tropici* na inoculação do feijoeiro. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 3, p. 507-512, 2000.
- FERREIRA, M. C.; HUNGRIA, M. Recovery of soybean inoculant strains from uncropped soils in Brazil. **Field Crops Research**, Reading, v.79, p. 139–152, 2002.
- GARCÍA DE LOS SANTOS, A. D.; BROM, S.; ROMERO, D. *Rhizobium* plasmids. In bacteria-legume interactions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Netherlands, v. 12, p. 119-125, 1996.
- GIBSON, A. H. Evaluation of nitrogen fixation by legumes in the greenhouse and growth chamber. In: ELKAN, G.H. **Symbiotic nitrogen fixation technology**. New York: Marcel Dekker, 1987. p. 321-369.
- GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, Toronto, n.8, p.195-202, 1998.
- GRANGE, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 36, p. 1389–1398, 2004.
- GRANGE, L. B.; HUNGRIA, M.; GRAHAMC, P. H.; MARTINEZ-ROMERO, E. New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 39, p. 867–876, 2007.

- HAFEEZ, F. Y.; NAEEM, F. I.; NAEEM, R.; ZAIDI, A. H.; MALIK, K. A. Symbiotic effectiveness and bacteriocin production by *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolated from agriculture soils in Faisalabad. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v.54, n. 2, p. 142–147, 2005.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, Oxford, v. 41, p.95–98, 1999.
- HARDY, R. W. F.; HOLSTEN, R. D.; JACKSON, E. K.; BURNS, R. C. The C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> - C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> assay for N<sub>2</sub> fixation: Laboratory and field evaluation. **Plant Physiology**, Rockville, v.43, p. 1185-1207, 1968.
- HASSAN, M.; WAFAA, M. A.; DESSOUKY, A. Performance of *Phaseolus* bean *rhizobia* in soils from the major production sites in the Nile Delta. **C. R. Biologies**, Paris, v. 327, p. 445–453, 2004.
- HERRERA-CERVERA, J. A.; CABALLERO-MELLADO, E.; LAGUERRE, G.; TICHY, H. V.; REQUENA, N.; AMARGER, N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; OLIVARES, J.; SAN JUAN. J. At least five rhizobial species nodulate *Phaseolus vulgaris* in a Spanish soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 30, p. 87–97, 1999.
- HOOYKAAS, P. J. P.; VAN BRUSSEL, A. N. N.; DENDULK-RAS, H.; VAN SLOGTEREN, G. M. S.; SCHILPEROORT, R. A. Sym plasmid of *Rhizobium trifolii* expressed in different rhizobial species and *Agrobacterium tumefaciens*, **Nature**, London, v. 291, p.351-353, 1981.
- HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. EMBRAPA, Brasília, 1994, 525p.
- HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CHUEIRE, L. M. O.; PROBANZA, A.; GUTTIERREZ-MANERO, F. J.; MEGÍAS, M., Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) *rhizobia* from Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 32, p. 1515–1528, 2000.



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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Estatísticas leguminosas. 2006/2007. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em 20 de julho de 2008.

JORDAN, D. C. Family III. *Rhizobiaceae*. Genus I. *Rhizobium* Frank 1889, 338AL. In KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.), **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore, Williams & Wilkins, 1984. v.1, p. 235-242.

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CAMPO, R.J. A. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. **Applied Soil Ecology**, Washington, v. 32, n. 2, p. 210–220, 2006.

KUMAR, S.; TAMURA, K.; JAKOBSEN, I. B.; NEI, M. Mega2: molecular evolutionary genetics analysis software. **Bioinformatics**, Oxford, v.17, n.12, p. 1244-1245, 2001.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Phylogenetic relationships among yeasts of the “*Sacharomyces* complex” determined from multigene sequence analyses. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 3, p.417-432, 2003.

LAGUERRE, G.; MAVINGUI, P.; ALLARD, M. R.; CHARNAY, M. P.; LOUVRIER, P.; MAZURIER, S. I.; RIGOTTIER-GOIS, L.; AMARGER, N. Typing of rhizobia by PCR-DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: Application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, n. 6, p. 2029-2036, 1996.

LIRA, M. A.; LIMA, A. S. T.; ARRUDA, J. R. F.; SMITH, D. L. Effect of root temperature on nodule development of bean, lentil and pea. **Soil & Biochemistry**, Amsterdam, v. 37, p. 235-239, 2005.

LÓPEZ-HERNÁNDEZ, D.; GARCÍA-GUADILLA, M. P.; TORRES, F.; CHACÓN, P.; PAOLETTI, M. G. Identification, characterization and preliminar evaluation of

Venezuelan Amazonian production systems in Puerto Ayacucho savanna-forest ecotone. **Interciencia**, Caracas, v.22, n. 6, p. 1-7, 1997.

MARTINEZ, E.; PRADO, M.; PALÁCIOS, R.; CEVAKKOS, M. A. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. **Journal of General Microbiology**, Reading, v. 139, p. 1779-1786, 1985.

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

MATHESIUS, U. Conservation and divergence of signalling pathways between roots and soil microbes – the *Rhizobium*-legume symbiosis compared to the development of lateral roots, mycorrhizal interactions and nematode-induced galls, **Plant and Soil**, The Hague, v. 255, p.105-119, 2003.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; BANGEL, E. V.; HESS, P. N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, Reading, v. 26, p.315-322, 2006.

MERCANTE, F. M.; GOI, S. R.; FRANCO, A. A. Importância dos compostos fenólicos nas interações entre espécies leguminosas e rizobio. **Revista Universidade Rural**, Rio de Janeiro, v. 22, n.1, p. 65-81, 2002.

MHAMDI, R. ; LAGUERRE, G. ; AOUANI, M. E. ; MARS, M. ; AMARGER, N. Different species and symbiotic genotypes of field rhizobia can nodulate *Phaseolus vulgaris* in Tunisian soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.41, p. 77–84, 2002.

MOHR, R. M.; MARTIN, H. E.; JANZEN, H. H.; BULLIED, J. W. Plant-Available Nitrogen Supply as Affected by Method and Timing of Alfalfa Termination. **Agronomy Journal**, Madison, v. 91, p. 622–630, 1999.

- MOSTASSO, L.; MOSTASSO, F. L.; DIAS, B. G.; VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, Berlin, v. 73, n. 2, p. 121–132, 2002.
- OLIVEIRA, I. P.; FAGERIA, N. K.; THUNG, M. Adubos corretivos e de manutenção. In: AIDAR, H.; KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L.F. (Ed.). **Produção do feijoeiro comum em várzeas tropicais**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2002. p.170-188.
- ORTEGA, S. I.; BARRIOS, A. G.; TESARA, J. Montalban: nueva variedad de caraota negra (*phaseolus vulgaris* L.). **Agronomía Tropical**. Maracay, v. 37, n. 2, p. 117-120, 1987.
- PINTO, F. G. S.; HUNGRIA, M.; MERCANTE, F. M. Polyphasic characterization of Brazilian Rhizobium tropici strains effective in fixing N<sub>2</sub> with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Soil Biology & Biochemistry**, Elmsford, v. 39, p. 1851–1864, 2007.
- PLACENCIO, M. D.; MORA-NUNEZ, O. Búsqueda de genotipos de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) con resistencia al Quail pea mosaic virus. **Revista de la Facultad Agronomia**, Maracay, v.19, n.1, p. 201-209, 2002.
- RAPOSEIRAS, R.; PINTO, P. P.; PASSOS, R. V. M.; SELDIN, L.; PAIVA, E.; SCOTTI, M. R.; NADJA, SÁ, N. M. H. Variability of isolated colonies in bean nodulating *Rhizobium* strains before and after exposure to high temperature. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, p. 149-154, 2002.
- RAPOSEIRAS, R.; MARRIEL, I. E.; MUZZI, M. R.; PAIVA, E.; PEREIRA, I. A.; CARVALHAIS, L.; PASSOS, R. V.; PEREIRA, P.; HORTA, N. M. *Rhizobium* strains competitiveness on bean nodulation in Cerrado soils **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.3, p.439-447, 2006.
- SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 545p.
- SANTILLANA, N.; RAMÍREZ-BAHENA, M. H.; GARCÍA-FRAILE, P.; VELÁZQUEZ, E.; ZÚÑIGA, D. Phylogenetic diversity based on rrs, atpD, recA genes and 16S–23S intergenic sequence analyses of rhizobial strains isolated from *Vicia faba* and

- Pisum sativum* in Peru. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 189, p. 239–247, 2008.
- SAWADA, H.; KWYKENDALL, L. D.; YOUNG, J. M. Changing concepts in the Systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. **Journal of Genetic and Applied Microbiology**, Washington, v. 49, p. 155-179, 2003.
- SEGOVIA, L.; YOUNG, J. P.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v. 43, n.2, p. 374–377, 1993.
- SESSITSCH, A.; RAMÍREZ-SAAD, H.; HARDARSON, G.; AKKERMANS, A. D.; DE VOS, W. M. Classification of Austrian rhizobia and the Mexican isolate FL27 obtained from *Phaseolus vulgaris* L. as *Rhizobium gallicum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v. 47, n. 3, p.1097–1101, 1997.
- SICHRITZ-PONTEN, T.; ANDERSSON, S. G. A phylogenomic approach to microbial evolution. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.29, n.22, p.545-552, 2001.
- SCHMIDT, T. Fingerprinting bacterial genomes using ribosomal RNA genes and operons. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, Berlin, v. 5, p. 3-12, 1994.
- SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. reimp. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa - UFV, 2006. 235p.
- SOARES, A. L.; FERREIRA, P. A.; ANDRADE, J. P.; HELSON MÁRIO MARTINS, H. M.; SILVA, A.; MESSIAS JOSÉ BASTOS, M. J.; MOREIRA, F. M. S. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e Diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). II–feijoeiro **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, p.803-811, 2006.
- SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. J. **Handbook for rhizobia: Methods in legume Rhizobium technology**. Paia: Niftal Project, 1994. 450p.
- STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N. G. Biodiversidade do rizóbio que nodula o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e os principais fatores que afetam a simbiose. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1999. 51p. (Documentos, 94).

- STRALIOTTO, R.; TEIXEIRA, M. G.; MERCANTE, F. M. Fixação biológica de nitrogênio. In: AIDAR, H.; KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L. F. (Ed.). **Produção do feijoeiro comum em várzeas tropicais**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2002. p.124-153.
- TAÍZ, L.; ZIEGER, E. Fisiologia vegetal. 3 ed., Porto Alegre: Artemed, 2004, p.719.
- THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research, Oxford**, v. 25, n. 19, p. 4876-4882, 1997.
- VAN BERKUN, P.; FUHRMANN, J. J.; EARDLY, B.D. Phylogeny of Rhizobia. In: PEDROSA, F.O.; HUNGRIA, M.; YATES, G.; NEWTON, W.E. **Nitrogen fixation: from molecules to crop productivity**. Foz do Iguaçu: Kluwer Academic Publishers, 2000. p 3-8.
- VAN DEN EEDE, G.; DREYFUS, B.; GOETHALS, K.; VAN MONTAGU, M.; HOLSTERS, M. Identification and cloning of nodulation genes from the stem-nodulating bacterium ORS571. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 206, p. 291-299, 1987.
- VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Biologia dos solos dos cerrado. Planaltina: EMBRAPACPAC. 1997. 524p.
- VAUGHN, C. E.; JONES, M. B. Nitrogen fixation by intact annual rangeland species in soil. **Agronomy Journal**, Madison, v. 68, p. 561-564, 1976.
- VINCENT, J. M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 164 p. (International Biological Programme Handbook, 15).
- VOGELS, C. D.; VANDER DRIFT, C. Differential analysis of glyoxylate derivatives. **Analytical Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 143-157, 1970.
- WOESE, C.R. Interpreting the universal phylogenetic tree. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Maryland, v. 97, n.22, p.8392–8396, 2000.

- YOKOYAMA, L. P.; DEL PELOSO, M. J.; DI STEFANO, J. G.; YOKOYAMA, M. Nível de aceitabilidade da cultivar de feijão “Pérola”: avaliação preliminar. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 1999. 20p. (Documentos, 98).
- YOUNG J. M.; KUYKENDALL, L. D.; MARTINEZ-ROMERO E.; KERR, A.; SAWADA, H. A Revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. **International Journal Systematic Bacteriology**, Reading, v. 51, p. 89–103, 2001.
- YOUNG, E. G.; CONWAY, C. F. On the estimation of allantoin by the Rimini Schryver reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 142, p. 839-853, 1942.
- YOUNG J. M. Renaming of *Agrobacterium larrymoorei* Bouzar and Jones 2001 as *Rhizobium larrymoorei* (Bouzar and Jones 2001) comb. nov. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 149-150, 2004.
- YOUNG, M.; PARK, D.; WEIR, S. Diversity of 16S rDNA sequences of *Rhizobium spp.* Implications for species determinations. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 238, p. 125–131, 2004.
- ZAHRAN, N. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. **Microbiology and Molecular Reviews**, Reading, p. 968-989, 1999.
- ZAKHIA, F.; LAJUDIE, P. Taxonomy of Rhizobia. **Agronomie**, Oxford, v. 21, n. 6, p. 569–576, 2001.

## 7. APÊNDICE

## APÉNDICE A

REPUBLICA DE VENEZUELA

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y CRÍA  
MINISTRY OF AGRICULTURECERTIFICADO FITOSANITARIO  
PHYTOSANITARY CERTIFICATESERVICIO AUTÓNOMO DE SANIDAD AGROPECUARIA  
SANITARY SERVICE OF AGRICULTUREDirección de Sanidad Vegetal  
Department of Plant Health

Nº 17572

Organización de Protección Fitosanitaria  
Plant Protection OrganizationA : Organización de Protección Fitosanitaria  
To : Plant Protection Organization

De (of) VENEZUELA

De (of) Brasil

FORMA 09-005

DESCRIPCION DEL ENVIO - DESCRIPTION OF CONSIGNMENT		
Nombre y Dirección del Exportador - Name and Address of Exporter <b>Tehuni Orlando Gonzalez</b> <b>Urb. Ana Bella III, piso 5 PH. Calle 11 Urb. La Soledad, Maracay Edo. Aragua Venezuela</b>		
Nombre y Dirección Declarados del Destinatario - Declared Name and Address of Consignee <b>Tehuni Orlando Gonzalez</b> <b>Conj.Residencial Vila Nova, Edif. 1, Apto 4. Jardin Nova Aparecida, Jaboticabal, Sao Paulo Brasil.</b>		
Número y Descripción de los bultos - Number and Description of Packages <b>1 (uno) bulto</b> <b>Compuesto de 21 tubos Falcon con muestras de nódulos en carotas (P.vulgaris)</b>		Marcas Distintivas - Distinguishing Marks
Lugar de Origen - Place of Origin <b>Facultad de Agronomía, U.C.V. Maracay, Aragua</b>	Medios de Transporte Declarados - Declared Means of Conveyance <b>Aéreo</b>	Punto de Entrada Declarado - Declared Point of Entry <b>Guarulhos, Sao Paulo Brasil</b>
Cantidad Declarada y Nombre del Producto - Name of Produce and Quantity Declared <b>1 (uno) bulto contentivo de 21 tubos Falcon con nódulos extraídos de raíces de carota (Phaseolus vulgaris)</b>		Nombre Botánico de las Plantas - Botanical Name of Plants <b>Phaseolus vulgaris</b>

<ul style="list-style-type: none"> <li>Por la presente se certifica que las plantas o productos vegetales descritos más arriba se han inspeccionado de acuerdo con los procedimientos adecuados y se considera exentos de plagas de cuarentena, y prácticamente exentos de otras plagas nocivas; y que se considera que se ajustan a las disposiciones fitosanitarias vigentes en el país importador</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>This is to certify that plants or plant products described above have been inspected according to appropriate procedures and are considered to be free from quarantine pests, and practically free from other injurious pests; and that they considered to conform with the current phytosanitary regulations of the importing country</li> </ul>
---	--

TRATAMIENTO DE DESINFESTACION O DESINFECCION - DISINFESTATION AND/OR DISINFECTION TREATMENT		
Fecha - Date <b>29-12-2005</b>	Tratamiento - Treatment <b>Etanol 99% durante 1 min, agua destilada, hipoclorito de sodio 1%, agua destilada, solución de glicerina al 40%, autoclave</b>	
Producto químico (ingrediente activo) Chemical (active ingredient) <b>Etanol, Hipoclorito de sodio y Glicerina</b>	Concentración - Concentration <b>99%, 1 % y 40 % respectivamente.</b>	Duración y Temperatura - Duration and Temperature <b>Aproximadamente 10 minutos a 28 °C.</b>
Información adicional - Additional Information <b>Los nódulos deberán mantenerse refrigerados a temperatura de nevera.</b>		
Sello - Seal	DECLARACION SUPLEMENTARIA - ADDITIONAL DECLARATION <b>A los nódulos de carota (P Vulgaris) contenidos dentro de tubos plásticos transparentes, no se les detectó flujo bacteriano, ni micelios de hongos y además están libres de insectos y otras plagas, según análisis de laboratorio anexo</b>	
Lugar de Expedición - Place of Issue <b>Maracay, Edo. Aragua, Venezuela</b>	Nombre del Funcionario Autorizado - Name of Authorized Officer <b>ING AGR. Juan Carlos Antolini</b>	
Fecha - Date <b>03-01-2006</b>	Firma - Signature 	

- El Servicio Autónomo de Sanidad Agropecuaria (S.A.S.A.) y sus funcionarios y representantes declinan toda responsabilidad financiera resultante de este certificado
- No financial liability shall attached to the Servicio Autónomo de Sanidad Agropecuaria or to any officers or representative with respect of this certificate



## APÊNDICE B

Seqüências “Forward” (FD1) do gene 16S rRNA de 15 estirpes provenientes do Brasil (BR) e Venezuela. Obtidas com um seqüenciador de DNA ABI 3700, no LBMP da UNESP Jaboticabal.

### >LBMP\_4BR\_*Rhizobium\_tropicum*

TAACACACGCTGGTCGGCAGGCTTACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTA  
ACGCGTGGGAATCTACCTTTTGTACGGAATAACGCAGGGAACTTGTGCTAATACCGGAACTTGTGCTAAT  
ACCGTATGTGTCTTTCGGGAGAAAGATTTATCGGCAAGAGATGAGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGG  
TAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCATCCACATTGGGACTGAGACACGGC  
CCAACTCCTATCGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAACCATAACCGCGT  
GAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTACCAGGAGAAGATAATGACGGTATCCGGAGAAGAAGCC  
CGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGC  
GCACGTAGGCGGATCGATCAGTCAGGGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCCTGGAAGTGCCTTTGATACTGTCTGA  
TCTGGAGTATGGAAGAGGTGAGTGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAG  
TGGCGAAGGCGGCTCACTGGTCCATTACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATA  
CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGTTAGCCGTCG

### >LBMP\_5BR\_*Rhizobium\_tropicum*

GCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCTTTTGTACGGAATAACGCAGGGAACTT  
GTGCTAATACCGTATGTGTCTTTCGGGAGAAAGATTTATCGGCAAGAGATGAGCCCGCGTTGGATTGGCTAGT  
TGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGA  
GACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCAAACCAT  
GCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTACCAGGAGAAGATAATGACGGTATCCGGAGAA  
GAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGTTTTACTGGGC  
GTAAAGCGCACGTAGGCGGATCGATAATGCAGGGGTGAAATCCCACCATTCAACCCTGGAAGTGGGTAAGATA  
CTGTGCATCTGGAGTATGGAAGAGGTGAGTGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTCGGAGGA  
ACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGTCCATTACTG

### >LBMP\_7BR\_*Rhizobium\_sp*

TATGTGTCTTTCGGGAGAAAGATTTATCGGTCAGGATGAGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAA  
GGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAA  
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTG  
ACCCGGGGGTAGGGTTGTAAAGCTCTTTACCAGGAGAAGATAATGACGGTATNCGGAGAAGAAGCCCCGGCTA  
ACTTNGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGGGAAGCGCACGT  
AGGCGGATCGATCAGTCAGGGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCCTGGAAGTGCCTTAAATACTNTCGATCTGGA  
GTATGGAAGAGGTGAGTGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAATTCGTAGAGCGCGCGGAGGAACACCAG

### >LBMP\_8BR\_*Rhizobium\_leguminosarum*

AACGAACGCTGGCGGCAGGCTTAAACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAA  
CGCGTGGGAATCTACCCTTGACTACGGAATAACGCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATGTGTCTTTCGGGA  
GAAAGATTTATCGGCCAGGATGAGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGAC  
GATAAATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCA  
GCAGTGGGGAACCTTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCGGGGGT  
TGTAAGCTCTTTACCAGGAGAAGATAATGACGGTATCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGTTG  
CCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATCGATCAG  
TCAGNGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCCTGGAAGTGCCTTTGATANCTGTGCATCTGGAGTATGGAAGAGGTG  
AGTGAATTCCGAGTGTAGAGGTGAAAACCTGCAAT

### >LBMP\_10BR\_*Rhizobium\_sp*

CGCCCCCAGGAAAAACGGCCGGACGGGTGAGTATGCGCACTGGCAACGTACCTTGGGTAGGGAATAACGCA  
GGGAACTTGTGCTAATACCGTATGTGCCCTTTCGGGGAAAAATTTATCGGGTAAAGGATCGGCCCGCGTTGG  
ATTACCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAACCACA  
TTGGGACTGANACACGGCCCGGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCT

GATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGAAAAGATAATGACGG  
 TATCCGGAAAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGG  
 AATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATCGATCAGTCAGGGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCCTGGGAA  
 CTGCCTTTGATACTGTGCATCTGGAGTATGGAAAAGGTGAGTGGAAACCCCAAGTGTAAAGGTTAAATTCGTA  
 AATTTCCGGAGGGAACACCAGGGGGGAAGGCGGCTCACTGGTTCCATTACTGACGCTTAGGTGCGAAAGCGT  
 GGGGAACAACCAGGATTTTATCCCCGGGTATCCACCCCTTAACAATTAATTGTTTTCC

**>LBMP\_12BR\_Rhizobium\_etli**

CCCCGCCCTTGAGCGGATGAGCCCCGCCCTTTCAGGTTTGGGGATCCTGCAGCGGCGAGGGCGCCCTCCAAG  
 GAGAAGCGGGCCACGGGTGAATATCGCGTGGGAACGTACCCTTGGCCTACCCAATAACGCAGGGAAACTTGTG  
 CTAATACCGTATGTGCCCTTCCCCGAAAGACCTATCGGGTAAAGGATCGGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTG  
 GTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAAA  
 CACGGCCCGNACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGC  
 CGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGAGAAGATAATGACGGTATCCGGAGAAGA  
 AGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGT  
 AAAGCGCACGTAGGCGGATCGATCAGTCAGGGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCCTGGAAGTGCCTTTGATACT  
 GTCGATCTGGAGTATGGAAGAGGTGAGTGGAAATTCGAGTGTAAAGGTGAAATTCGTAATTTCCGGAGGAAC  
 ACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGTCCATTACTGACCCTGAG

**>LBMP\_16BR\_Rhizobium\_leguminosarum**

GCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGNAACCGGTGGGAAT  
 CTACCCTTGACTACGAATAACGCAGGGAAACTTGTGCTAATACCGTATGTGTCCTTCGGGAGAAAGATTTAT  
 CGGTCAAGGATGAGGGCCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTG  
 GTCTGAGAGGATGATCAGCCACNTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT  
 AAAGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTT  
 TCACCGGAGAAGATAATGACGGTATCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTACCAGCAGGGGCGGTAATAC  
 GAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGNGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATCGATCAGTCAGGGGTGAAA  
 TCCCAGGGCTCAACCCTGGAAGTGCCTTTGATACTGTGATCTGGAGAATGGAAGAGGTGAGTGGAAATCCGA  
 GTGTAGACGTGAAATTCGTAGATATTCCGAGGAACACCAGTGNCGAAGGCGGCTCACTCCTCCATTACTGACG

**>LBMP\_1VE\_Rhizobium\_etli**

TGCGCACTGGCAACGTACCTTGGGTAGGGAATAACGCAGGGAAACTTGTGCTAATACCGTATGTGCCCTTCGG  
 GGGAAAGATTTATCNGGTAAAGGATCGGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGC  
 GACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCACCACATTGGGACTGACACACGGCCCGGGACTCCTACGGGA  
 GGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTA  
 GGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGAGAAGATAATGACGGTATCCGGACAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCA  
 GCAGCCCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTGCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATCGA  
 TCAGTCAGGGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCCTGGGAAGTGCCTTTGATACTGTGATCTGGAGTATGGAAA  
 GGTGAGTGGAAAGGCCCGAGTGTAAAGGTTAAATTCGTAATTTCCGGAGGGAACACCAGGATTGGATCCCCGGATATCCAG  
 CACTGGTGCATTACTGACGCTAAGGTGCGAAAGCGTGGGGAACAACCAGGATTGGATCCCCGGATATCCAGC  
 CCATAACGATAA

**>LBMP\_2VE\_Rhizobium\_tropicum**

CTTTACCTTCAAAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAATGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGT  
 GGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCCCCTTTACCTTCAAAGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAA  
 AGCTCTTTCACCGGAGAAGATAATGACGGTATCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCG  
 GTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATCGATCAGTCAGG  
 GGTGAAATCCCAGGGCTCAACCCTGGAAGTGCCTTTGATACTGTGATCTGGGAGTATGGAAAAAGGTGAGTG  
 GAATCCGAGTGTAAAGGTTAAATTCGTAATTTCCGAGGAACACCAGTGGGGAAGGCGGCTCACTGGTCC  
 ATTACTGACGCTTAGGGTGGGAAAGCCTGGGAGCAAAACAGGATTTAATACCCTGGTTATTCCACACCCGTTA  
 AACAATTAATGTTTTCCCCGTCCGGGCATT

**>LBMP\_3VE\_Rhizobium\_leguminosarum**

TGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCCTTGACTACGGA  
 ATAACGCAGGGAAACTTGTGCTAATACCGTATGTGTCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGTCAAGGATGAGCCC  
 GCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATC  
 AGCCCCGGGTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGNTATTGGACAATGGGCGC  
 AAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGAGAAGATAA

TGACGGTATCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTT  
 GTTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCCGGATCGATCAGTCAGGGGTGCCCGGCCAGGGNTCAACCC  
 TGGAAGTGCCTTTGATACTGTGGAAGTGGAGTATGGAAGAGGTGAGTGAATTCAGTGTAGAGGTGAAATT  
 CGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGC

**>LBMP-4VE\_Rhizobium\_tropic**

TAACACACGCTGGTCGGCAGGCTTACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTA  
 ACGCGTGGGAATCTACCTTTTGTACGGAATAACGCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATGTGTCTTCGGG  
 AGAAAGATTTATCGGCAAGAGATGAGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGA  
 CGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGC  
 AGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGG  
 TTGTAAAGCTCTTTCACCGGAGAAGATAATGACGGTATCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCA  
 GCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCCGATCGATCA  
 GTCAGGGGTGCCTGACTTAAGGCCAGTCCCTGGAAGTGCCTTTGATACTGTGATCTGGAGTATGGAAGAGGTG  
 AGTGGACTTCCGAGTGTAGAGGTGAAATCGTAAATCTGCGCAACGACACCAGGGGCGGACGGGGGCCCTTAGG  
 TCCCTTATGACCCTGTGGCTGCGGGGCTTTCC

**>LBMP\_5SVE\_Sinorhizobium\_sp**

GCTAATACCGTATGTGCCCTTCGGGGGAAAGATTTATCNGGTAAAGGATCGGCCCGCGTTGGATTAGCTAGTT  
 GGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAN  
 ACACGGCCGGGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATG  
 CCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTAGGGTTGTAAGACTCTTTCCACCGACAAGATAATGACGGTATCCGGAGAAG  
 AAGCCCCGACTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGGAATTACTGGGGCG  
 TAAAGCGCACGTAGGCCGATCGATCAATCAGGGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCCTGGAAGTGCCTTTGATAC  
 TGTCGATCTGGAGTATGGAAGAGGTGAGTGAATTTCCAGTGTAAGGTGAAATTCGTACATATCCGGAGGAA  
 CCCCAGGCGNGAAGGGGGGTTCACTGGGTCCATTACTGACCCCTAAGGTTCCAAAACCGTGGGGGAGCAAA  
 CAGGATTAATTTCCCTGGGTNATCCACNCCCCTAAANCNATTAATTGCC

**>LBMP\_6VE\_Rhizobium\_tropic**

GGAAAGAGCGTTACTGGGGTCTATAGTCTGAAGACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCATA  
 GGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCTTTTGTACGGAATAACGCAGGGAACTTGTGCTAATACCGTATGTG  
 TCCTTCGGGAGAAAGATTTATCGGCAAGAGATGAGCCCGCGTGGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTA  
 CCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCT  
 ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATCGGACAATGGGCGCATGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAG  
 GCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGATAAGATAATGACGGTCTCCGGTATAAGAAGCCCCGGCTGACTT  
 CGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTCCGTAATTACTGGGCGTACAGCGCACGTAGGC  
 GGATCGATCAGTCAGGCGTGAATCCCAGGTCTCACACCTGGTACTGCCTTTGATACTGTGATCTGGAGTAT  
 GGAAGAGGTGAGTGTAATCCGAGTGTCCAGGTGAAATTCGTATATATCCGGAGGTACACCACTGACGAGTGC  
 GGGCCCTGGTGCATTACATGATGCTGAGGTGCGATAGCTTGCCGAGCAATCTGGATTGATACCCCTGGCCACT  
 CCACGCCGTAATCAATGATTGTTATGCAGCCG

**>LBMP\_7SVE\_Rhizobium\_etli**

AGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAACGTACC  
 CTTTACTACGGAATCCCGCAGGGCCCCCTTGTGCTAATACCGTATGTGCCCTTCGGGGGAAAGATTTATCGGTA  
 AAGGATCGGCCCCNGTGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCT  
 GAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACANCGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT  
 GGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGGGGTAGGGTTGTANAGCTCTTTCA  
 CCGGAGCCGATAATGACGGTATCCGGAGAAGAAGGGGGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAG  
 GGGGCTAGCGTTGTTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCCGATCGATCAGTCAGGGGTGAGGTCCC  
 AAGGCTCAACCCTGGAAGTGCNTTTGATACTGTGATCTGGAGTATG

**>LBMP\_8VE\_Rhizobium\_leguminosarum**

TAGAGTTTGTCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCCGCAAGGG  
 GAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGAATCTACCCTTGACTACGGAATAACGCAGGGAACTTGTGCTAA  
 TACCGTATGTGTCTTCCGAGACCGATTTATCGGTCAAGGATGAGCCCGCGTTAAATTAGCTAGTTGGTGGG  
 GTAAAGGCCTANCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGG  
 CCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGCCAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATNGCCGCC  
 CGAGTGTGAAGGCCCTAGGGTTGTAAAGCTCTTTCACCGGAGAAGATAATGACGGTATCCGGAGAAGAAGCC

CCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGCCAAGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCGTAAAG  
CGCACGTAGGCGGATCGATCAGTCAGGGGTGAAATCCCAGGGCTCAACCCTGGAAGTGCCTTTGATACTGTCG  
ATCTGGAGTATGGAAGAGGTGAGTGGAATTC

## APÊNDICE C

**Seqüências completas do espaço Intergênico Transcrito (ITS) das 4 melhores estirpes provenientes, duas do Brasil (BR) e duas de Venezuela; assim como a seqüência de uma estirpe nativa de um Latossolo Vermelho-Escuro (LBMP – Solo BR). Obtidas com um seqüenciador de DNA ABI 3700, no LBMP da UNESP Jaboticabal.**

### >EU556742\_LBMP\_4BR\_*Rhizobium\_tropic*

GCCCCAGTGGGTGTAGACGGCGGGGTATGCCGATCGGCTGATGTCTTCGGACGTGCCCCGATATGAACCT  
TCCCGTGCTTACTAGAACATAGATGGCACCAGTCAGGTGACCGGTGCGGACGCAATACGCCACAGTCAAA  
TGCTTTGGCATTCCGGATGGTACGGCGAGCCTCGCCGCTCCACGTTCTCTTTCTTCAAGAAGACAAATAA  
CCGCGTCTATCCGGATGGCTGATTGCTGTCTGGACCGGTTTGACGAGAATGGGCCCCGTACCTCACTTGGT  
TAGAGCACACGCTTGAGAAGCGTGGGGTCGGAAGTTCAAGTCTTCCCGGGCCACCAGCCTTCGCCCTTT  
TGGGCTATGGCTTGGCGAGCTGGGAAAAGACGGTGACGCGGAAGTTGCCTAACCTGGTTAAGATCGGGG  
CGATCGAACTGATGGGGCTGTAGCTCACCTGGGAGAGCACCTGCTTTGCAAGCAGGGGGTCAAGGTTTCG  
ATCCCGCTCAGCTCCACCAAATCGATTGGGGTCGAGACTGACGGAATGTGGTCTTCTGAAGAAATAAAGG  
TTTTGGATCCGCCTTCGTGCCGACTGCGGTGTGCTGAATACATTGTGAAGAGCAAGATTGATCTGGAAGC  
TTCCAGCTTGTTTTGGAGCGACCCTAAGGTTGTTTGAAGTGTCCGAGCCCGGACCTGATGATATCGTGGAT  
TGCCTAGCCGGCTGGAAACGAAGGAGGGGACGGAGCTAGGAAGGAAGCTTGTGCTTTGGGTGCGCCAGCG  
TAAACTGCGTAACTGGTGTACGCGTGTGCTTTACGGTCTTTGGACTGTATCTCGACGGCGATCGGATTAC  
CGTTGCCTGATCGCGCGGTACCGGATTTAATCTCGAGAAGGTGGTCTTAAAGACAGCCTGCAAGCGAGCT  
GCTCGGCGTAGCTCCAGATAAGCAAGCCTTTTCGCACACGTCGATGGCATTGTTGAGTAGTCTGGGTTGTA  
AAAGGTAACCCGGTCTGTTGCTAGTTTCTGACAGGAGTCGGCAACTAGATGATGAGCATTGTTGCAATCA  
CCACCCTCAAGTGTGTAAGGGTATGTAATGGATGCCTCGGCATGCACAGGCGATGAAGCACGTGATACC  
CTCCAGACAACCCGTGGGGGCTGCAGAATAACGACATGGCCGTTGTTACC

### > EU556745\_LBMP\_12BR\_*Rhizobium\_etli*

CGGGTCGATCCAGTATGACTGGACCCGTTTGACGAGTATGGGCCCGTAGCTCAGTTGGTTAGAGCACACG  
CTTGATAAGCGTGGCGTCGGAAGTTCAAGTCTTCCCGGGCCACCATTTGCATTAGTAGATGGGGCTTGG  
GAATAGACGGCAGACGCGGAAAGTTGCCGAACCCAGGATATCTTGGCCGATCGAGCTGATGGGGCTGTAG  
CTCAGCTGGGAGAGCACCTGCTTTGCAAGCAGGGGGTTCAGCGGTTTCGATCCCGCTCAGCTCCACCATATC  
GATTGGTGTGAGACTGACGGTGTGAGACTGACGGTAACCGAGCGAAGCTCGCAAGCGCGAGGCGCGTC  
GCCAATCGTTTTGGCGCCCCGCGGAGCGCCTTCGGCGCGTGAGCGACGAATTTGTCTTTTGAAGAAATAA  
AAGTTTGCATCGGCTTTGCGCCTGATGCCTGTTCTGCATACATTGCGAAGAGAAGATTGATATGGAGGNT  
TCCAGGTGTTTTGGCTTTGCCCGAAACGTCCGAGCCCAGTTCTGCTGATCCTATGGATGGCCTAGCCGGC  
CGGAGATAAGGGGAAGCACTGGAGGTAGGAAGGGAGCTCGTCTCTATGGATCGTTTATTCTTCGGTGCCT  
GTGGGCATGGTATGATGCACGATCGGATTCCCATTGCCTGACCGCGCCTATCGGATCCAATCTCGAGCA  
GCTGGTCTTAACACGCTACACGAGCGTGTGCTCGGCGTAGCTCCAATGAAGTATCAGATGTGGACACG  
TCGATGGCATCATGAAATGATCCGGTTGTCGAAGGTACCGGATTTTGGACTGGCCGCACGTCAATCGCA  
ANGTTGTCCGGATGGTCAAGTTTGGCACCCACGAGGGCGAAAGCTCGAGTGGATAAGCTTTGCCACATC  
CGTACATAGATGAG

### > EU556743\_LBMP\_3VE\_*Rhizobium\_leguminosarum*

CTAAGGAAGCTGTGGAAGTGGTAAGACGACCTTCCGACAAGTCTTTGACTTGTCTCGAGGTATGAACCTT  
CCCGTGCTTTTTAGAACATAGATGGCACCAGTCAGGTGACCATCGAAACGTAATACGCCGGGATGACAAC  
CCTCACGACCCTATGGCGAGCTAACGCCGTCCACGTTTCTCTTTCTTCAAGAAGACAATTGGCGAAATA  
TGCCGAGTTCCGGGAATTTGCCCGTAGCTCAGTTTCGTTAGCACACGCTTGATAAGCGTGGCCTCGGAAGT  
TCAAGTCAACCCGAACCCACCATTTGCATATGCGAATGAGGGTTAGGGATGATGGAATGTGGCTGATGCG  
GATTGTTGCCGAACCTGCCCTTGTCTGGGTGGTTCGAGCTGGAGGGGCTGTAGCTCAGCTGGGAGAGCAC  
CTGCTTTGCAAGCAGGCCGTGACGGTTTCGATCCCGCTCAGCTCCACCAAATCGATTGGTGTGGAAGCTG

ACGGCGTAAGTCTTTTGAAGAAATAAAAGTTTTGCATCGGCTTATGGCTGATGCTTGTTACCCGGTTCCC  
 CGAATGCCCCCGTAGCTCAGTTGGTTAGAGCACACGCTTGATAAGCGTGGGGTCGGAAGTTCAAGTCTTC  
 CCGGGGAATGAGCAATGCATATGCGAATGAGCCTTACCCTGATGGAATGTGGCTGATGCCGATTGTTGCC  
 GAACCTGGGCTTGCTTTGATCCATAATCGAGCTGGAGCCCCTGTAGCTCAGCTGGGAGAGCTGCTTTGCA  
 AGCAAACCGTCAGCGGTTTCGATCCCCTCAGCTCCACCTTATCGATTGGTGTGAAGCTGACGGCGTTTG  
 TCTTTTGAAGCCATAAAAGTTAAGCATCCCCTTATGGCTGATGCTTGTTCTGCATACATTCTGTTGCCGT  
 TCCTTTGGAACGAACAACGAGACGATGAGCAATAGACAATGAGTTCGATTAAGTGTGCTATAGGGTTTTT  
 GATGCGTCCAAGCCGGAACCTTATGATTTCCGTGGATGGCCTAGCCAGGTTGTAAACGAGGCCGGGACCGG  
 CGTATGAAAGGAACTGGTCTGTTGCCGTTTCTTTGGAACGGGCAACGAGACGATGAGGA

**> EU556744\_LBMP\_4VE\_Rhizobium\_tropici**

GGTACCACAGGCTTAACCATCGGGATCACCATCGGGTTATGTCTTCGGAGGTGCCCGATATGAACCTTC  
 CCGTGCTTATTAGAACATAGATGGCACCAGTCAGGTGACCGGCGAGACGCAATACGCCACGTGAAATGCT  
 TTGGCATTCCGATGGTATGGCGAGCCTCGCCGTCCACGTTTCTTCTTCAAGAAGACAAAGAACC  
 TCGATCCGGATGGCTGATTGCTGTCTGGACCGGTTTGACGAGAATGGGCCCGTAGCTCAGTTGGTTAGAG  
 CACACGCTTGATAAGCGTGGGGTCGGAAGTTCAAGTCTTCCCGGGCCCACCAGCCTTCGCCCTTTGGGC  
 TATGGCTTGGCGAGCTGGGAAAANACGGTGACGCGGAATTTGCCGAACCCTGGTTAAAATCGGGCGATC  
 GAACCTGATGGGCTGTAGCTCAGCTGGGAGAGCACCTGCTTTGCAAGCAGGGGCTAAGCGGTTTCGATCC  
 CCGATCAGCTTCCACCAAATCGATTGGCGTGAGACTGACGGCATGTTATCTTCTGAAGAAATAAAGGTT  
 TTGCATCGGCCTTTTGTGCTGATTGCGTGTCTGCATACATTGTGAAGAGAACATTGATCTGGAGGCTTC  
 CAAAGGTGTTTTGAGCCACCGTAAGGTTGTTTGAAGCGTCCGAGCCCGGACCTGATGATATCGTGGATGG  
 CCTAGCCGGCTGGAAACGAAGGAGGGGACGGAGGTAGGAAGGAAGCTTGTGCTCTGGGTGCCAGCGTA  
 AACTGCGTAAGTGGTTTACGCGTGTGTTTACGGTCTTTGGACTGTATCTTGACGGCGATCGGATTACCG  
 TTGCCTGACCGCGCGGTACCGGATTTAATCTCGAGAAGCTGGTCTTAAAGACAGACTGCAAGCGAGCTGC  
 TCGGCGTAGCTCCAAAAAGCAAGCCTGTGCAACACGTCGATGGCATTGTTGAGTAGGCTGGGTTGTAA  
 AGGTAACCCGGTCTGTTGTTTCTGACAGGAAACGGCAACTAG

**> EU556744\_LBMP-Solo-BR\_Rhizobium\_sp.**

GGATGCCTTGTGCATGCACAGTCGCAGAAGACACTGTGATACGTTCCACAAAACGCCGTGGGAGGTTAC  
 TGTATACAGCAATTACTCCGCGAGTTTTCGCGAAAAGGCCGTGGGGAGGTTTCTGTATACAGCAATTATCC  
 GCCAGTTATCTGAGGACTGATGCCTGTTCTGAATACATTGTGAAGAGAAGATATGTCTGGAAGCTTTCCA  
 GGTGTTTTGAGCCCTTGTGTTTTGAAACGTCCGAGCCCAGTCCCAGAGACACCATGTGATGGCTTAGTCG  
 GCCGGCATTGGTGGAGGGATTGGAGCTAGGTAGGAAAGCTTGTCTCGGGCATTGTTGTTTGAAGCT  
 TTATGCCTTCATCTGATGGGAATGCTGGATTGATGTTGCCTGACCGCGCATCACCGGATGATATCTCGAG  
 TAGCTGGTCTTAATGGTATGGCTTCGAGGCGATCCGGCGTACCGTCAATGAAGTCCGTACCGACACGTCG  
 ATGTCATCAGGAAAGACTTGATTGTAAGGTAATCAGTTTTGCCGTTCTTTGGAGCGGCTATGGATGAG  
 CATATGACGATGATAGACGAAGAAGTGCATTAAGGGCATCTTGGTGGATGCCTTGTGCATGCACAGTCG  
 AGAAGACACTGTGATACGTTCCACAAAACGCCGTGGGAGGTTACTGTATACAGCAATTACTCCGCGAGT  
 TTCGC

# 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](#)