

**JOSIELE POLZIN DE OLIVEIRA**

**INVESTIGAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM RIZÓBIOS QUE NODULAM  
O FEIJOEIRO COMUM (*Phaseolus vulgaris* L.) DE DIFERENTES CENTROS DE  
DIVERSIDADE**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, na área de concentração em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lygia Vitória Galli Terasawa**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mariangela Hungria**

**Curitiba**

**2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

Aos meus pais,  
Ires e Marlis,  
responsáveis por  
tudo o que sou hoje.

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná, à chefia do Departamento e aos seus professores, pela oportunidade e por participarem da minha formação.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lygia Vitória Galli Terasawa, por todos os ensinamentos e, acima de tudo, pela amizade.

À Dr<sup>a</sup>. Mariangela Hungria e à Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vânia Vicente, pelo auxílio técnico.

Às Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Chirlei Glienke e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Kava Cordeiro, pelo auxílio durante o desenvolvimento do trabalho.

À Semília – Genética e Melhoramento, na pessoa de Francisco Terasawa Junior, pelo espaço cedido para o desenvolvimento do experimento a campo.

Aos companheiros do LabGeM, em especial aos estagiários Lucas Falarz e Luciana Lange, pela incansável colaboração.

A todos do laboratório de Biotecnologia dos Solos da Embrapa Soja, pelo apoio em momentos decisivos deste estudo, em especial ao Renan pelo auxílio nas análises do bionumerics, à Ilmara pela hospedagem e à Adriana pelos bons momentos de diversão.

À Mauro Gomes Mozatto, pelo apoio e compreensão durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu irmão, Glaucio Polzin de Oliveira, pela presença em momentos de necessidade.

Às companheiras de apartamento, Daiane Siqueira e Franciele Cabral, pelo constante apoio e momentos de descontração.

À Larice Armstrong, pelo auxílio durante grande parte do desenvolvimento da etapa experimental.

À Juliana Zanetti Ribeiro e demais funcionários da Semília, pelo auxílio no desenvolvimento do experimento a campo.

Um agradecimento especial aos amigos Ana Carolina de Carvalho, Luciana Barazetti e Rafael Valente, pelo constante interesse e incentivo ao meu trabalho, além do apoio em momentos difíceis.

À grande amiga e vizinha Marlúcia Martins Pereira, pelo apoio e conselhos em momentos de desespero.

*“Depois de algum tempo você aprende a diferença, a sutil diferença entre dar a mão e acorrentar uma alma. E você aprende que amar não significa apoiar-se. E que companhia nem sempre significa segurança. Começa a aprender que beijos não são contratos e que presentes não são promessas.*

*Começa a aceitar suas derrotas com a cabeça erguida e olhos adiante, com a graça de um adulto e não com a tristeza de uma criança.*

*Aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais para os planos, e o futuro tem o costume de cair em meio ao vão.*

*Depois de um tempo você aprende que o sol queima se ficar exposto por muito tempo.*

*E aprende que, não importa o quanto você se importe, algumas pessoas simplesmente não se importam... E aceita que não importa quão boa seja uma pessoa, ela vai feri-lo de vez em quando e você precisa perdoá-la por isso. Aprende que falar pode aliviar dores emocionais.*

*Descobre que se leva anos para construir confiança e apenas segundos para destruí-la...*

*E que você pode fazer coisas em um instante das quais se arrepende pelo resto da vida. Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias.*

*E o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida.*

*E que bons amigos são a família que nos permitiram escolher.*

*Aprende que não temos de mudar de amigos se compreendemos que os amigos mudam...*

*Percebe que seu melhor amigo e você podem fazer qualquer coisa, ou nada, e terem bons momentos juntos. Descobre que as pessoas com quem você mais se importa na vida são tomadas de você muito depressa... por isso sempre devemos deixar as pessoas que amamos com palavras amorosas; pode ser a última vez que as vejamos. Aprende que as circunstâncias e os ambientes têm influência sobre nós, mas nós somos responsáveis por nós mesmos. Começa a aprender que não se deve comparar com os outros, mas com o melhor que pode ser.*

*Descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser, e que o tempo é curto.*

*Aprende que não importa onde já chegou, mas para onde está indo... mas, se você não sabe para onde está indo, qualquer caminho serve.*

*Aprende que, ou você controla seus atos, ou eles o controlarão... e que ser flexível não significa ser fraco, ou não ter personalidade, pois não importa quão delicada e frágil seja uma situação, sempre existem, pelo menos, dois lados. Aprende que heróis são pessoas que fizeram o que era necessário fazer, enfrentando as conseqüências. Aprende que paciência requer muita prática.*

*Descobre que algumas vezes a pessoa que você espera que o chute quando você cai é uma das poucas que o ajudam a levantar-se. Aprende que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiência que se teve e o que você aprendeu com elas do que com quantos aniversários você celebrou. Aprende que há mais dos seus pais em você do que você supunha.*

*Aprende que nunca se deve dizer a uma criança que sonhos são bobagens...*

*Poucas coisas são tão humilhantes e seria uma tragédia se ela acreditasse nisso.*

*Aprende que quando está com raiva tem o direito de estar com raiva, mas isso não te dá o direito de ser cruel. Descobre que só porque alguém não o ama do jeito que você quer que ame não significa que esse alguém não o ama com tudo o que pode, pois existem pessoas que nos amam, mas simplesmente não sabem como*

*demonstrar ou viver isso.*

*Aprende que nem sempre é suficiente ser perdoado por alguém...*

*Algumas vezes você tem de aprender a perdoar a si mesmo.*

*Aprende que com a mesma severidade com que julga, você será em algum momento condenado.*

*Aprende que não importa em quantos pedaços seu coração foi partido, o mundo não pára para que você o conserte. Aprende que o tempo não é algo que possa voltar.*

*Portanto, plante seu jardim e decore sua alma, em vez de esperar que alguém lhe traga flores.*

*E você aprende que realmente pode suportar... que realmente é forte, e que pode ir muito mais longe depois de pensar que não se pode mais. E que realmente a vida tem valor e que você tem valor diante da vida! Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o bem que poderíamos conquistar se não fosse o medo de tentar.”*

William Shakespeare

## RESUMO

Como maior produtor e consumidor mundial, o Brasil representa uma grande importância econômica em relação ao feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), pois além de se constituir um dos alimentos básicos da população brasileira, é uma das principais fontes de proteína na dieta alimentar dos estratos sociais economicamente menos favorecidos. É uma leguminosa que se beneficia da fixação biológica do nitrogênio (FBN), sendo capaz de estabelecer nodulação com bactérias pertencentes à ordem Rhizobiales, coletivamente chamadas de rizóbios. O conhecimento da diversidade genética destas bactérias se constitui numa perspectiva capaz de contribuir para o incremento dos índices produtivos desta cultura. Assim, a identificação de combinações simbióticas mais eficientes com a planta hospedeira permite a produção de inoculantes comerciais de qualidade, na substituição de fertilizantes nitrogenados. O presente trabalho teve por objetivo investigar a variabilidade genética de bactérias que nodulam o feijoeiro comum, representativo dos centros de origem andino e mesoamericano, por meio de caracterizações morfofisiológicas e genéticas. Quatro cultivares de feijão foram utilizadas, duas de cada centro de origem, como plantas isca. Após aproximadamente quatro semanas de cultivo, foi realizado o isolamento das bactérias presentes nos nódulos radiculares. A concentração de bactérias presente no solo amostrado foi determinada utilizando-se o método de contagem NMP (número mais provável), sendo que os nódulos formados neste experimento receberam o mesmo tratamento dos provenientes do experimento a campo. Na análise morfofisiológica foram consideradas características de morfologia da colônia, absorção do corante vermelho Congo em meio YMA, alteração de pH em meio contendo azul de bromotimol e coloração de Gram. Os isolados que apresentaram as características morfofisiológicas comuns aos rizóbios foram selecionados para a análise genética, sendo que seus DNAs foram submetidos a reações de amplificação por BOX-PCR, e analisados quanto à diversidade. Os resultados encontrados demonstraram alta variabilidade genética tanto no experimento a campo quanto em vasos, sendo que a expressão da maior diversidade foi no campo. Na análise de todos os isolados obtidos, foi verificada maior diversidade genética entre aqueles capturados pelas cultivares de origem mesoamericana. Além disso, não ocorreu a formação de agrupamentos específicos que indiquem a quais espécies pertencem os isolados. Estes resultados demonstram a necessidade de serem realizados estudos de seqüenciamento do 16S rDNA, que permita a classificação de espécie e avaliação da eficiência simbiótica para uma possível seleção de linhagens que possam ser disponibilizadas na confecção de inoculantes comerciais.

Palavras-chave: Feijoeiro, Rizóbio, Diversidade Genética, Centros de Origem e Diversificação, FBN.

## ABSTRACT

Brazil is the biggest producer and consumer of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) worldwide, reflecting its importance of basic food of the Brazilian population and the main protein source in the alimentary diet of the economically less favored population. This crop is capable of establishing nodulation with bacteria belonging to the order Rhizobiales, collectively called rhizobia, resulting in the process of "Biological Nitrogen Fixation". The knowledge of rhizobial genetic diversity may contribute to improve crop productivity and in addition, bacteria with higher capacity of fixing nitrogen may be recognized within the soil population. The objective of the present study was to investigate the morphophysiological and genetic variability of root-nodulating N<sub>2</sub>-fixing rhizobia associated with common bean cultivars in a soil of Paraná State. Four cultivars of common bean were used, two of the Andean and two of the Mesoamerican centers of origin. Morphophysiology was evaluated considering the absorption of Congo red in YMA medium, pH alteration with bromotymol blue as indicator in YMA medium and Gram coloration, while genetic characterization was, based on the DNA amplification by the BOX-PCR method. The results highlighted high genetic variability in both field and pot experiments, and in the experiment performed, however, higher diversity was detected at the field. Specific clusterings of bacteria were not observed as a function of the cultivars used, and in general isolates trapped by each cultivar were also genetically different. The analysis of all isolates has indicated higher genetic diversity among those obtained using mesoamerican cultivars as trap hosts. The results demonstrate the need to carry on the genetic studies to characterize the differences between the rhizobial populations trapped under field and pot conditions and between both types of cultivars; symbiotic performance should also be evaluated, aiming at selecting elite strains that can be utilized as commercial inoculants.

Key words: common bean, rhizobia, genetic diversity, centers of origin and diversity, biological nitrogen fixation.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 -	Etapas que compõem o ciclo do nitrogênio.....	21
Figura 02 -	Complexo Nitrogenase e a Fixação Biológica de Nitrogênio.....	22
Figura 03 -	Estrutura montada na segunda época de plantio para proteger as plantas de geadas.....	49
Figura 04 -	Plantas cultivadas na localidade Produtor Rural.....	50
Figura 05 -	Gel de quantificação de DNA.....	51
Figura 06 -	Dendrograma obtido com os produtos de amplificação por BOX-PCR de isolados de rizóbios obtidos de feijoeiro cultivar Diamante Negro (C.O. Mesoamericano) em experimento a campo.....	53
Figura 07 -	Dendrograma obtido com os produtos de amplificação por BOX-PCR de isolados de rizóbios obtidos de feijoeiro cultivar Ouro Negro (C.O. Mesoamericano) em experimento a campo.....	54
Figura 08 -	Dendrograma mostrando isolados de rizóbios obtidos com feijão comum, em experimento conduzido a campo, com o cultivar Jalo Precoce (centro de origem Andino).....	56
Figura 09 -	Dendrograma mostrando isolados de rizóbios obtidos com feijão comum, em experimento conduzido a campo, com o cultivar Goiano Precoce (centro de origem Andino).....	57
Figura 10 -	Plantas com deficiência de nitrogênio em vasos de Leonard.....	62
Figura 11 -	Plantas cultivadas em vasos contendo solução nutritiva isenta de nitrogênio, inoculadas com diferentes diluições de solo.....	62
Figura 12 -	Dendrograma obtido com os produtos de BOX-PCR de rizóbios isolados de feijoeiro comum (Diamante Negro, vasos inoculados com solo diluído $10^{-1}$ ).....	64
Figura 13 -	Dendrograma obtido com os produtos de BOX-PCR de rizóbios isolados de feijoeiro comum (Diamante Negro, vasos inoculados com solo diluído $10^{-2}$ ).....	64
Figura 14 -	Dendrograma obtido com os produtos de BOX-PCR de isolados de rizóbios obtidos de feijoeiro comum (Jalo Precoce, vasos inoculados com solo diluído $10^{-1}$ ).....	66

Figura 15 - Dendrograma obtido com os produtos de BOX-PCR de rizóbios isolados de feijoeiro comum (Jalo Precoce, vasos inoculados com solo diluído $10^{-2}$ ).....	66
Figura 16 - Dendrograma mostrando linhagens de rizóbios isolados de feijoeiro comum cultivado em diferentes condições (experimento a campo e em vasos, nas diluições $10^{-1}$ e $10^{-2}$ , centro de origem mesoamericano).....	71
Figura 17 - Dendrograma mostrando linhagens de rizóbios isolados de feijoeiro comum cultivado em diferentes condições (experimento a campo e em vasos, nas diluições $10^{-1}$ e $10^{-2}$ , centro de origem andino).....	72

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Coleções obtidas para este estudo a partir de bactérias isoladas dos nódulos de feijoeiro comum, experimento a campo.....	47
Tabela 02 - Nomenclatura e origem dos isolados obtidos a partir do experimento a campo.....	48
Tabela 03 - Índices de diversidade e riqueza genética dos isolados do experimento a campo, separados por cultivar de feijoeiro.....	59
Tabela 04 - Índices de diversidade e riqueza genética dos isolados do experimento a campo, separados por centro de origem do feijoeiro	59
Tabela 05 - Coleções obtidas para este estudo a partir de bactérias isoladas dos nódulos de feijoeiro comum, experimento em vasos.....	60
Tabela 06 - Nomenclatura e origem dos isolados obtidos a partir do experimento em vasos.....	61
Tabela 07 - Índices de diversidade e riqueza genética dos isolados do experimento em vasos (Mesoamericano).....	68
Tabela 08 - Índices de diversidade e riqueza genética dos isolados do experimento em vasos (Andino).....	68
Tabela 09 - Índices de diversidade e riqueza genética dos isolados do experimento em vasos (Mesoamericano e Andino).....	69
Tabela 10 - Índices de diversidade e riqueza genética de isolados dos experimentos a campo e em vasos, separados por centro de origem.....	70

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1.	<i>A cultura do feijoeiro.....</i>	15
2.1.1.	Importância socioeconômica.....	15
2.1.2.	Histórico.....	16
2.1.3.	Centro de Origem, Centro de Diversidade e Centro de Domesticação de plantas.....	17
2.2.	<i>Bactérias que fixam nitrogênio no feijoeiro.....</i>	19
2.3.	<i>A taxonomia dos rizóbios.....</i>	23
2.4.	<i>Aspectos evolutivos dos rizóbios que nodulam o feijoeiro comum.....</i>	25
2.5.	<i>Utilização de inoculantes na cultura do feijoeiro.....</i>	27
2.6.	<i>Estudos de diversidade bacteriana quanto à FBN.....</i>	29
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1.	<i>Material biológico.....</i>	34
3.2.	<i>Meios de cultura.....</i>	34
3.3.	<i>Soluções e reagentes.....</i>	35
3.4.	<i>Experimento a campo.....</i>	40
3.5.	<i>Experimento em vasos contendo solução nutritiva isenta de nitrogênio..</i>	41
3.5.1.	NMP (Número Mais Provável).....	41
3.5.2.	Vasos de Leonard.....	42
3.6.	<i>Isolamento.....</i>	43
3.7.	<i>Caracterização morfológica das colônias.....</i>	43
3.7.1.	Caracterização morfológica dos isolados.....	43
3.8.	<i>Extração do DNA total.....</i>	44
3.9.	<i>Caracterização genética.....</i>	45
3.9.1.	BOX-PCR.....	45
3.9.2.	Análise de agrupamentos.....	45
3.9.3.	Diversidade genética.....	46
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47

4.1.	<i>Isolados obtidos a partir do experimento a campo.....</i>	47
4.1.1.	Caracterização morfológica.....	50
4.1.2.	Caracterização molecular.....	51
4.2.	<i>Isolados obtidos a partir do experimento em vasos.....</i>	60
4.2.1.	Caracterização molecular por BOX-PCR.....	63
4.3.	Análise conjunta dos isolados procedentes de campo e casa de vegetação.....	69
5.	CONCLUSÕES.....	73
	REFERÊNCIAS.....	74
	ANEXOS.....	87

## 1. INTRODUÇÃO

A cultura do feijoeiro no Brasil apresenta importância destacada nos sistemas produtivos vinculados à agricultura familiar. Dentro deste contexto, destaca-se a necessidade do desenvolvimento de tecnologias de baixo custo capazes de melhorar os níveis de produtividade dos pequenos agricultores, responsáveis pela quase totalidade da produção desta leguminosa, essencial na dieta de grande parte da população brasileira. A inoculação com bactérias do grupo dos rizóbios é uma alternativa que pode substituir, ainda que parcialmente, a adubação nitrogenada, resultando em benefícios ao pequeno produtor.

Os rizóbios pertencem à ordem Rhizobiales e são capazes de formar estruturas altamente específicas na raiz da planta hospedeira, conhecidas como nódulos, onde ocorre a conversão de nitrogênio atmosférico a amônia, conhecida como “Fixação Biológica do Nitrogênio” (FBN).

Anteriormente classificada como uma cultura marginal, constata-se, recentemente, uma mudança no perfil do produtor nacional, com crescente utilização de novas tecnologias e ampliação das épocas de cultivo. Uma perspectiva capaz de contribuir para o incremento dos índices produtivos é o conhecimento da diversidade genética dos rizóbios no solo, pois a nodulação e a FBN são processos interativos entre a planta e a bactéria, regulados geneticamente. A investigação da variabilidade genética de rizóbios amplia a perspectiva de seleção de bactérias com maior potencial simbiótico. Isto possibilita a identificação de combinações mais eficientes com a planta hospedeira na simbiose, para subsequente produção de inoculantes comerciais.

Atualmente boa parte do suprimento do nitrogênio (N) é realizada pelo uso dos fertilizantes nitrogenados, cuja maioria corresponde a subprodutos do petróleo, onerando substancialmente o custo de produção da lavoura. Além disso, esses fertilizantes contribuem para o agravamento do efeito estufa, pois liberam óxido nitroso. Assim, abre-se uma real perspectiva para o produtor brasileiro em desfrutar de bons resultados na lavoura, a um custo acessível, decorrente da substituição dos caríssimos fertilizantes nitrogenados e sem causar danos ao meio ambiente.

O presente trabalho teve como objetivo investigar a variabilidade genética disponível em bactérias que nodulam o feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), representativo de dois diferentes centros de origem, andino e mesoamericano, por meio de caracterizações morfofisiológicas e genéticas por BOX-PCR.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. A Cultura do Feijoeiro**

#### **2.1.1. Importância socioeconômica**

O Brasil responde hoje pela maior produção de grãos de feijão no mundo (17,6%), seguido pela Índia (16,2%). Entretanto, a produção brasileira tem sido insuficiente para abastecer o mercado interno, devido à redução na ordem de 35% de área plantada nos últimos 17 anos (YOKOYAMA, 2006). Profundas mudanças também têm marcado a cultura do feijoeiro comum, o qual tradicionalmente era cultivado em pequenas áreas, na época das águas, por produtores com baixo uso de tecnologia, sujeitos à variação de clima em algumas safras e significativa incidência de pragas e doenças. Este comportamento ciclotímico da produção e a possibilidade de estender a cultura a todos os estados brasileiros, em várias épocas do ano, fazem surgir um novo perfil de produtor. Na região Centro-oeste, a produção está mais concentrada na segunda e terceira safras, de seca e inverno, respectivamente e com plantio irrigado por pivô central, fazendo maior uso da tecnologia. Na região Sul, o plantio é efetuado em rotação com a cultura do milho, tanto na época das águas, de setembro a dezembro, como na época das secas, de fevereiro a maio. A produtividade média tem permanecido em torno de 900 kg/ha, podendo atingir até 5.000 kg/ha em condições ótimas de manejo (BUSO *et al.*, 2006).

Para o ser humano, o consumo do feijão sempre representou grandes vantagens do ponto de vista nutricional, primeiramente, pelo conteúdo protéico relativamente elevado e o alto teor de lisina, que exerce efeito complementar às proteínas dos cereais (LAJOLO *et al.*, 1996). As fibras dietéticas encontradas em sua composição têm importantes implicações terapêuticas no tratamento de diabetes e hiperglicemia e preventiva em doenças cardiovasculares e hipertensão arterial. O feijão também é uma importante fonte de vitaminas, principalmente do complexo B, as quais previnem certos defeitos fetais, cardiovasculares e certos tipos



de câncer. Devido a estes e outros componentes, o feijoeiro é considerado a leguminosa de maior importância para a nutrição humana (COSTA; VIEIRA, 2000).

Além do aspecto nutricional, o feijoeiro representa grande importância no cenário econômico mundial e nacional, sendo cultivado em 113 países diferentes (FAO, 2007).

A interface histórica, cultural e social do feijoeiro é inquestionável na nossa sociedade. A íntima relação do brasileiro com esta leguminosa coloca o Brasil como seu maior produtor e consumidor mundial, sendo responsável no mundo por 17,6% da produção, seguido da Índia, com 16,2%. Além destas estatísticas divulgadas pela FAO (Food and Agriculture Organization), em 2007 aproximadamente 90,1% de toda a produção mundial ocorreu nos países em desenvolvimento e apenas 9,9% nos países desenvolvidos. A América Latina e a Ásia, juntas, foram responsáveis por, aproximadamente, 76% da produção, sendo que o continente europeu foi responsável por apenas 2%.

Considerando somente a produção interna, das 3.500.600 toneladas produzidas na safra 2007/2008 no Brasil, 2.258.900 são provenientes da região Centro-Sul, enquanto que, somente 1.241.700 toneladas foram produzidas nas regiões Norte e Nordeste. Apesar destas duas últimas regiões apresentarem a maior área plantada, a produtividade média é a mais baixa do país, com apenas 521 kg/há (CIF, 2008). Através destes dados, percebe-se claramente a importância do feijoeiro como cultura de subsistência e principal fonte nutricional para populações de baixa renda em todo o mundo. Desta forma, torna-se fundamental o desenvolvimento de técnicas de cultivo que aumentem a produtividade, com a melhor relação custo/benefício e impacto ambiental mínimo, como é o caso da utilização de inoculantes (EMBRAPA, 2007).

### **2.1.2. Histórico**

Mesmo sendo de origem americana, historiadores acreditam que o feijoeiro comum foi introduzido na Europa em 1540, aumentando a expectativa de vida da população. Sua disseminação no mundo ocorreu posteriormente devido às guerras, pois esse alimento era parte essencial da dieta dos guerreiros (VIEIRA, 1967). Além

disso, os grandes exploradores desempenharam papel decisivo na difusão da cultura, levando-a às mais remotas regiões do globo (EMBRAPA, 2007). No Brasil, os índios o chamavam de “comanda” e era comida juntamente com farinha, hábito que foi absorvido e disseminado pelos colonizadores portugueses e é preservado até os dias atuais (VIEIRA, 1967).

É importante considerar que, na história evolutiva, há indícios de que o feijoeiro teria sido domesticado na Mesoamérica, que compreende o México, Colômbia, Equador e Norte do Peru, para então ser disseminado para a América do Sul. No entanto, achados arqueológicos mais antigos indicam sua domesticação inicial na América do Sul e posterior disseminação para a América do Norte. Estudos recentes apontam, ainda, que tanto a domesticação, como a diversificação genética, ocorreram em dois grandes centros, separadamente: o centro **mesoamericano** e o **andino**, que vai desde o Sul do Peru até o Norte da Argentina (TOHME *et al.*, 1996; BEEBE *et al.*, 2001). Um terceiro menor centro de domesticação pode existir na Colômbia (PINTO; HUNGRIA; MERCANTE, 2007). Análises atuais, empregando métodos moleculares, evidenciaram que grande parte do feijão comum encontrado no Brasil é de origem mesoamericana, podendo ter chegado ao País no período pré-colonial (KAPLAN, 1965; HARLAN, 1971; KAPLAN, 1980; GEPTS; DEBOUCK, 1991).

### **2.1.3. Centro de Origem, Centro de Diversidade e Centro de Domesticação de plantas**

Na concepção de Vavilov (1937) o centro de origem de uma cultura equivalia à região onde o ancestral silvestre exibia a maior diversidade genética para um número seletivo de características, diminuindo a variabilidade à medida que se deslocava para a periferia da distribuição. Ele determinou dez regiões no mundo correspondentes aos principais centros, com suas respectivas culturas, sendo que o feijoeiro foi originado nas Américas. Além disso, Vavilov formulou a proposta de que quanto maior o número de formas de uma cultura dentro de um centro, maior seria a antiguidade daquela cultura. Posteriormente, Harlan (1971) constatou que nem

sempre o centro de origem de uma cultura coincide com o local de expressão da máxima diversidade genética. Sendo assim, de acordo com Carvalho e Cavichioli (2005), o centro de origem de algumas espécies corresponde a uma área limitada na qual poucos ancestrais podem ter-se originado e da qual as espécies tenham se dispersado, atingindo as distribuições atuais.

Por outro lado, segundo Borém (1998), o centro de diversidade corresponde a uma região geográfica que contém uma concentração da diversidade genética de uma ou mais espécies, anteriormente designado como centro de origem. Já o centro de domesticação corresponde a uma região geográfica onde uma espécie passa do seu estado selvagem ao estado cultivado. A domesticação coincide com o início da prática agrícola, decorrente de um processo seletivo no qual busca-se a uniformidade de tipos. Muitas espécies foram domesticadas independentemente por vários grupos humanos, em épocas e áreas diferentes, como decorrência da grande distribuição geográfica da espécie.

Conforme já comentado, a origem evolutiva do feijão comum e sua diversificação primária ocorreram nas Américas (DEBOUCK, 1991), mas o local exato onde isto se deu é ainda motivo de controvérsia (GEPTS; DEBOUCK, 1991).

Populações selvagens de feijão crescem desde o Norte do México até o Norte da Argentina, em altitudes entre 500 e 2.000m, não sendo encontradas naturalmente no Brasil (DEBOUCK, 1986).

As primeiras formas silvestres de feijão foram encontradas na América do Sul por Burkart em 1941 (STRALIOTTO; TEIXEIRA, 2000) e depois na América Central por Miranda Colín (1967) e Gentry (1969). Achados arqueológicos indicam que em 6.000 a.C., *Phaseolus vulgaris* já se constituía numa espécie domesticada entre os nativos do Peru, o que sugere ter sido a espécie diferenciada de formas nativas, através de seleção para o cultivo (KAPLAN; LYNCH; SMITH, 1973). Estudos posteriores mostraram que o feijoeiro selvagem encontra-se distribuído desde o norte do México até o noroeste da Argentina (SINGH; GEPTS; DEBOUCK, 1991). Há uma grande diversidade genética entre os tipos selvagens e as variedades crioulas (“landraces”) presentes entre estes dois extremos do continente americano, tanto em nível morfológico (KOENIG; GEPTS, 1989; KOENIG; SINGH; GEPTS, 1990) quanto molecular (GEPTS; DEBOUCK, 1991). Assim, surgiram questionamentos sobre o local de domesticação do feijoeiro, chegando-se a

conclusão de que a cultura teve múltiplos centros de domesticação (MIRANDA COLÍN, 1967).

Os primeiros vestígios arqueológicos de cultivares de feijoeiro chegam a idades próximas de 10.000 anos (GEPTS; DEBOUCK, 1991). A ampla área de ocorrência de populações selvagens da espécie é um dos fatores que permitiram o surgimento de diversas raças locais, embora também seja uma das causas da dificuldade da localização exata dos locais de domesticação desta cultura (FREITAS, 2006).

Estudos evolutivos sobre o feijão baseiam-se, principalmente, na análise da proteína faseolina (*Phs*), encontrada tanto em variedades cultivadas quanto em populações selvagens (GEPTS *et al.*, 1986), ocorrendo uma alta correlação entre o tipo e o local geográfico de origem dos materiais, sobretudo em relação ao material selvagem (FREITAS, 2006).

Ainda de acordo com Freitas (2006), o conteúdo de faseolina de sementes encontradas em silos subterrâneos em locais arqueológicos no Estado de Minas Gerais teve maior influência do centro Mesoamericano, em relação ao Andino. Estes resultados são fortes indicativos que o feijão comum foi introduzido no Brasil através da migração ou comércio entre populações da Mesoamérica e do Brasil, em tempos pré-coloniais.

## **2.2. Bactérias que fixam nitrogênio no feijoeiro**

Uma das características do feijoeiro é a possibilidade de estabelecer relação simbiótica com um grupo de bactérias capazes de captar o nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ). O N é um elemento essencial para a constituição da massa total dos sistemas vivos, sendo componente indispensável à biossíntese de moléculas fundamentais, tais como ácidos nucleicos e aminoácidos, representando de 8 a 16% do total de massa orgânica. Como 78% da atmosfera terrestre é constituída por  $N_2$  ou dinitrogênio, esta é a fonte mais abundante deste elemento (NELSON; COX, 2002). Entretanto, as formas solúveis e biologicamente assimiláveis desta molécula são escassas. Nenhum animal ou planta é capaz de utilizá-lo diretamente da atmosfera, devido à tripla ligação covalente que existe entre os átomos de nitrogênio (MANYANI

*et al.*, 2001), considerada uma das mais fortes ligações encontradas na natureza, com uma energia de 942kJ/mol. Assim, como esta energia de ativação para a quebra da molécula é extremamente alta, o N<sub>2</sub> atmosférico é quase quimicamente inerte nas condições normais (NELSON; COX, 2002). O N constitui, juntamente com a água, o principal fator limitante da produção agrícola mundial (MANYANI *et al.*, 2001).

As principais fontes fornecedoras do nitrogênio necessário ao crescimento das plantas são: 1) N do solo, proveniente da decomposição da matéria orgânica e das rochas; 2) N fornecido por fertilizantes; 3) N fornecido pelo processo da FBN. Existe, também, uma pequena contribuição pela reação de descargas elétricas com N<sub>2</sub> (fixação não-biológica), resultando em nitrato, que é adicionado ao solo e representa cerca de 4% das entradas positivas no balanço de N na Terra. O fornecimento, utilização e perdas do N formam um ciclo complexo, denominado “ciclo do N” (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007)(FIGURA 01).

A primeira etapa do ciclo é conhecida como fixação (ou redução) e consiste na quebra deste gás atmosférico por bactérias fixadoras de N<sub>2</sub>. O produto resultante da fixação é a amônia (NH<sub>3</sub> ou NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), que pode ser utilizada pelos vegetais, mas pela grande abundância de bactérias do solo, a amônia é convertida por oxidação em nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) pelo processo de nitrosação e, em seguida, em nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) pelo processo de nitrificação. Tanto a amônia, quanto o nitrito podem ser absorvidos pelos organismos vegetais, mas a maioria emprega o nitrato na síntese de aminoácidos e, posteriormente, de proteínas e ácidos nucleicos. Ocorrendo a morte dos organismos, sua degradação pela ação dos microrganismos devolve a amônia ao solo, onde as bactérias nitrificantes irão convertê-la novamente em nitrito e nitrato. Finalmente, bactérias anaeróbicas do solo convertem o nitrato novamente em N<sub>2</sub>, ocorrendo o processo de desnitrificação (NELSON; COX, 2002).

Os fertilizantes contribuem com, aproximadamente, 15% do nitrogênio colocado no solo, sendo que a sua síntese iniciou na primeira década do século XX, quanto Fritz Haber e Carl Bosch descobriram o processo que transforma N<sub>2</sub> atmosférico em amônia. Para obter a energia de ativação necessária para a quebra da tripla ligação entre os átomos de nitrogênio, é empregada uma mistura de H<sub>2</sub> (derivado de gás de petróleo) e N<sub>2</sub> submetidos a temperaturas de 400 a 500°C e a pressões de dezenas de milhares de quilopascals (200 a 800 atm) (NELSON; COX, 2002). Por isso, os custos para a síntese química de produtos nitrogenados são

extremamente elevados, devido, principalmente, à utilização de componentes provenientes de petróleo.

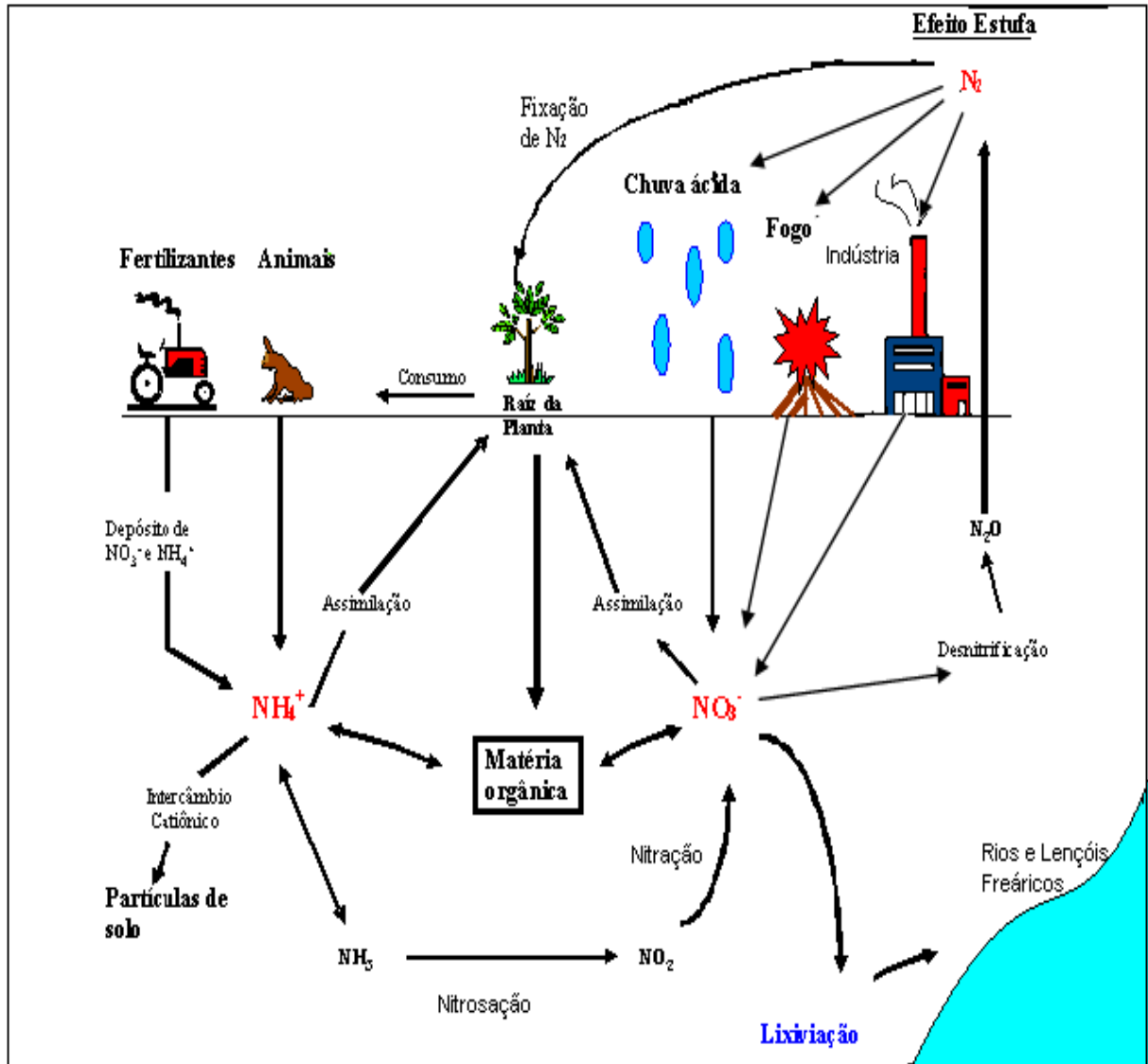


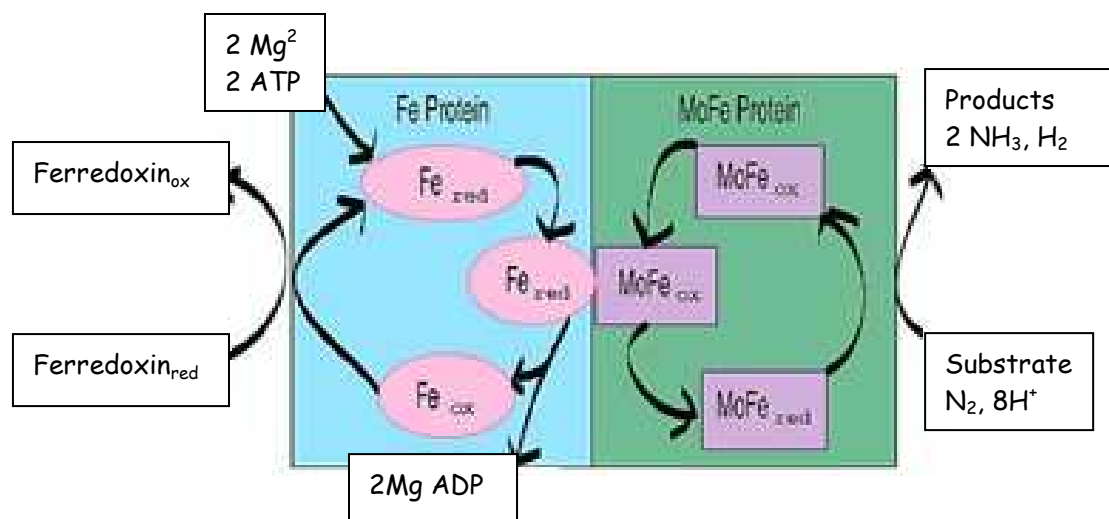
FIGURA 01. Etapas que compõem o ciclo do Nitrogênio.

Outro agravante na utilização de fertilizantes nitrogenados reside na baixa eficiência de sua utilização pelas plantas, raramente ultrapassando 50%. Deve-se considerar ainda, que o uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados resulta em poluição ambiental, pois a lixiviação do N e o escoamento desse nutriente pela superfície do solo resultam em acúmulo de formas nitrogenadas nas águas dos rios, lagos e lençóis de água subterrâneos, podendo atingir níveis tóxicos aos peixes e ao homem (HUNGRIA; CAMPO; MENDES, 2007).

Mas, apesar dos custos elevados dos fertilizantes e das conseqüências drásticas que seu uso causa ao meio ambiente, a sua utilização vem aumentando. De acordo com os dados fornecidos pela CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), as vendas de fertilizantes de janeiro a setembro de 2008, somadas às médias históricas de vendas de setembro a dezembro dos últimos dez anos, projeta-se que o consumo de adubos em 2008 tenha ficado em torno de 24,5 milhões de toneladas. Se esse número para 2008 se confirmar, haverá um decréscimo de 0,5%, quando comparado ao total de 24,6 milhões de toneladas produzidas e entregues ao consumidor final em 2007. Apesar dessa queda, o uso de fertilizantes nos últimos dois anos apresentou grandes acréscimos em relação aos anos anteriores (CONAB, 2007).

Bactérias da ordem Rhizobiales formam estruturas altamente específicas, os nódulos, onde ocorre a conversão do  $N_2$  atmosférico a amônia, que é então incorporada em diversas formas de N orgânico para a utilização por algumas plantas, principalmente da família Leguminosae. Essas bactérias conseguem quebrar a tripla ligação do  $N_2$  pela ação de um complexo enzimático, chamado dinitrogenase; este processo é chamado de Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN)(MORGANTE, 2003).

A FBN envolve uma complexa rede de reações químicas (FIGURA 02). A nitrogenase ou dinitrogenase é o complexo enzimático responsável por estas reações, ou seja, pela redução do  $N_2$  a amônia (NELSON; COX, 2002).



**FIGURA 02.** Complexo Nitrogenase e a Fixação Biológica do Nitrogênio.

O complexo enzimático da nitrogenase é formado por dois componentes. O componente I é conhecido como redutase da dinitrogenase (proteína Ferro), sendo formada por um dímero de subunidades idênticas ( $\gamma_2$ ). Estas subunidades são codificadas pelo gene *nifH*. O componente II é um tetrâmero  $\alpha_2\beta_2$ , que possui dois átomos de molibdênio, 30 de ferro e 30 de enxofre por tetrâmero. As subunidades  $\alpha$  são codificadas pelo gene *nifD* e a  $\beta$  pelo gene *nifK* (EADY, 1991). O componente II é também conhecido como dinitrogenase (proteína Mo-Fe).

Considerando-se o alto custo e os danos ambientais provocados pelos fertilizantes nitrogenados, a FBN adquire grande importância, tendo em vista que as tecnologias baseadas neste processo refletem um baixo custo de produção e contribuem de maneira significativa para a preservação ambiental (GRANGE; HUNGRIA, 2004). A perspectiva do uso de inoculantes comerciais faz com que agricultores que atuam em pequenas áreas possam fazer uso de um pacote tecnológico completo, mais econômico e com menor impacto ambiental, desfrutando de resultados efetivamente satisfatórios na produção da cultura.

### **2.3. A taxonomia dos rizóbios**

A capacidade nodulatória dos rizóbios nas raízes de leguminosas é a expressão morfológica dos potenciais benefícios da FBN. De acordo com Hungria (1994), tais benefícios são quantitativos, pois diferentes níveis de nitrogênio fixado podem ser aferidos nesta relação simbiótica. Caso a simbiose seja eficiente, o N sintetizado nos nódulos pode suprir todas as necessidades da planta, dispensando o uso de fertilizantes nitrogenados. Vigora complexa interação entre o rizóbio e a leguminosa, regulada geneticamente, mas aspectos da variabilidade individual dos simbiontes também são preservados.

O agrupamento dos rizóbios foi, inicialmente, baseado em características fenotípicas, principalmente na habilidade de nodular algumas leguminosas, dando origem ao conceito de “grupos de inoculação cruzada”. A taxonomia do rizóbio baseada na especificidade hospedeira foi sendo substituída pela taxonomia



numérica, que se apóia nas características bioquímicas, fisiológicas, sorológicas e moleculares (HUNGRIA; VARGAS; ARAUJO, 1997).

Primeiramente, a família Rhizobiaceae era representada apenas pelo gênero *Rhizobium*, o qual era constituído por bactérias capazes de nodular e fixar nitrogênio em relações simbióticas com plantas da família Leguminosae. A classificação das espécies tinha como base principalmente a leguminosa hospedeira com as quais fossem capazes de formar nódulos e fixar nitrogênio. Desse modo, *Rhizobium phaseoli* nodula feijoeiro; *R. japonicum*, a soja; *R. meliloti*, a alfafa; *R. lupini*, *Lupinus spp.* e *R. trifolii*, o trevo (COUTINHO, 2003).

Devido a sua ampla distribuição geográfica e a sua longa história evolutiva, existe uma enorme diversidade genética entre as bactérias da família Rhizobiaceae (PIÑERO; MARTÍNEZ; SELANDER, 1988). Uma amostra da diversidade e heterogeneidade deste agrupamento pode ser constatada quando uma mesma leguminosa atrai geneticamente vários simbioss, ou quando um mesmo rizóbio é capaz de nodular diferentes leguminosas. Graças a essa diversidade a classificação destes organismos tem sido bastante dinâmica ao longo dos anos. Substituindo o conceito de inoculação cruzada, os rizóbios foram agrupados em dois grandes grupos: Rizóbios de crescimento rápido e lento, dando origem a dois grandes gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, respectivamente (JORDAN, 1984). Mais tarde quatro novos gêneros foram incluídos: *Sinorhizobium* (CHEN; YAN; LI, 1998; LAJUDIE *et al.*, 1994), *Azorhizobium* (DREYFUS; GARCIA; GILIS, 1988), *Mesorhizobium* (JORDAN, 1984; JARVIS; PANKHURST; PATEL, 1982; NOUR *et al.*, 1994, LINDSTRÖM *et al.*, 1995) e *Allorhizobium* (LAJUDIE *et al.*, 1998).

Segundo Young e Haukka (1996), com a utilização de técnicas moleculares, os gêneros passaram a ser separados baseados em seqüências do gene 16S rDNA. Entretanto, o agrupamento rizóbio não forma um grupo coerente devido à miscigenação que estes organismos sofrem com outras bactérias não simbioss e também ao pouco conhecimento acumulado a respeito desses tipos de bactérias. Atualmente, pesquisadores tentam agrupar os rizóbios baseando-se não apenas em genes estruturais conservados, como o 16S rDNA, mas também em genes específicos encontrados nos rizóbios que refletem suas características simbióticas. Um exemplo é o gene de nodulação (genes *nod*) e o gene de codificação do complexo dinitrogenase (genes *nif*). Mas comparações entre as árvores filogenéticas obtidas das análises destes genes apresentam inúmeras incongruências. Muitas

delas devem-se a grande instabilidade genômica dos rizóbios, visto que os genes *nod* e *nif* estão frequentemente localizados em elementos transmissíveis, como plasmídeos ou transposons, especialmente em bactérias capazes de nodular o feijoeiro. Isto permite um intenso intercâmbio entre rizóbios e outras bactérias não nodulantes, resultando numa enorme variedade genotípica.

#### **2.4. Aspectos evolutivos dos rizóbios que nodulam o feijoeiro comum**

Segundo Graham e Vance (2000), com a habilidade em captar e fixar N<sub>2</sub>, os rizóbios que nodulam o feijoeiro apresentam ampla distribuição geográfica e longa co-evolução com a planta hospedeira. Expressam grande heterogeneidade, uma vez que o macrossimbionte pode atrair geneticamente vários simbioses. Algumas dessas bactérias são capazes de nodular diferentes leguminosas. Através da simbiose, estima-se que são fixados, anualmente, 44 a 66 milhões de toneladas de N<sub>2</sub>, que atendem cerca da metade da necessidade deste elemento na agricultura mundial.

As bactérias do gênero *Rhizobium* capazes de nodular o feijoeiro foram classificadas, em um primeiro momento, como *Rhizobium phaseoli*. Mas 50 anos mais tarde, com uma melhor caracterização fisiológica, bioquímica e genética, foram reclassificadas na espécie *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (JORDAN, 1984). Com os avanços das técnicas moleculares constatou-se que tais bactérias apresentavam características genéticas e fisiológicas distintas, sendo divididas em dois grupos: Tipo I e Tipo II. Em 1991 as estirpes do Tipo II foram elevadas à categoria de espécie, sendo denominadas *Rhizobium tropici*. As bactérias pertencentes a esta nova espécie são aeróbias, gram-negativas, com pH ótimo para crescimento variando entre 5 e 7 e crescendo em temperaturas de até 40°C. Esta espécie não nodula exclusivamente *Phaseolus vulgaris*, podendo ser isolada de outras leguminosas como *Leucaena esculenta* e *L. leucocephala*. Mais tarde ocorreu a divisão desta espécie em dois subgrupos: IIA e IIB, sendo que a estirpe padrão para IIA é a CIAT899 (SEMIA 4077) e para a IIB é a CFN299 (ELKAN, 1992). Alguns estudos têm descrito diferenças entre os dois grupos, incluindo análises de PCR

com sequências repetitivas (VAN BERKUM; BEYENE; EARDLY, 1996) e a presença de megaplasmídeos (GENIAUX *et al.*, 1995). Quanto às diferenças fisiológicas, as estirpes do Tipo IIB apresentam maior tolerância à acidez (GRAHAM *et al.*, 1994) e a temperaturas elevadas (HUNGRIA; FRANCO; SPRENT, 1993; MERCANTE; GOI; FRANCO, 2002).

Em 1993, a análise de sequências de nucleotídeos do gene 16S rDNA de isolados americanos obtidos de feijoeiro levaram a definição de uma nova espécie, denominada *Rhizobium etli*, a qual possui pelo menos um biovar, *Rhizobium etli* bv. phaseoli e está classificada como estirpe do Tipo I. Essa nova espécie foi descrita como aeróbica, gram-negativa, com temperatura máxima de crescimento de 35°C. Além disso, nodula apenas *Phaseolus vulgaris* e possui como estirpe padrão a CFN42 (USDA 9032) (SEGOVIA; YOUNG; MARTÍNEZ-ROMERO, 1993).

Atualmente, cinco espécies do gênero *Rhizobium* têm sido descritas como capazes de nodular o feijão comum, na maioria dos casos com fixação de N<sub>2</sub>: *R. leguminosarum* bv. phaseoli, *R. tropici*, *R. etli* bv. phaseoli, *R. gallicum* (bv. gallicum and bv. phaseoli) e *R. giardinii* (bv. giardinii and bv. phaseoli) (JORDAN, 1984).

Segundo Pinto; Hungria; Mercante (2007), outros isolados geneticamente diferentes têm sido encontrados em nódulos do feijoeiro, podendo representar novas espécies. Descobertas recentes (ESTRADA DE LOS SANTOS *et al.*, 2001) apontam bactérias do gênero *Burkholderia* nodulando leguminosas, sendo que as mesmas foram encontradas, inicialmente, em associação com plantas de milho e café e, de acordo com perfis de restrição e sequências do gene 16S rDNA, se apresentaram estreitamente relacionadas a espécies fixadoras de nitrogênio.

O microsimbionte dominante tanto no centro de diversidade Mesoamericano quanto no Andino é o *Rhizobium etli*, no entanto, estudos demonstraram que *R. tropici* mostrou-se dominante em plantas crescidas a campo no Brasil, possivelmente devido a sua capacidade em estabelecer simbiose efetiva em condições de alta temperatura e baixo pH, predominantes no país. Também apresentam alta competitividade e estabilidade genética nestas condições (PINTO; HUNGRIA; MERCANTE, 2007). Estudos recentes realizados por Grange *et al.* (2006) sugerem que *R. tropici* pode ter sido introduzido no Brasil em solos mais antigos, ou pode ser um simbionte de alguma espécie de legume indígena que,

devido a sua tolerância a solos ácidos e condições de alta temperatura, transformou-se no microsimbionte predominante do feijoeiro.

A alta porcentagem de ocupação dos nódulos do feijoeiro por *R. tropici* em condições de campo no Brasil não são observadas quando o solo é diluído, sendo nesta condição *R. etli* a população predominante (GRANGE; HUNGRIA, 2004). Tais variações podem ser explicadas por estudos realizados por Alberton; Kaschuk; Hungria (2006) que evidenciaram uma clara diferença entre as concentrações de rizóbios encontrados em condições de campo e rizóbios encontrados em diluições de solo. Essa diferença de concentrações entre os microsimbiontes nessas duas condições demonstra que *R. tropici* pode bloquear a nodulação de *R. etli*, sendo que este bloqueio pode ser a causa da baixa eficiência na FBN observada nos trópicos.

Resultados obtidos por Pinto; Hungria; Mercante (2007), através da análise de RFLP-PCR dos genes 16S e 23S rRNA, e sequenciamento do gene 16S rRNA e RFLP-PCR dos genes *nifH* e *nodC*, demonstraram uma alta variabilidade nos genes ribossômicos de isolados de *R. tropici* de diferentes regiões do Brasil, indicando que podem ser divididos em espécies diferentes. Por outro lado, os genes *nifH* e *nodC* apresentaram alta similaridade, o que pode refletir uma vantagem evolucionária para maximizar a fixação do nitrogênio.

Em outro estudo realizado por Grange *et al.* (2006), pela análise do gene 16S rRNA, houve alta similaridade deste gene e do *nodABC* entre isolados de *R. etli* de diferentes localidades do Brasil e uma estirpe de origem Mexicana, contribuindo para os estudos que investigam a origem das estirpes brasileiras.

## **2.5. Utilização de inoculantes na cultura do feijoeiro**

Inoculantes são definidos como sendo todo material que contém microrganismos atuando favoravelmente no desenvolvimento das plantas, sendo composto por bactérias específicas para cada espécie de leguminosa. Por este motivo, o produto preparado para uma leguminosa não pode ser utilizado em outras espécies. Sendo assim, a utilização destes produtos atua de maneira a aumentar a produtividade da cultura (EMBRAPA, 2007).

Segundo Hungria (1994), os inoculantes para a cultura do feijoeiro são pouco utilizados pelos agricultores brasileiros, pouco valorizados pelos pesquisadores e pela extensão agropecuária, representando menos de 1% do mercado nacional. Os solos brasileiros são ricos em bactérias nativas capazes de nodular o feijoeiro, mas não passaram por um processo de seleção não sendo, de modo geral, eficientes. Além disso, bactérias do gênero *Rhizobium* em geral apresentam os genes responsáveis pelo processo simbiótico em elementos transmissíveis, como os plasmídeos, tornando mais fácil a perda dos mesmos e conseqüente perda da capacidade de nodulação e FBN. O problema é agravado porque no Brasil não foi conduzido, para esta cultura, um forte e persistente programa de pesquisa em FBN. Finalmente, segundo a autora, a esses fatores desfavoráveis deve ser somada a maior suscetibilidade do feijoeiro a estresses ambientais, como temperaturas elevadas do solo, deficiências hídricas, e também às diversas doenças a que são suscetíveis. Desse modo, o investimento na difusão dessa tecnologia representa um grande benefício para o País, no aumento da produção de grãos dessa leguminosa tão importante na alimentação dos brasileiros.

Ainda no Brasil, durante muito tempo o inoculante foi produzido utilizando-se o rizóbio da espécie *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. Também algumas bactérias eram provenientes do exterior e testadas pelas instituições de pesquisa no Brasil. Com a evolução dos estudos taxonômicos, revelando os diferentes agrupamentos de isolados com características simbióticas e adaptação ecológica distinta, incluindo isolados das regiões de clima tropical, revelou-se a inequação das estirpes tradicionalmente recomendadas para as nossas condições de cultivo. É importante não desconsiderar que as estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e *R. etli* estão sujeitas a um elevado grau de instabilidade genética, o que explica, pelo menos parcialmente, a decepção de muitos agricultores com a utilização do inoculante no feijão. O inoculante comercial para o feijoeiro no Brasil é produzido com uma espécie de rizóbio adaptada aos solos tropicais, o *R. tropici*, a qual é resistente a altas temperaturas, acidez do solo e é altamente competitiva. As estirpes são recomendadas pela RELARE (Rede de Laboratórios para a Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola). Ou seja, em condições de cultivo favoráveis é capaz de infectar e formar a maioria dos nódulos, devido ao seu predomínio sobre a população de rizóbio presente no solo (STRALIOTTO *et al.*, 1999).

Tendo em vista a alta capacidade do *R. tropici* em fixar N<sub>2</sub>, um programa de seleção de estirpes foi estabelecido no Brasil em 1994, onde o critério inicial era a capacidade de formar nódulos tanto no feijoeiro comum quanto em *Leucaena spp.* e o crescimento *in vitro* em elevadas temperaturas (MARTÍNEZ-ROMERO *et al.*, 1991), sabendo-se que somente a espécie *R. tropici* apresenta tais características. Três estirpes foram identificadas através deste programa, capazes de suprir nitrogênio suficiente para produção de grãos de 2500 Kg/ha ou mais (HUNGRIA *et al.* 2000).

Não só o aumento da produtividade o uso de inoculantes gera como benefício, mas também a melhoria da qualidade dos solos, redução de custos, redução da quantidade de adubos nitrogenados e, conseqüente, preservação ambiental (EMBRAPA, 2007).

## **2.6. Estudos de diversidade bacteriana quanto à FBN**

Além da contribuição de todo o conhecimento da biodiversidade do solo e da utilização de coleções de rizóbios, ensaios sobre sua diversidade genética desempenham importante papel no desenvolvimento a longo prazo de estratégias que aumentem a contribuição da FBN na agricultura mundial. Particularmente na última década, impressionantes progressos têm sido alcançados para o entendimento da diversidade genética dos rizóbios, com a aplicação de várias técnicas de análise do DNA. Alguns exemplos são amplificações de DNA de rizóbio com *primers* específicos como REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*), ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*), BOX (*Box Element*)(DE BRUIJIN, 1992; VERSALOVIC *et al.*, 1994; CHEN *et al.*, 2000; FERREIRA; HUNGRIA, 2002; MOSTASSO *et al.*, 2002; GRANGE; HUNGRIA, 2004; KASCHUK *et al.*, 2006), análise de genes ribossomais (rRNA 16S e 23S) e regiões intergênicas através de RFLP (“Restriction Fragment Length Polimorphism”) e seqüência de DNA (LAGUERRE *et al.*, 1996; VINUESA *et al.*, 1998; CHEN *et al.*, 2000; BERNAL; GRAHAM, 2001; ANDRADE; MURPHY, GILLER, 2002; MOSTASSO *et al.*, 2002; GRANGE; HUNGRIA, 2004; KASCHUK *et al.*, 2006). Associado ao contínuo

refinamento de técnicas moleculares, os estudos de diversidade normalmente são realizados a partir de simples amostragens de bactérias do solo. Na maioria deles, os rizóbios são obtidos a partir de plantas inoculadas com diluições em série de solo (SESSITSCH *et al.*, 1997; MERCANTE *et al.*, 1998; STRALIOTTO *et al.*, 1999; FERREIRA *et al.*, 2000; BALA; MURPHY; GILLER, 2001; ANDRADE; MURPHY; GILLER, 2002; FERREIRA; HUNGRIA, 2002; GRANGE; HUNGRIA, 2004) ou de nódulos de plantas cultivadas no campo (EARDLY *et al.*, 1995; SULLIVAN *et al.*, 1995; MARTINEZ-ROMERO *et al.*, 1991; VASQUEZ-ARROYO *et al.*, 1998; CHEN *et al.*, 2000; DIOUF *et al.*, 2000; MOSTASSO *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2003). Menos comuns são os métodos de cultivo de plantas em vasos com solo (PALMER; YOUNG, 2000) ou em tubos contendo solução isenta de nitrogênio (HARRISON; YOUNG; JONES, 1987; FRÉMONT *et al.*, 1999). Ainda podem ser isolados do solo sem a planta hospedeira, usando placa de Petri, contendo meio sólido seletivo (BROMFIELD; WHEATCROFT; BARRAN, 1994; LOUVRIER; LAGUERRE; AMARGER, 1996).

No Brasil, a soja e o feijão são as leguminosas mais cultivadas. Por apresentarem contrastantes histórias evolutivas, os métodos utilizados na análise bacteriana podem interferir na magnitude dos resultados obtidos em estudos de sua diversidade. A soja é uma cultura exótica introduzida no século passado com centro de origem Chinês (VAVILOV, 1992). Os rizóbios sofreram um processo adaptativo aos solos brasileiros via inoculantes comerciais, produzidos com estirpes previamente selecionadas. Estudos de diversidade no Brasil Central, em solos dos Cerrados, demonstraram alta magnitude de transformação bacteriana horizontal e conseqüente alteração do perfil genético. Esta resposta adaptativa deve-se às elevadas temperaturas e ao baixo pH (SANTOS; VARGAS; HUNGRIA, 1999; FERREIRA *et al.*, 2000; FERREIRA; HUNGRIA, 2002; GALLI-TERASAWA; GLIENKE-BLANCO; HUNGRIA, 2003). Um dos resultados observados é a provável transferência lateral de genes simbióticos de *B. japonicum* para espécies nativas dos solos brasileiros, *B. elkanii* e *Sinorhizobium (Ensifer) fredii*, tornando as mesmas capazes de estabelecer simbiose com uma planta exótica (BARCELLOS *et al.*, 2007). No caso do feijão, de origem americana, populações de rizóbio indígenas capazes de nodular essa leguminosa, são estimadas, em solos brasileiros, em  $10^3$  –  $10^6$  células por grama de solo e expressam alto nível de diversidade genética. São competitivas, mas apresentam baixa eficiência na FBN (HUNGRIA; VARGAS, 2000;

HUNGRIA *et al.*, 2003; ANDRADE; MURPHY; GILLER, 2002). Segundo Alberton; Kaschuk; Hungria (2006), o método de amostragem escolhido interfere diretamente na expressão da diversidade do rizóbio, onde soja e feijão apresentaram resultados divergentes quanto à nodulação de campo e diluição  $10^{-4}$  de solo inoculado em planta isca. Na soja, em função da menor competitividade das estirpes no solo, foi observado maior espectro de nodulação. No feijão, a alta competitividade das estirpes, aliada à alta promiscuidade dos genótipos da planta, que são capazes de sinalizar a nodulação para muitos tipos de rizóbio, resultou em nodulação a campo pouco expressiva quanto à variabilidade genética, avaliada por BOX-PCR, que agrupou 70% dos perfis obtidos. Na soja o comportamento foi inverso, pois o índice de competitividade é menor, permitindo captar maior diversidade do que utilizando diluições de solo. Também a avaliação de características morfofisiológicas acompanhou esta tendência.

A análise genética por meio de PCR (“Polymerase Chain Reaction”) utilizando *primers* específicos na rizobiologia tem desempenhado importante papel nos estudos de diversidade genética. Sequências repetitivas intergênicas, de consenso, dispersas no genoma bacteriano, conhecidas como ERIC, REP e BOX, geram padrões altamente característicos quando separados em gel de agarose (DE BRUIJN, 1992; VERSALOVIC *et al.*, 1994). As seqüências REP consistem de repetições invertidas de 35-40 pb e são encontradas em *clusters*, onde cópias sucessivas são organizadas em orientação alternada. As seqüências ERIC têm o tamanho de 124-127 pares de bases. Tanto as seqüências ERIC quanto os elementos REP estão localizados em regiões não codificadoras, mas que provavelmente são transcritas e possuem potencial para formar estruturas secundárias. As seqüências BOX assemelham-se mais a ERIC quanto ao tamanho, parecendo estar envolvidas na duplicação do DNA. Sua ação seria com a DNA girase e terminação da transcrição (MEHTA, 2000). Os padrões de amplificação são menos complexos que os obtidos com REP, mas permitem uma boa discriminação em nível de estirpe (OLIVE; BEAN, 1999).

Atualmente os critérios de agrupamento e/ou classificação taxonômica têm-se baseado em análises filogenéticas moleculares. Sequências de nucleotídeos altamente conservadas em bactérias têm sido o fundamento para a revisão das reais inter-relações entre espécies, gêneros ou mesmo famílias (OLSEN; WOESE; OVERBEEK, 1994). O uso da seqüência de nucleotídeos do gene que codifica o



16S rRNA (subunidade menor do ribossomo) foi estabelecido como método padrão de análise em procariontes.

Os genes rRNA são essenciais para a sobrevivência de todos os organismos, uma vez que sua manifestação ocorre nos ribossomos, local da tradução dos genes transcritos no DNA pelo mRNA em peptídeos (síntese protéica). Assim, a seqüência destes genes corresponde a domínios altamente conservados (AMANN; LUDWIG; ACHLEIFER, 1995; WOESE, 1987).

Em um dos estudos pioneiros de filogenia a partir de 16S rRNA foi utilizado o fragmento obtido com os oligonucleotídeos iniciadores Y1 e Y2 (YOUNG; DOWNER; EARDLY, 1991), de 300 pares de bases, correspondente ao início do gene (YOUNG, 1993). Atualmente, os estudos têm utilizado o seqüenciamento total dos genes (16S rRNA e 23S rRNA), bem como regiões intergênicas (IGS) para estudos desta natureza (GURTLER; STANISH, 1996).

A caracterização da seqüência do gene ribossomal 16S rRNA tem sido amplamente utilizada em estudos evolucionários, taxonômicos e ecológicos (FOX; WISOTZKEY; JURTSUK, 1992; OLSEN; WOESE; OVERBEEK, 1994). A amplificação direta via PCR do 16S rRNA a partir de amostras de solo tornou possível o estudo da diversidade microbiana sem a necessidade de cultivar o microrganismo (WARD; WLLER; BATESON, 1990).

Segundo Laguerre *et al.* (2001), os métodos que mostraram maior confiabilidade para o agrupamento de estirpes de rizóbio foram o sequenciamento, parcial ou total, do gene 16S rDNA, a amplificação do DNA com *primers* específicos pela PCR e a fragmentação do DNA pelas enzimas de restrição através da técnica de RFLP. Além disso, para que a FBN traga benefícios maiores para a cultura do feijoeiro é necessário que se identifique a diversidade das estirpes brasileiras em termos taxonômicos por meio de análises envolvendo parâmetros morfológicos, fisiológicos e genéticos, para então identificar estirpes com maior capacidade de fixação de nitrogênio, maior competitividade e maior estabilidade genética (HUNGRIA *et al.*, 1997).

Em relação a trabalhos realizados cujos métodos são baseados na amplificação por PCR de seqüências repetitivas (rep-elements), outro exemplo é o estudo conduzido por Kaschuk *et al.* (2006), cuja análise inclui bactérias isoladas de feijoeiro sob dois sistemas de cultivo diferentes, convencional e plantio direto, quanto aos perfis de BOX-PCR. Os resultados demonstraram que, apesar da grande

diversidade genética existente entre ambos os sistemas, quando analisados em conjunto os isolados apresentaram tendência de agrupamento de acordo com o respectivo tratamento do solo. Estes resultados indicaram que os rizóbios variam de acordo com o manejo do solo.

Resultados semelhantes foram obtidos por Grange (2005), onde rizóbios provenientes de solos sem cultivo, com cultivo de leguminosas e com cultivo de não-leguminosas apresentaram diferenças na diversidade genética de acordo com sua origem. Nesse trabalho, a variabilidade existente entre as bactérias mostrou-se superior em áreas nativas, demonstrando que a diversidade genética dos microrganismos de um ecossistema em equilíbrio é alterada em função das práticas de manejo do solo.

Por outro lado, quando originados de ecossistemas contrastantes: um apresentando clima semi-árido, longos períodos de chuva e solo com pH neutro, e o outro, clima subtropical, chuvas bem distribuídas e solo ácido, isolados desta cultura não apresentaram diferenças significativas quanto à diversidade genética (GRANGE; HUNGRIA, 2004).

Em um estudo realizado por Giongo *et al.* (2006), foram utilizados quatro cultivares de feijoeiro como plantas-isca em solos com e sem fertilização (orgânica e mineral). A análise genética através da amplificação por ERIC-PCR mostrou grande variabilidade entre os isolados, não havendo formação de grupos específicos de cada cultivar, mas sim de acordo com o tratamento do solo. No entanto, quanto à eficiência simbiótica, houve diferenças nas respostas à inoculação, indicando que a planta hospedeira afeta diretamente a seleção de estirpes mais eficientes.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material Biológico

O material biológico utilizado neste trabalho compreende duas coleções de bactérias isoladas de nódulos de feijoeiro comum, e sete linhagens de *Rhizobium* microsimbiontes dessa leguminosa utilizadas como referência. As coleções foram montadas a partir dos isolados de solo no experimento a campo (ICA) e do experimento em vasos contendo solução nutritiva isenta de nitrogênio (IVA), e conservadas a 4° C em tubos contendo meio YMA.

#### 3.2. Meios de Cultura

##### 3.2.1. Meio YMA (VINCENT, 1970)

Manitol	10,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .3H <sub>2</sub> O	0,5 g
NaCl	0,1 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g
Extrato de Levedura	1,0 g
Ágar	15,0 g

O volume final foi completado para 1000 mL com água purificada. O pH foi ajustado entre 6,7-6,9 com NaOH 1M e/ou HCl 1N, conforme a necessidade. O meio foi autoclavado e armazenado à temperatura ambiente.

##### 3.2.2. Meio YMA- Vermelho Congo

Ao volume final de 1000 mL do meio YMA foram adicionados 2,5 mL do corante Vermelho Congo (1%). O pH foi ajustado entre 6,7-6,9 e o meio foi autoclavado e armazenado à temperatura ambiente.

### 3.2.3. Meio YMA-Azul de Bromotimol

Ao volume final de 1000 mL do meio YMA foram adicionados 5 mL do corante Azul de Bromotimol (0,5%). O pH foi ajustado entre 6,7-6,9 e o meio foi autoclavado e armazenado à temperatura ambiente.

### 3.2.4. Meio YMA- Rosa de Bengal

Ao volume final de 1000 mL do Meio YMA foram adicionados 0,033 g do fungicida Rosa de Bengal. O pH foi ajustado entre 6,7-6,9 e o meio foi autoclavado e armazenado à temperatura ambiente.

## 3.3. Soluções e Reagentes

### 3.3.1. NaCl 0,25M

NaCl	14,61 g
Água purificada	p/ 1000 mL

A solução foi autoclavada e mantida a 4 °C.

### 3.3.2. Acetato de Sódio 0,3M

Acetato de Sódio Anidro	24,63 g
Água purificada	p/ 1000 mL

A solução foi autoclavada e mantida a 4 °C.

## 3.3.3. SDS 10%

Dodecil sulfato de sódio	10 g
Água purificada	p/100 mL

A solução foi autoclavada e mantida a temperatura ambiente.

## 3.3.4. Solução Salina 0,85%

NaCl	8,5 g
Água purificada	p/ 1000 mL

A solução foi autoclavada e mantida a 4 °C.

## 3.3.5. EDTA 0,5 M

EDTA	37,22 g
Água purificada	p/ 200 mL

O pH foi ajustado para 8,0 com a adição de NaOH 1M.

## 3.3.6. Tris HCl-EDTA (TE) 10:1

Tris-HCl 1M pH8,0	1 mL
EDTA 0,5 M pH8,0	0,2m L
Água purificada	p/ 100 mL

## 3.3.7. Tris HCl-EDTA (TE) 50:20

Tris-HCl 1M pH8,0	5 mL
EDTA 0,5 M pH8,0	4 mL
Água purificada	p/ 100 mL

## 3.3.8. Tris HCl-EDTA (TE) 100:50

Tris-HCl 1M pH8,0	10 mL
EDTA 0,5 M pH8,0	10 mL
Água purificada	p/ 100 mL

## 3.3.9. PBS

NaCl	1,745 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anidro	0,568 g
Água purificada	p/ 100 mL

O pH foi ajustado para 7,4 com HCl 1M. A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

## 3.3.10. DNA polimerase

A enzima *Taq* DNA polimerase utilizada nas reações de amplificação foi da marca Invitrogen, na concentração de 5U/uL.

## 3.3.11. dNTPs

Os quatro desoxirribonucleotídeos (dAPT, dTTP, dGTP, dCTP) estoques (100mM), foram diluídos em água ultra pura a 2,5mM (solução de uso). Nas reações de amplificação, a concentração final utilizada foi de 0,3mM de cada dNTP.

## 3.3.12. Gel de Agarose (0.8%)

Agarose	0,8 g
Tampão TBE1x	100 mL

## 3.3.13. Gel e Agarose (1,5%)

Agarose	1,5 g
Tampão TBE 1x	100 mL

3.3.14. Marcador de peso molecular (DNA *Ladder* 100pb LUDWIG BIOTEC)

O marcador de peso molecular foi diluído no momento do uso na proporção de: 1 µL de marcador : 1 µL do tampão da amostra : 4 µL de água ultrapura esterilizada.

3.3.15. Marcador de peso molecular (DNA de fago lambda clivado com *Hind* III Gibco)

O marcador de peso molecular foi diluído no momento do uso na proporção de: 1 µL de marcador : 1 µL do tampão da amostra : 4 µL de água ultrapura esterilizada.

3.3.16. Solução de Brometo de Etídio (SAMBROOK *et al.*, 1998)

De acordo com SAMBROOK *et al.* (1998), foram dissolvidos 1,0% (p/v) de brometo de etídio em água destilada, agitando-se por várias horas. A solução foi estocada à temperatura ambiente. Para revelação, diluíram-se 5 µL em 100 µL de água destilada.

## 3.3.17. Tampão de Corrida TBE 10x pH 8,0

Trizma base	54 g
Ácido Bórico (H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> )	27,5 g
EDTA	4,65 g
Água purificada	p/ 500 mL

## 3.3.18. Tampão de Corrida TBE 1x pH8,0

TBE 10x	100 mL
Água purificada	p/ 900 mL

## 3.3.19. RNase

A solução foi preparada na concentração de 10 mg/mL de Tris-HCL (pH 7,5) e 15mM de NaCl, aquecida a 100°C por 15 minutos e estocada a -20°C.

## 3.3.20. Proteinase K (20 mg/mL)

A solução foi composta de 200 mg de Proteinase K em 10 mL de água ultrapura e estocada a -20°C.

## 3.3.21 Lizosima (5 mg/mL)

Para o preparo da solução foram adicionados 5 mg de Lizosima a 1 mL de Tampão TE 100:50. A solução foi estocada a -20°C.

## 3.3.22. Solução Nutritiva Livre de Nitrogênio

*Soluções estoques*

1. CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	14,705 g
Água purificada	p/100 mL
2. KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,805 g
Água purificada	p/100 mL
3. Fe-EDTA	0,367 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	6,165 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,350 g
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,0169 g
Água purificada	p/100 mL



4. H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,0124 g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,0144 g
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0,005 g
CoSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,0028 g
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,00553 g
Água purificada	p/100 mL

Um volume de 1,0 mL de cada solução estoque foi adicionado a um volume final de 1000 mL de água purificada. O pH foi ajustado para 6,8 e a solução foi esterilizada.

### **3.4. Experimento a campo**

O experimento a campo foi realizado no município de Campo Largo, Paraná, em duas áreas diferentes, identificadas como Semíia (SEM) e Produtor Rural (PDR). Em cada uma, foram semeadas quatro cultivares de feijão, duas representativas de cada centro de origem: Mesoamericano – Diamante Negro e Ouro Negro; Andino – Jalo Precoce e Goiano Precoce.

O cultivo a campo foi feito com desinfestação prévia das sementes, utilizando álcool comercial (3 minutos), hipoclorito de sódio a 10% (1 minuto) e água deionizada esterilizada (6 lavagens), conforme Vincent (1970). Foram realizadas três épocas de plantio, com intervalo de uma semana, para escape de geadas extemporâneas e períodos de baixas temperaturas, que afetam tanto o desenvolvimento das plantas quanto a nodulação.

As sementes foram distribuídas em quatro linhas de 4,0 m, para cada variedade, com espaçamento de 20 cm, totalizando 20 plantas por linha. Quarenta dias após o plantio, foram coletadas as raízes das plantas para o isolamento dos rizóbios a partir de 50 nódulos destacados ao acaso, por variedade, compondo as primeiras coleções de isolados, ICS e ICP (isolados de campo SEM e PDR, respectivamente).

### **3.5. Experimentos em vasos contendo solução nutritiva isenta de nitrogênio**

#### **3.5.1. NMP (Número Mais Provável)**

Para a montagem desse experimento foram utilizados vasos com capacidade para 500 mL, preparados com solução nutritiva isenta de nitrogênio (Ítem 3.3.22), papel absorvente poroso utilizado como suporte para a planta e papel alumínio para cobertura. Após a montagem, os vasos foram esterilizados a 121°C e 1,5 atm, durante 20 minutos (ANDRADE; HAMAKAWA, 1994).

As sementes foram desinfestadas utilizando álcool comercial, hipoclorito de sódio a 10% e água deionizada esterilizada, conforme Vincent (1970), envoltas em papel absorvente poroso umedecido com água destilada esterilizada e mantidas em estufa a 22°C por quatro dias. Após a pré-germinação, as sementes foram transferidas para os vasos.

Na diluição seriada de solo para produção de inóculo, foram amostrados os mesmos solos do experimento a campo (Ítem 3.4). Para isso, foi preparada uma suspensão com 10 g da amostra de solo diluída em 90 mL de solução esterilizada de NaCl a 0,85% que, após agitação por 30 minutos, seguiu a série de diluição até  $10^{-8}$ .

A inoculação foi realizada aproximadamente cinco dias após a transferência das sementes pré-germinadas para os vasos. De cada passo da série de diluições foi retirada uma alíquota de 1000  $\mu$ L que foi inoculada na região da radícula de cada planta.

Este experimento foi conduzido em casa de vegetação na Simbióttica – Indústria e Comércio de Produtos Agropecuários LTDA, com temperatura, umidade e luminosidade controladas.

As variedades de feijoeiro utilizadas foram: Diamante Negro (origem mesoamericana) e Jalo Precoce (origem andina), e cada fator de diluição teve duas repetições, totalizando 64 vasos (dois solos x oito fatores de diluição x duas repetições x duas variedades).

Cerca de quatro semanas após a semeadura, foram coletadas as raízes das plantas para o isolamento dos rizóbios a partir de 50 nódulos destacados ao acaso, por variedade e diluição de solo, compondo as coleções de isolados IVS1/IVS2 e

IVP1/IVP2 (isolados de vasos SEM - diluições de solo  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ , e PDR – diluições  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ , respectivamente).

A diluição em série destes solos permitiu quantificar a população bacteriana presente usando o método NMP, número mais provável (SOMASEGARAN; HOBEN, 1985).

### 3.5.2. Vasos de Leonard

Para a montagem dos vasos foram utilizadas garrafas de vidro com volume de aproximadamente 750 mL, solução nutritiva isenta de nitrogênio (Ítem 3.3.22), mistura de areia e vermiculita (1/2, v/v), papel alumínio, pedaços de corda e gazes. Depois de preparados, os vasos foram esterilizados a  $121^{\circ}\text{C}$  e 1,5 atm, durante 20 minutos (ANDRADE; HAMAKAWA, 1994).

Em cada vaso foram colocadas duas sementes dos cultivares Goiano Precoce (andino) e Diamante Negro (mesoamericano), desinfestadas com álcool comercial (3 minutos) e hipoclorito de sódio a 10% (1 minuto) e água deionizada esterilizada (6 lavagens). Na diluição seriada de solo para o inóculo das quatro variedades de feijoeiro, foi amostrado o solo SEM, do experimento a campo (Ítem 3.4).

Foi preparada uma suspensão com 10 g da amostra de solo diluída em 90 mL de solução esterilizada de NaCl a 0,85% que, após agitação por 30 minutos com pérolas de vidro, seguiu a série de diluição até  $10^{-4}$ .

A inoculação foi realizada aproximadamente 10 dias após a semeadura, após o início do desenvolvimento das plantas. Nos vasos, foi inoculado 1 mL por semente da cultura de cada tratamento. Para este experimento foram utilizados apenas os fatores de diluição  $10^{-2}$  e  $10^{-4}$ .

Cada fator de diluição teve quatro repetições para cada variedade, representativa de cada centro de origem (Andino e Mesoamericano), resultando num total de 32 vasos (dois centros de origem x quatro fatores de diluição x quatro repetições). Os vasos foram mantidos em casa de vegetação na Empresa Semilla - Genética e Melhoramento, sendo que a solução nutritiva (Ítem 3.3.22) era repostada a cada sete dias.

### **3.6. Isolamento**

As raízes coletadas foram lavadas em água corrente, sobre peneira para evitar perda de nódulos, que foram destacados com auxílio de pinça. Em uma placa de ELISA, os nódulos foram desinfestados com álcool comercial (1 minuto), hipoclorito de sódio a 10% (3 minutos) e água deionizada esterilizada (6 lavagens).

Na última lavagem com água deionizada esterilizada os nódulos foram macerados e transferidos para uma placa contendo meio YMA - Rosa de Bengal e cultivados durante cinco dias a 28°C. As placas que apresentaram crescimento bacteriano presuntivo do grupo dos rizóbios, livre de contaminação fúngica e demais bactérias, tiveram suas colônias transferidas para placas contendo meio YMA - Vermelho Congo. Após a confirmação do isolamento de bactérias mostrando morfofisiologia semelhante a *Rhizobium*, principalmente pela análise de absorção do corante vermelho Congo, a coleção foi estabelecida.

### **3.7. Caracterização morfológica das colônias**

A morfologia da colônia foi determinada através da cor, mucosidade, transparência, diâmetro, forma, bordo e elevação. A coleção foi mantida a 4°C em tubos contendo meio YMA inclinado, com azul de bromotimol 0,5% (2,5 mL para cada litro), que é indicador de pH.

#### **3.7.1. Caracterização morfológica dos isolados**

Todo material isolado foi submetido ao teste de Gram, a fim de verificar, sob MO (microscópio óptico), a morfologia de bacilos Gram-negativos, característica deste grupo de bactérias.

### **3.8. Extração do DNA total**

O DNA dos isolados foi extraído como descrito por Kaschuk *et al.* (2006), com algumas modificações. As bactérias foram crescidas em tubos de 2,0 mL contendo meio líquido YMA e mantidas sob agitação durante dois dias a 28°C. Após o crescimento a cultura de bactérias foi centrifugada a 13200g por 15 minutos e lavada por três vezes com 750 µL de PBS. Após a última lavagem o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 400 µL de TE 50:20.

Em seguida, foram adicionados 50 µL de SDS 10%, 10 µL de Lisozima, 5 µL de Proteinase K e 1 µL de RNase. A mistura foi homogenizada e incubada a 37°C por uma hora (até clarear). Após a incubação, com auxílio de um micropipetador de 1000 µL, a mistura foi homogeneizada com movimento de sucção/liberação com o objetivo de retirar a viscosidade. A seguir foram acrescentados 30 µL de NaCl 0,25M e 60 µL de AcNa 0,3M. As amostras foram homogeneizadas e deixadas em repouso por 1 hora a 4°C. Foram centrifugadas a 13200g por 15 minutos e o sobrenadante foi recolhido, transferido para tubos de 1,5 mL e adicionados de 2 vezes o volume de etanol 95% (mantido a 4°C). Incubou-se a -20°C *overnight*. No dia seguinte, após as amostras serem centrifugadas novamente a 13200g por 15 minutos, o etanol foi descartado e os precipitados colocados para secar em estufa a 37°C por 30-40 minutos e, em seguida, ressuspensos em TE 10:1. O DNA extraído foi estocado a -20°C. Todas as soluções foram previamente autoclavadas.

O DNA obtido foi quantificado e sua integridade verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8% (Ítem 3.3.12.), que foi corado com brometo de etídeo (Ítem 3.3.16.), visualizado sob luz ultravioleta e fotografado com aparato Kodak Digital Science 120. Além disso, foram preparadas diluições 1:50 e 1:100 e determinadas as absorbâncias em espectrofotômetro a 260nm, para quantificação.

### **3.9. Caracterização genética**

A caracterização genética foi realizada através da amplificação por PCR, usando *primer* específico BOX AIR (5'CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3', Invitrogen™).

#### **3.9.1. BOX-PCR**

Para a otimização da BOX-PCR foram testadas as concentrações de DNA, *primer* e MgCl<sub>2</sub>. Os ciclos utilizados também foram testados até se obter os parâmetros ideais para a reação. A reação foi realizada de acordo com as condições descritas por Kaschuk *et al.* (2005), contendo: 10ng de DNA, tampão PCR 1x, 0,3 U de *Taq* DNA polimerase, 0,6 µM de *primer*, 0,3 mM de cada dNTP, 3 mM de MgCl<sub>2</sub> e um volume final de 25 µl. A amplificação seguiu uma desnaturação inicial a 95° C por 7 minutos; 35 ciclos de 1 min a 94° C, 1 minuto a 53° C, e 3 minutos a 72° C; e extensão final de 4 minutos a 72° C. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese a 85V em gel de agarose 1,5% (3.3.13), em tampão TBE 1 X que, após 5 horas, foi corado com brometo de etídeo (3.3.16) e visualizado em um transluminador com lâmpada UV. Os géis foram fotografados por uma câmera digital Kodak Digital Science 120.

#### **3.9.2. Análise de agrupamentos**

As análises de agrupamentos, ou “clusters”, dos produtos de amplificação com BOX-PCR foram submetidas ao programa de análise Bionumerics (Applied Mathematic, Kortrijk, Belgium), com o método de agrupamento algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method, Método de agrupamento de Médias Aritméticas) e com o coeficiente de Jaccard (J) (SNEATH; SOKAL, 1973), com uma tolerância de 3%.

### **3.9.3. Diversidade genética**

Índices de diversidade (SHANNON; WEAVER, 1949) e de riqueza (CHAO; LEE, 1992), foram estimados baseados no número de isolados pertencentes ao grupo de perfis BOX-PCR, considerando 70% de similaridade na análise do cluster com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Isolados obtidos a partir do experimento a campo

A partir das amostras de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivadas na região de Bateias, Campo Largo, foram obtidos 246 isolados que estão apresentados na TABELA 01. Além das quatro coleções provenientes das diferentes cultivares de feijão, foram utilizadas como referência neste estudo sete linhagens de *Rhizobium*, uma vez que foram descritas como simbioses de feijoeiro.

**TABELA 01:** Coleções obtidas para este estudo a partir de bactérias isoladas dos nódulos de feijoeiro comum, experimento a campo

<b>Coleção (cultivares)</b>	<b>Origem</b>	<b>Número de isolados</b>
Diamante Negro (CDN)	Mesoamericana	93
Ouro Negro (CON)	Mesoamericana	36
Jalo Precoce (CJP)	Andina	71
Goiano Precoce (CGP)	Andina	46

Na área de isolamento foi observada a existência de um solo com baixos valores de pH, o que pode estar atuando seletivamente na diversidade disponível das bactérias presentes no solo, assim como no seu metabolismo. Portanto, os valores encontrados, apresentados no ANEXO I, podem alterar a diversidade favorecendo alguns microssimbiontes, como reflexo direto da faixa de pH observada (PEICK *et al.*, 1998). Além disso, a acidez do solo diminui a disponibilidade de nutrientes necessários ao desenvolvimento das plantas. A alta concentração de  $H^+ + Al^{+3}$  ( $9,00 \text{ Cmol/dm}^3$ ) encontrada confirma o nível de acidez da amostra (EMBRAPA, 2007).

O teor de N do solo também afeta o processo de nodulação pelas bactérias, na medida em que a planta absorve mais facilmente o N disponível, prioritariamente ao processo de fixação biológica, cujo gasto energético é maior. O solo utilizado



neste estudo apresentou baixa concentração de N (3,1g/kg), o que permitiu obter um grande número de nódulos (EMBRAPA, 2007).

Foi realizada a extração do DNA de todos os isolados e os que apresentaram bandas íntegras e puras, em gel de agarose, foram selecionados para as reações de amplificação por BOX-PCR, constituindo as coleções descritas na TABELA 02.

**TABELA 02:** Nomenclatura e origem dos isolados obtidos a partir do experimento a campo

<b>Nomenclatura</b>	<b>Origem</b>	<b>Total</b>
<b><i>Diamante Negro</i></b> CDN1, CDN2, CDN3, CDN4, CDN5, CDN6, CDN7, CDN8, CDN9, CDN11, CDN12, CDN13, CDN14, CDN15, CDN16, CDN17, CDN18, CDN19, CDN20, CDN21, CDN22, CDN23, CDN24, CDN26, CDN27, CDN29, CDN30, CDN32, CDN33, CDN34, CDN35, CDN36, CDN37, CDN38, CDN39, CDN40, CDN41, CDN42, CDN43, CDN44, CDN45, CDN46, CDN47, CDN48, CDN49	Mesoamericana  SEMILIA- Genética e Melhoramento / Paraná- Brasil	45
<b><i>Ouro Negro</i></b> CON3, CON4, CON5, CON7, CON8, CON9, CON10, CON11, CON13, CON15, CON16, CON17, CON19, CON20, CON22, CON23, CON24, CON25, CON26, CON27, CON28, CON30, CON31, CON33, CON34, CON35, CON36	Mesoamericana  SEMILIA- Genética e Melhoramento / Paraná- Brasil	27
<b><i>Jalo Precoce</i></b> CJP2, CJP5, CJP6, CJP8, CJP9, CJP10, CJP14, CJP20, CJP21, CJP22, CJP23, CJP26, CJP27, CJP31, CJP32, CJP33, CJP38, CJP42, CJP44, CJP48, CJP49, CJP50, CJP57, CJP61, CJP62, CJP63, CJP65, CJP66, CJP67, CJP71	Andina  SEMILIA- Genética e Melhoramento / Paraná- Brasil	30
<b><i>Goiano Precoce</i></b> CGP2, CGP3, CGP4, CGP5, CGP13, CGP14, CGP15, CGP18, CGP20, CGP21, CGP22, CGP23, CGP24, CGP26, CGP28, CGP32, CGP35, CGP36, CGP39	Andina SEMILIA- Genética e Melhoramento / Paraná- Brasil	19
<b><i>Linhagens referência</i></b> <sup>1</sup> <i>Rhizobium tropici</i> type B CIAT 899 <i>R. tropici</i> type A CFN 299 <i>R. tropici</i> PRF 81 <i>R. etli</i> bv phaseoli CFN 42 <i>R. leguminosarum</i> bv phaseoli USDA 2671 <i>R. giardinii</i> bv giardinii H 152 <i>R. gallicum</i> bv gallicum R 602	Colômbia Brasil Brasil México Inglaterra França França	07
<b>Total</b>		<b>128</b>

<sup>1</sup>Linhagens gentilmente cedidas pela Embrapa Soja-Londrina/Pr

Os primeiros plantios a campo foram realizados na localidade SEM, sendo o primeiro no mês de agosto, coincidindo com o inverno (FIGURA 03). Por esse motivo, muitas das plantas não sobreviveram, resistindo apenas algumas da cv Diamante Negro. No segundo e terceiro plantios foi montada uma estrutura em forma de arco coberto com um material plástico, com o objetivo de proteger as plantas das geadas (FIGURA 03). Esse procedimento foi bastante favorável, pois as plantas apresentaram-se mais vigorosas e suas raízes desenvolvidas com muitos nódulos. De modo geral, a cv de feijão Diamante Negro apresentou maior nodulação que as demais cultivares.



**FIGURA 03.** Estrutura montada na segunda época de plantio para proteger as plantas de geadas

De acordo com os resultados de NMP, apresentados no item 4.2., foi realizado um novo experimento a campo, na localidade PDR, com o objetivo de se trabalhar com um solo contendo uma maior concentração de bactérias.

O plantio foi realizado em fevereiro, portanto no verão, e as condições climáticas foram favoráveis ao desenvolvimento das plantas. No entanto, apesar de confirmada uma maior população bacteriana pelo NMP e pela formação de um grande número de nódulos pequenos, não houve um bom desenvolvimento da parte aérea das plantas cultivadas (FIGURA 04). Isto é indicativo de simbiose efetiva, porém ineficiente para a FBN.



**FIGURA 04.** Plantas cultivadas na localidade Produtor Rural

#### **4.1.1. Caracterização morfológica**

Os nódulos do experimento a campo foram coletados e as bactérias isoladas, dando origem às coleções descritas na TABELA 02.

Todos os isolados da localidade SEM apresentaram crescimento rápido, com formação de colônias típicas no período de dois a cinco dias em meio contendo manitol como fonte de carbono.

As bactérias foram analisadas quanto à morfologia de colônia (cor, mucosidade, transparência, diâmetro, forma, bordo e elevação), capacidade de alteração do pH do meio de cultura contendo manitol como fonte de carbono e coloração de Gram. As colônias apresentaram-se bastante homogêneas na caracterização morfológica, sendo que a amplitude de variação do diâmetro das colônias variou entre 0,3 cm a 2,2 cm, todas esbranquiçadas e opacas, com formato circular, bordas lisas, consistência cremosa. A elevação das colônias variou de convexa baixa a convexa elevada e a produção de goma de moderada a alta.

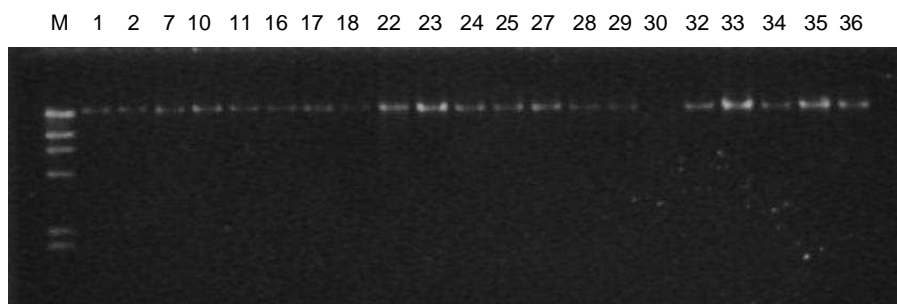
Todos os isolados acidificaram o meio e foram identificados como bacilos Gram Negativos, indicação microbiológica compatível com bactérias do grupo rizóbio capazes de nodular o feijoeiro.

Por outro lado, os isolados da localidade PDR não apresentaram as características descritas anteriormente, e absorveram o corante vermelho Congo em

meio YMA. Foram, portanto, excluídos desta análise pela falta de correspondência às características típicas deste grupo de bactérias.

#### 4.1.2. Caracterização molecular

O DNA dos isolados identificados como bacilos Gram negativos foi extraído, quantificado e sua pureza e integridade verificadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% (item 3.3.12), conforme pode ser visualizado na FIGURA 05.



**FIGURA 05.** Gel de quantificação de DNA. A primeira coluna corresponde ao marcador de peso molecular DNA  $\lambda$ HindIII. Na demais colunas estão presentes amostras de DNA de rizóbios isolados do cultivar Diamante Negro de feijoeiro

Com o objetivo de otimizar a reação de amplificação, foi realizada uma padronização da concentração do *primer* BOX-AIR. As diluições testadas foram 0,6, 1,0 e 4  $\mu$ M, sendo que na concentração de 0,6  $\mu$ M ocorreu a melhor amplificação das amostras.

Como observado nos géis de quantificação de DNA (FIGURA 05), existem diferentes padrões de intensidade de bandas, confirmada pela análise das amostras em espectrofotômetro. Das reações com concentração de 10, 25 e 50 ng, as de 10 ng apresentaram melhor reação de amplificação.

Outro fator limitante na otimização da reação de PCR foi a concentração de cloreto de magnésio, justamente por ser co-fator da enzima *Taq* DNA Polimerase. Três diferentes concentrações foram testadas (2,4, 3 e 4 mM), sendo que o melhor resultado foi observado nas reações contendo 3 mM de MgCl<sub>2</sub>.

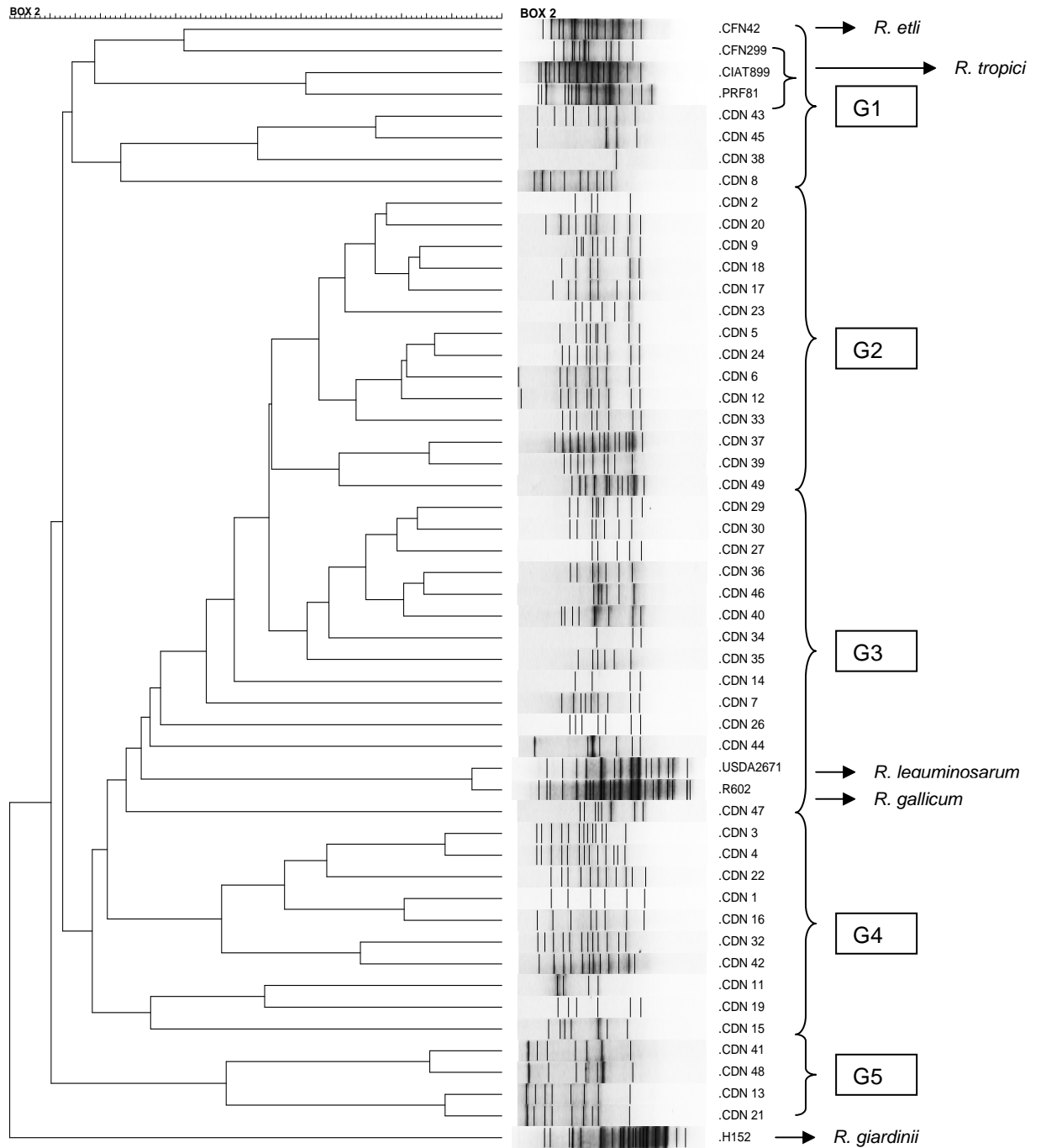
#### 4.1.2.1. Caracterização por BOX-PCR

As reações padronizadas de amplificação por BOX-PCR corresponderam a cada um dos centros de origem, Andino e Mesoamericano. Além disso, foi realizada uma reação contendo dois conjuntos das linhagens referência. Os perfis com similaridade inferior a 70% foram considerados distintos.

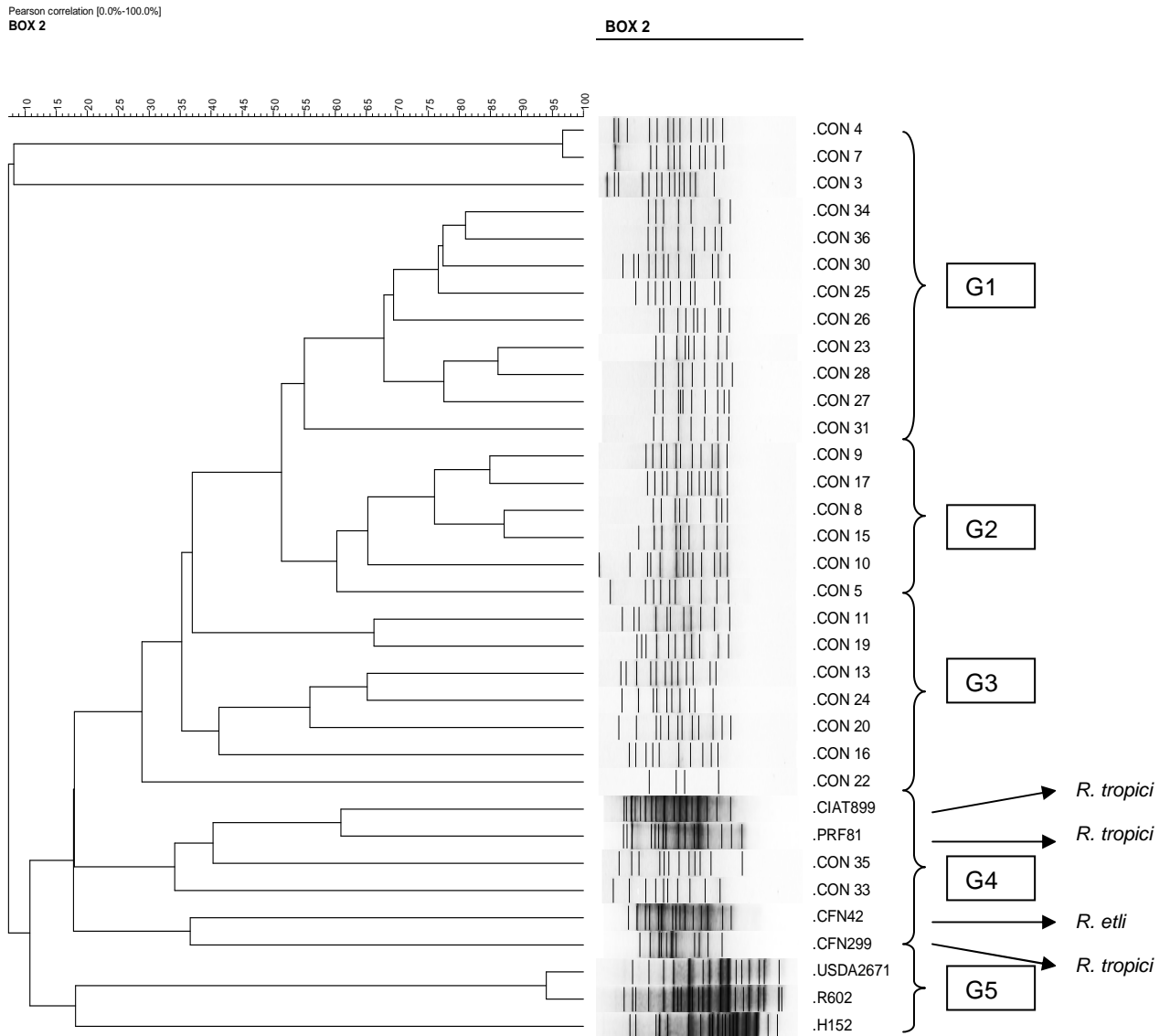
Com base nas análises de agrupamentos ou “clusters” dos produtos de amplificação com BOX-PCR, foram gerados os dendrogramas apresentados nas FIGURAS 06 a 09. Na FIGURA 06 estão representados os isolados da cultivar Diamante Negro (centro de origem Mesoamericano), onde foi constatado um alto grau de polimorfismo entre os mesmos, com a obtenção de 23 perfis de amplificação dentre 45 isolados, e uma baixa similaridade final (10,22%). Uma tendência de agrupamentos foi observada para cinco grupos (G1, G2, G3, G4 e G5), sendo que a maioria dos isolados mostrou-se mais próxima às linhagens referência *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e *R. gallicum* bv. *gallicum* (G3). Apenas 4 isolados agruparam-se com *R. tropici* e *R. etli*, enquanto que os demais estão presentes em grupos que não contêm linhagens referência, sugerindo a possibilidade da presença de novas espécies de rizóbio na região amostrada.

Já na FIGURA 07 estão presentes os isolados da cultivar Ouro Negro, do mesmo centro de origem, onde também foi observado alto grau de polimorfismo, demonstrado a partir da obtenção de 17 perfis de amplificação dentre 27 isolados com similaridade final de 17,94%. Cinco tendências de agrupamentos puderam ser observadas, sendo que neste caso as linhagens referência mais próximas foram *R. tropici* e *R. etli*.

Quanto à distribuição geográfica do *Rhizobium* que nodula o feijoeiro, a hipótese lançada por Segovia; Young; Martínez-Romero (1993) é de que a espécie *R. etli* seria encontrada originalmente na Mesoamérica, e introduzida na Europa juntamente com sua hospedeira no século XVI. Pela transferência vertical do plasmídeo simbiótico destas estirpes para *R. leguminosarum*, teria surgido *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. Os resultados encontrados na análise dos isolados de Diamante Negro dariam suporte a essa hipótese, já que apresentaram perfis de amplificação mais próximos aos desta espécie. Por outro lado, a cultivar Ouro Negro (também de origem Mesoamericana) apresentou nodulação por bactérias mais similares a uma linhagem provavelmente originária da América do Sul (*R. tropici*).



**FIGURA 06.** Dendrograma obtido com os produtos de amplificação por BOX-PCR de isolados de rizóbios obtidos de feijoeiro cultivar Diamante Negro (C.O. Mesoamericano) em experimento a campo. Análise de agrupamento utilizando o algoritmo UPGMA algoritmo e coeficiente de Jaccard



**FIGURA 07.** Dendrograma obtido com os produtos de amplificação por BOX-PCR de isolados de rizóbios obtidos de feijoeiro cultivar Ouro Negro (C.O. Mesoamericano) em experimento a campo. Análise de agrupamento utilizando o algoritmo UPGMA algoritmo e coeficiente de Jaccard

Utilizando-se os resultados de amplificação de todos os isolados do experimento a campo de feijão comum pertencente ao centro de origem Mesoamericano, foi gerado o dendrograma apresentado no ANEXO II. Nesta análise, a alta diversidade existente entre os mesmos foi confirmada. Observou-se a formação de oito grupos (G1 a G8), sendo que apenas o G3 apresentou isolados de uma só cultivar (Diamante Negro). Os demais grupos foram compostos por isolados de ambas as cultivares.

Todos os isolados do experimento a campo apresentaram crescimento rápido, característica do grupo de bactérias que nodulam o feijoeiro, sendo que estirpes com esse comportamento são mais adaptadas a solos ácidos. De acordo com Hungria; Vargas; Araújo (1997), as estirpes de crescimento rápido parecem ser taxonomicamente mais diversificadas e ecologicamente mais adaptadas do que as de crescimento lento, provavelmente porque os principais genes ligados à FBN estão em plasmídeos, o que confere maior dinamicidade ao processo.

Na FIGURA 08 estão representados os isolados da cv Jalo Precoce (centro de origem Andino), onde foi observada novamente uma grande expressão de diversidade, sendo encontrados 20 perfis de amplificação dentre 30 isolados. A similaridade final encontrada foi de 12,05%, indicando que existem bactérias geneticamente diferentes capazes de nodular esta cultivar. Uma tendência de agrupamentos foi demonstrada, podendo ser visualizada através da formação de sete grupos (G1 a G7), sendo que a maioria dos isolados apresentou-se mais próxima às linhagens referência *R. tropici* e *R. etli*.

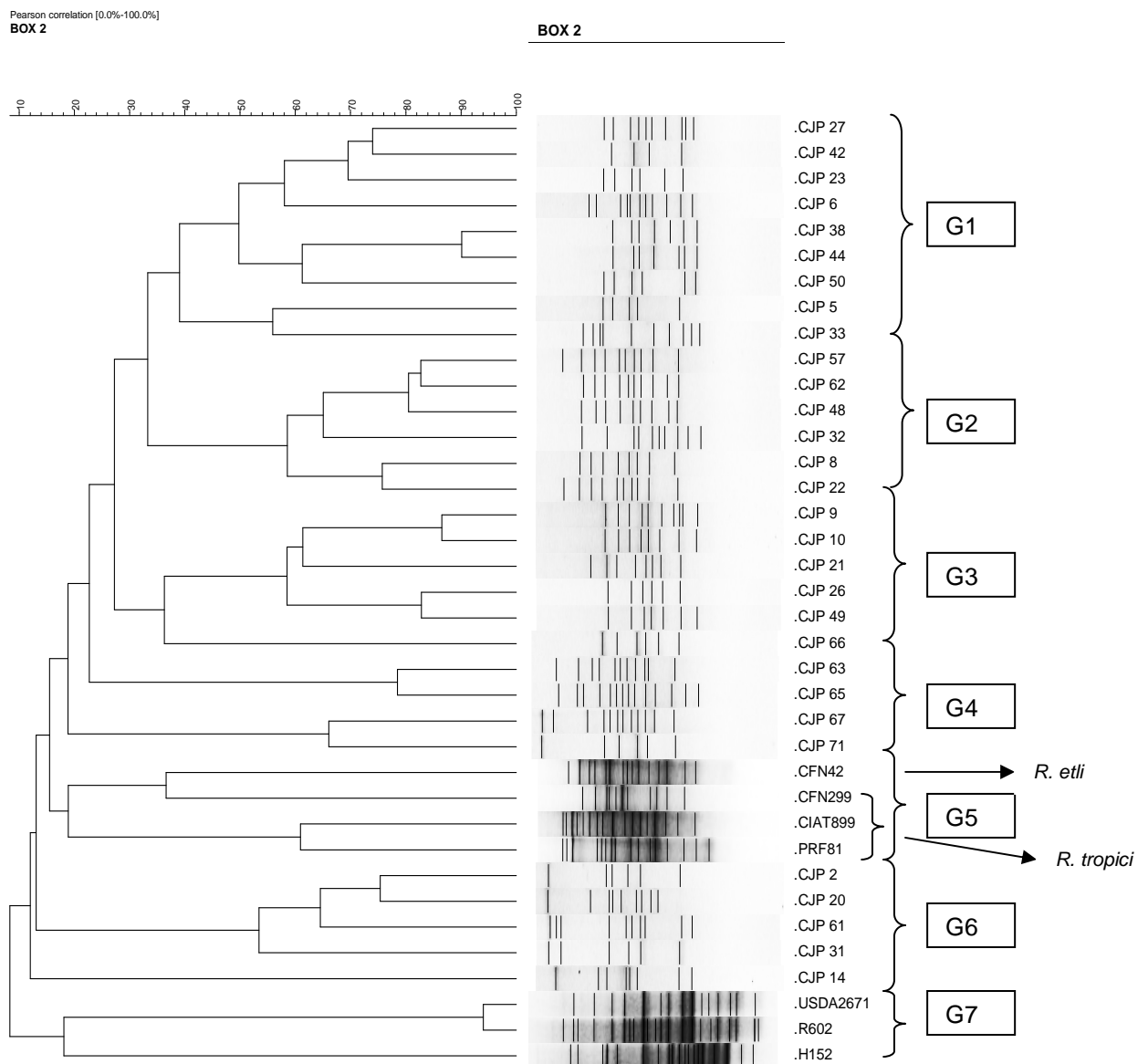
A alta diversidade também ocorreu entre os isolados da cultivar Goiano Precoce, pertencente ao mesmo centro de origem, apresentando 15 perfis de amplificação por BOX-PCR dentre 19 isolados, com similaridade de 9,53% (FIGURA 09). Houve a formação de três grupos (G1, G2 e G3), sendo que cada um deles apresentou linhagens referência. O G1 contém *R. leguminosarum* bv. phaseoli e *R. gallicum* bv. gallicum, o G2 apresenta *R. giardinii* bv giardinii e por último, *R. etli* e *R. tropici* estão presentes no G3.

Utilizando-se os resultados de amplificação de todos os isolados do experimento a campo das duas variedades de feijão comum do centro de origem Andino, foi gerado o dendrograma apresentado no ANEXO III. A análise conjunta dos mesmos confirma sua alta diversidade, já expressa anteriormente nas FIGURAS 08 e 09. Houve novamente uma tendência de agrupamentos, visualizado com a formação de quatro grupos, sendo que os isolados de cultivares diferentes não formaram grupos separados.

Segundo Martínez-Romero *et al.* (1991), a espécie *R. tropici* parece ser nativa de região tropical da América do Sul, sendo largamente encontrada no Brasil (MERCANTE *et al.*, 1998; HUNGRIA *et al.*, 1995). Neste estudo, tanto a cultivar Jalo Precoce quanto a Goiano Precoce (ambos de origem Andina) apresentaram nodulação por bactérias similares a esta estirpe, segundo perfis de amplificação por

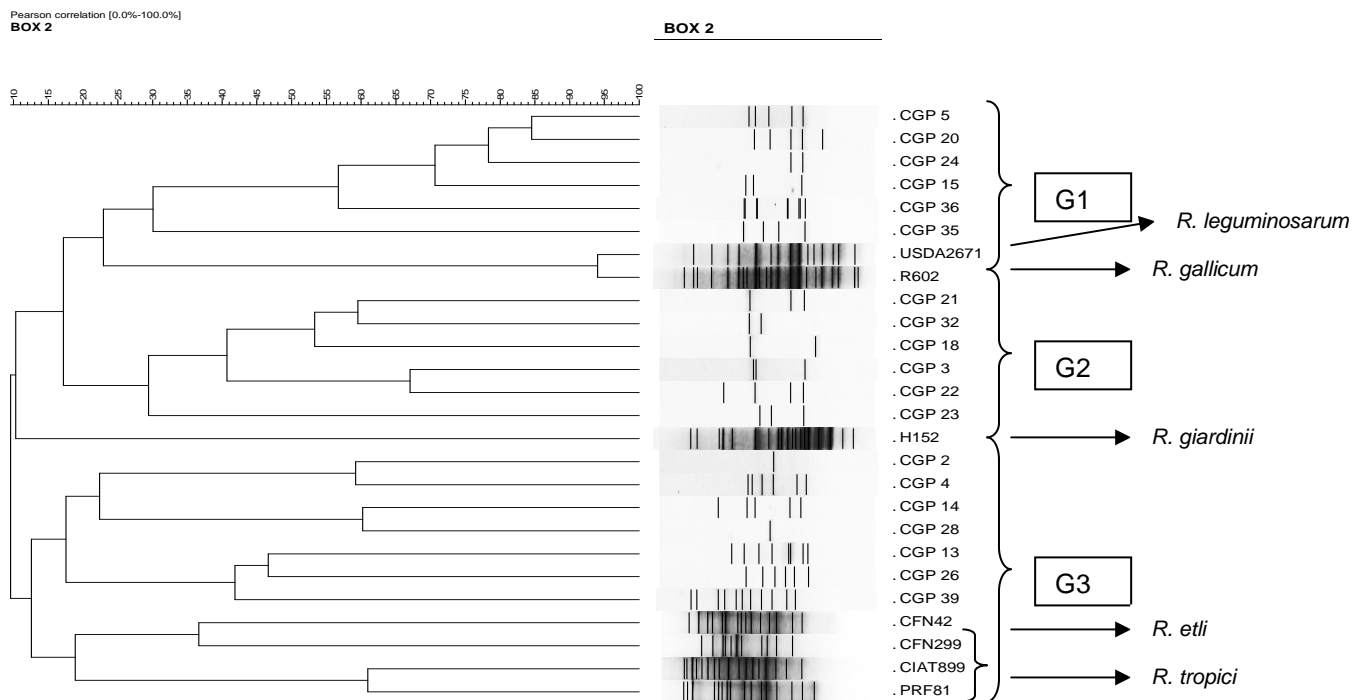


BOX-PCR. Entretanto, pelo fato do feijoeiro comum não ser nativo do Brasil (DEBOUCK, 1986), *R. tropici* pode ter sido o microssimbionte de outras plantas hospedeiras, sendo que espécies do gênero *Mimosa* e *Gliricidia* são possíveis candidatos, por apresentarem simbiose efetiva com *R. tropici* em condições de campo (MENNA *et al.*, 2006). Este fato pode justificar o aparecimento de outras espécies neste estudo.



**FIGURA 08.** Dendrograma mostrando isolados de rizóbios obtidos com feijão comum, em experimento conduzido a campo, com o cultivar Jalo Precoce (centro de origem Andino), depois da análise de agrupamento dos produtos de BOX-PCR usando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard

A predominância da espécie de *Rhizobium* não pode ser determinada com base nos resultados obtidos. Entretanto, mesmo sendo *R. etli* o microssimbionte dominante tanto no centro Mesoamericano quanto no Andino (PIÑERO *et al.*, 1988; SEGOVIA *et al.*, 1993; SOUZA *et al.*, 1994; AGUILAR *et al.*, 1998, 2004; BERNAL; GRAHAM, 2001; MARTÍNEZ-ROMERO, 2003), o mesmo não é comumente isolado de nódulos de feijoeiro cultivado a campo no Brasil. Este fato tem sido atribuído às condições estressantes do solo neste país, como a natureza ácida e altas temperaturas (HUNGRIA; VARGAS; ARAÚJO, 1997; HUNGRIA *et al.*, 2000, 2003). Por outro lado, *R. tropici* tornou-se um forte competidor, por ser tolerante a estas condições, como demonstrado por Anyango *et al.* (1995) em um estudo realizado no Quênia, onde *R. tropici* foi a espécie dominante em pH 4,5, alternando para *R. etli* em pH 6,8. Tendo em vista que no presente estudo o pH do solo revelou sua natureza ácida, o ambiente considerado é compatível com a presença de *R. tropici*. No entanto, a confirmação da espécie só poderá ser esclarecida com o estudo de seqüenciamento de genes ribossomais, que permitem a classificação dos isolados a nível de espécie, não de estirpes, como é o caso de seqüências repetitivas distribuídas no genoma (BOX, ERIC e REP).



**FIGURA 09.** Dendrograma mostrando isolados de rizóbios obtidos com feijão comum, em experimento conduzido a campo, com o cultivar Goiano Precoce (centro de origem Andino), depois da análise de agrupamento dos produtos de BOX-PCR usando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard

Neste estudo, de um modo geral, bactérias isoladas das cultivares pertencentes ao centro de origem Mesoamericano apresentaram maior número de bandas na amplificação por BOX-PCR que as isoladas das cultivares do centro de origem Andino. Além disso, as plantas do centro Mesoamericano apresentaram maior nodulação, especialmente a cultivar Diamante Negro, que também possibilitou um maior número de isolados. O melhor desenvolvimento de plantas e nódulos desta cultivar está em concordância com a provável origem mesoamericana do feijoeiro no Brasil. Os centros Mesoamericano e Andino, cujas cultivares de feijoeiro comum foram considerados neste estudo quanto à nodulação com bactérias presentes no solo utilizado, correspondem aos principais centros de origem e diversidade desta planta (FREITAS, 2006).

Cumprindo o objetivo de verificar agrupamentos entre os isolados de uma mesma variedade de feijoeiro, ou do mesmo centro de origem, foi gerado um dendrograma contendo as análises de todos os isolados, das cultivares representativas dos dois centros de origem, do experimento a campo (ANEXO IV). Nesta análise não foram observados grupos específicos correspondentes ao seu centro de origem, demonstrando que não ocorreu, neste caso, diferença significativa entre as bactérias que nodulam plantas dos diferentes centros. A diferença nos perfis de BOX-PCR apareceu entre os isolados de diferentes cultivares de feijoeiro, como discutido nas análises dos dendrogramas individuais. Nestes resultados, foram observadas diferentes tendências de agrupamentos bacterianos com linhagens referência. No entanto, devido à alta diversidade presente entre os mesmos, faz-se necessária a utilização de um suporte baseado na análise de seqüências de genes ribossomais.

Ainda, para confirmar a alta diversidade encontrada nas análises de agrupamentos baseados na amplificação por BOX-PCR, dos isolados obtidos a partir do experimento a campo, foi realizado um estudo de diversidade genética, obedecendo aos índices de diversidade (SHANNON; WEAVER, 1949) e de riqueza ACE (*Abundance-based Coverage Estimator*)(CHAO; LEE, 1992).

Para os isolados do experimento a campo os resultados são apresentados nas TABELAS 03 e 04. De acordo com os índices apresentados na TABELA 03, os isolados de Diamante Negro e Jalo Precoce têm os maiores índices de diversidades (Shannon tradicional), seguidos pelos isolados de Ouro Negro e, com menor índice, Goiano Precoce. Por outro lado, quanto à riqueza genética, os maiores valores

foram apresentados pelos isolados da cv Goiano Precoce. As cultivares Diamante Negro e Ouro Negro não diferem significativamente, enquanto que Jalo Precoce apresentou o menor índice. Mas, quando considerados os centros de origem, para os índices de diversidade não foram observadas diferenças entre o centro Andino e o Mesoamericano. Também, o mesmo não aconteceu para os valores estimados de riqueza genética, para o qual o centro Mesoamericano apresentou valores significativamente superiores em relação ao Andino.

**TABELA 03.** Índices de diversidade e riqueza genética dos isolados do experimento a campo, separados por cultivar de feijoeiro

Índice de diversidade	Diamante Negro campo	Ouro Negro campo	Jalo Precoce campo	Goiano Precoce campo
	Mesoamericano	Andino		
Shannon tradicional	3,222 ± 0,096	3,022 ± 0,103	3,222 ± 0,065	2,992 ± 0,100
Riqueza genética (ACE)	71,0 ± 20,8	82,3 ± 37,3	52,6 ± 12,7	186,6 ± 136,7
Indivíduos observados	52	34	37	26
Genótipos observados	31	24	27	22
Cobertura estimada da amostragem	0,615	0,441	0,514	0,231
Similaridade final	10,22%	17,94%	12,05%	9,53%

**TABELA 04.** Índices de diversidade e riqueza genética dos isolados do experimento a campo, separados por centro de origem do feijoeiro

Índice de diversidade	Mesoamericano campo	Andino campo	Todos Campo
Shannon tradicional	3,658 ± 0,078	3,660 ± 0,055	4,073 ± 0,059
Riqueza genética (ACE)	121,3 ± 31,1	90,5 ± 19,6	141,3 ± 24,8
Indivíduos observados	79	56	128
Genótipos observados	48	42	72
Cobertura estimada da amostragem	0,582	0,464	0,656
Similaridade final	9,59%	12,10%	11,29%

Considerando que os índices de riqueza genética ACE (*Abundance Coverage Estimator*) são baseados em estimativas a partir de genótipos raros, os rizóbios capazes de nodular cultivares de feijoeiro representativos do centro de origem Mesoamericano apresentaram uma proporção de genótipos diferentes superior ao Andino. Esta maior variabilidade genética atesta a provável origem mesoamericana do seu hospedeiro.

A grande diversidade entre os isolados de ambos os centros de origem pode estar demonstrando a transferência de genes simbióticos, já que neste grupo de

bactérias nodulantes do feijoeiro estes genes são encontrados em plasmídeos, facilitando ainda mais este processo (YOUNG; HAUKKA, 1996). Novamente, estes resultados ressaltam a importância da realização um estudo mais detalhado para comprovar a que espécies pertencem as bactérias consideradas nesta análise.

No caso da soja, pelo fato do seu centro de origem ser a China, é uma cultura introduzida no Brasil. Assim, a expressão de diversidade do seu microssimbionte é predominantemente decorrente de processos recombinatórios, tanto clássicos como recombinação horizontal (GALLI-TERASAWA *et al.*, 2003, BARCELLOS *et al.*, 2007). A cultura do feijoeiro, por outro lado, segue outra história evolutiva. Sendo Andes e América seus centros de origem naturais, é razoável esperar que, além da recombinação natural, pode haver disponibilidade de maior variabilidade genética, indicada pelo altíssimo grau de polimorfismo encontrado nesse trabalho.

#### **4.2. Isolados obtidos a partir do experimento em vasos**

A partir das amostras de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivadas em condições experimentais controladas, foram obtidos 176 isolados que estão apresentados na TABELA 05. Além das quatro coleções provenientes das diferentes cultivares de feijão, foram utilizadas sete linhagens referência, descritas somente como simbiontes de feijoeiro.

**TABELA 05:** Coleções obtidas para este estudo a partir de bactérias isoladas dos nódulos de feijoeiro comum, experimento em vasos

<b>Coleção (cultivares)</b>	<b>Origem</b>	<b>Número de isolados</b>
Diamante Negro 10 <sup>-1</sup> (V1DN)	Mesoamericana	47
Diamante Negro 10 <sup>-2</sup> (V2DN)	Mesoamericana	39
Jalo Precoce 10 <sup>-1</sup> (V1JP)	Andina	42
Jalo Precoce 10 <sup>-2</sup> (V2JP)	Andina	48

Após a extração do DNA de todos os isolados, aqueles que se apresentaram íntegros e puros foram selecionados para as reações de amplificação por BOX-PCR, constituindo as coleções descritas na TABELA 06.

**TABELA 06:** Nomenclatura e origem dos isolados obtidos a partir do experimento em vasos

<b>Nomenclatura</b>	<b>Origem</b>	<b>Total</b>
<b><i>Diamante Negro 10<sup>-1</sup></i></b> V1DN3, V1DN12, V1DN23, V1DN33, V1DN35, V1DN36, V1DN46, V1DN47	Mesoamericana Vasos contendo solução nutritiva isenta de nitrogênio, inoculados com solo SEM	08
<b><i>Diamante Negro 10<sup>-2</sup></i></b> V2DN2, V2DN3, V2DN4, V2DN5, V2DN7, V2DN8, V2DN9, V2DN10, V2DN12, V2DN15, V2DN18, V2DN21, V2DN23, V2DN24, V2DN25, V2DN27, V2DN28, V2DN29, V2DN30, V2DN31, V2DN33, V2DN34, V2DN35, V2DN36, V2DN37, V2DN38	Mesoamericana Vasos contendo solução nutritiva isenta de nitrogênio, inoculados com solo SEM	26
<b><i>Jalo Precoce 10<sup>-1</sup></i></b> V1JP2, V1JP7, V1JP8, V1JP9, V1JP13, V1JP14, V1JP15, V1JP16, V1JP17, V1JP20, V1JP24, V1JP25, V1JP27, V1JP28, V1JP42	Andina Vasos contendo solução nutritiva isenta de nitrogênio, inoculados com solo SEM	15
<b><i>Jalo Precoce 10<sup>-2</sup></i></b> V2JP1, V2JP11, V2JP12, V2JP15, V2JP16, V2JP26, V2JP27, V2JP28, V2JP35, V2JP38, V2JP40, V2JP41, V2JP43, V2JP45, V2JP46, V2JP47, V2JP48	Andina Vasos contendo solução nutritiva isenta de nitrogênio, inoculados com solo SEM	17
<b><i>Linhagens referência<sup>1</sup></i></b> <i>Rhizobium tropici</i> type B CIAT 899 <i>R. tropici</i> type A CFN 299 <i>R. tropici</i> PRF 81 <i>R. etli</i> bv phaseoli CFN 42 <i>R. leguminosarum</i> bv phaseoli USDA 2671 <i>R. giardinii</i> bv giardinii H 152 <i>R. gallicum</i> bv gallicum R 602	Colômbia Brasil Brasil México Inglaterra França França	07
<b>Total</b>		<b>128</b>

<sup>1</sup>Linhagens gentilmente cedidas pela Embrapa Soja-Londrina/Pr

No ensaio em vasos de Leonard, as plantas inicialmente apresentaram bom desenvolvimento, mas a partir do 15º dia começaram a apresentar uma nítida deficiência de nitrogênio (clorose), evidenciada por amarelidão das folhas (FIGURA 10). As plantas que resistiram foram coletadas e não apresentavam nódulos.

Por outro lado, para os vasos de NMP, houve um bom desenvolvimento das plantas e nodulação estabelecida. As concentrações determinadas foram para SEM,  $1,7 \times 10^2$  cél/g e para PDR,  $5,8 \times 10^3$  cél/g.



**FIGURA 10.** Plantas com deficiência de nitrogênio em vasos de Leonard

Nas menores diluições, as plantas apresentaram raízes contendo vários nódulos, sem sintomas de clorose nas folhas. Resultado oposto foi observado nas plantas contendo raízes não noduladas e que correspondem às maiores diluições do solo (FIGURA 11).



**Figura 11** - Plantas cultivadas em vasos contendo solução nutritiva isenta de nitrogênio. O vaso da esquerda foi inoculado com solo mais diluído ( $10^{-8}$ ), apresentando deficiência de nitrogênio (folha amarela). O da direita foi inoculado com solo mais concentrado ( $10^{-1}$ )

Na TABELA 06 encontra-se a relação dos isolados dos nódulos obtidos a partir do experimento com vasos contendo solução nutritiva. Os resultados de caracterização morfológica foram semelhantes aos descritos no experimento a campo.

#### 4.2.1. Caracterização molecular por BOX-PCR

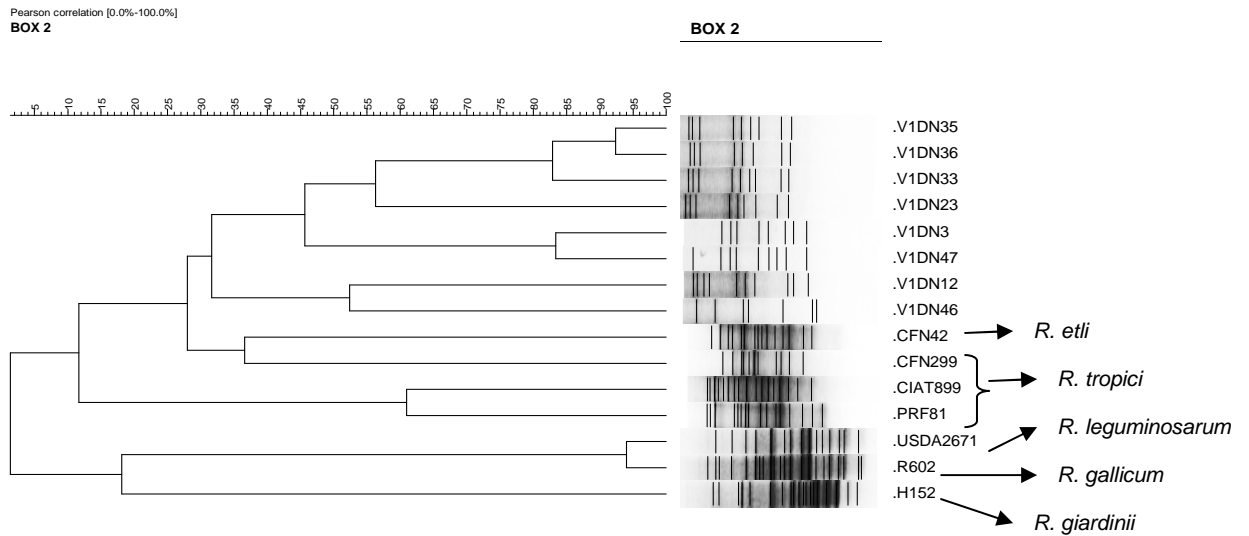
Os produtos de amplificação das quatro reações com o *primer* BOX-PCR relativas aos dois centros de origem, com as diluições  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ , geraram os dendrogramas apresentados nas FIGURAS 12 a 15, contendo neste estudo apenas uma variedade de feijoeiro de cada centro.

Nas FIGURAS 12 e 13 estão representados os isolados da cv Diamante Negro (mesoamericano), inoculada com as diluições de solo  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ , respectivamente.

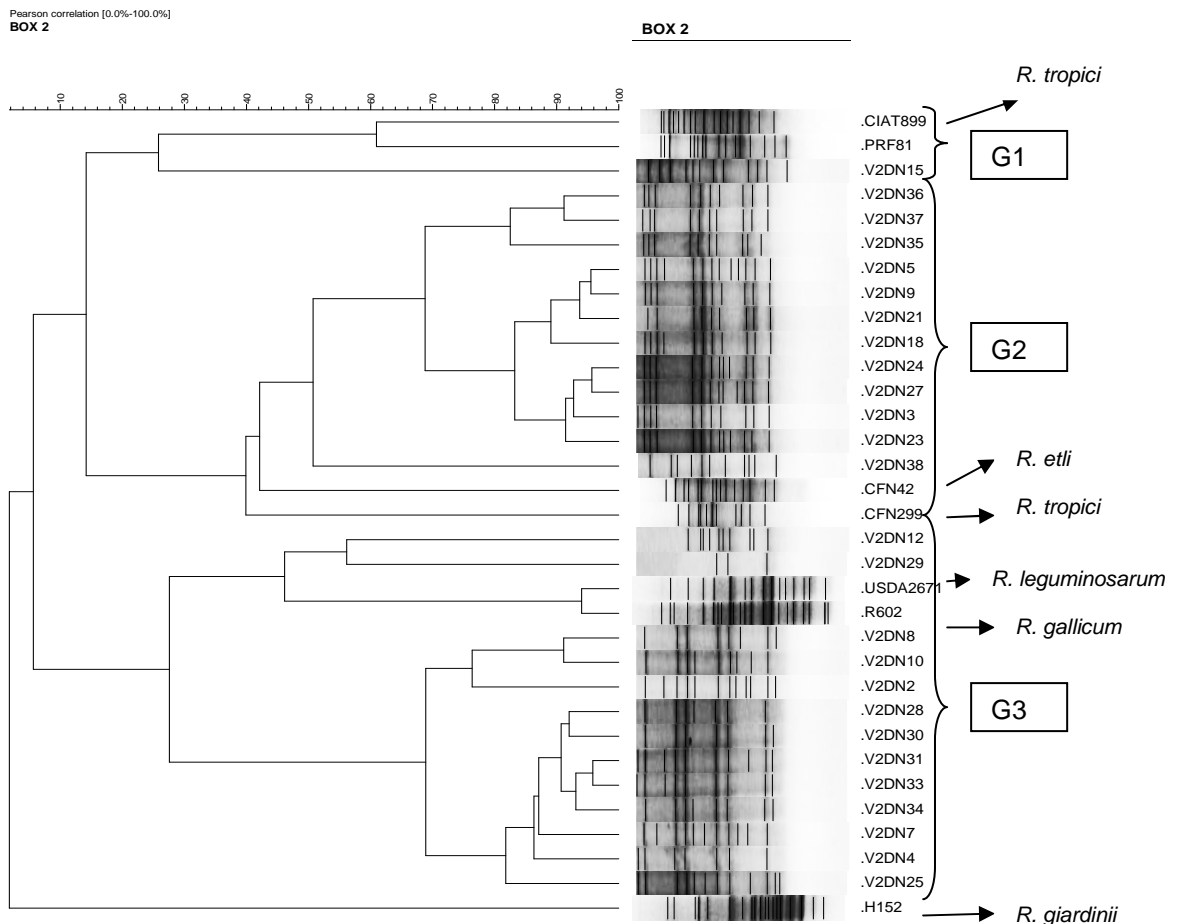
Considerando a primeira diluição, foram obtidas apenas oito amostras amplificadas, apresentando 5 perfis e similaridade final de 27,99%. Por outro lado, utilizando-se os isolados da segunda diluição, foram obtidas 26 amostras amplificadas, apresentando 8 perfis. Foram formados dois grandes grupos, além de um terceiro menor (G1) contendo as linhagens referência de *R. tropici* (CIAT899 e PRF81) e o isolado V2DN15. O G2 apresentou 12 isolados e as linhagens *R. etli* (CFN42) e *R. tropici* (CFN299), com similaridade de 39,90%, enquanto que o G3 apresentou 13 isolados e as linhagens *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (USDA2671) e *R. gallicum* bv. *gallicum* (R602), com similaridade de 27,60% entre eles. A linhagem referência *R. giardinii* bv. *giardinii* (H152) não agrupou com nenhum isolado. A similaridade final entre todos os isolados e linhagens referência foi de 5,65%.

Utilizando-se os resultados de amplificação de todos os isolados do experimento em vasos representativos do centro de origem Mesoamericano, foi gerado o dendrograma apresentado no ANEXO V. A análise conjunta demonstrou agrupamentos específicos de acordo com a diluição de solo utilizada, sugerindo que a expressão da diversidade do microssimbionte está diretamente relacionada à concentração de células na amostra. O grupo formado apenas por isolados do experimento inoculado com a primeira diluição apresentou maior nível de similaridade que os demais, indicando que houve maior nodulação por isolados mais competitivos. Sendo assim, com a diluição do solo estas bactérias estão presentes em menor concentração, possibilitando a nodulação por isolados menos competitivos.





**FIGURA 12.** Dendrograma obtido com os produtos de BOX-PCR de rizóbios isolados de feijoeiro comum (Diamante Negro, vasos inoculados com solo diluído  $10^{-1}$ ), depois da análise de agrupamento usando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard



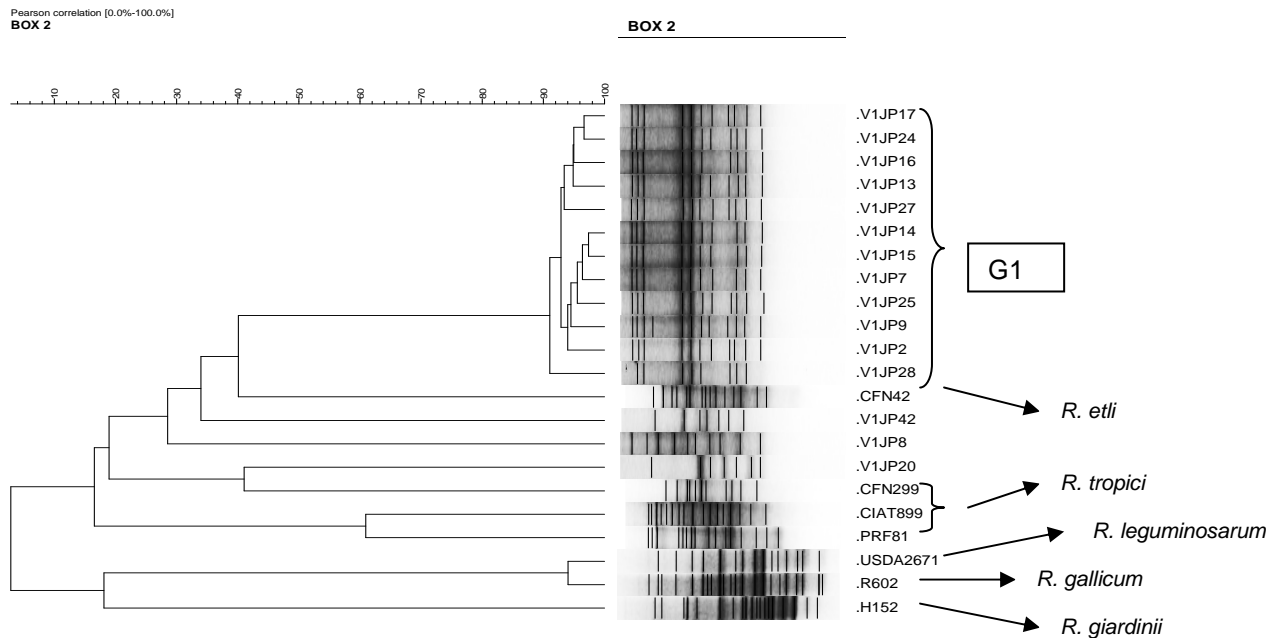
**FIGURA 13.** Dendrograma obtido com os produtos de BOX-PCR de rizóbios isolados de feijoeiro comum (Diamante Negro, vasos inoculados com solo diluído  $10^{-2}$ ), depois da análise de agrupamento usando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard

A linhagem referência que apresentou maior nível de similaridade (43,38%) com grande parte dos isolados foi *R. etli* (CFN42). Levando-se em consideração que as soluções utilizadas neste experimento tiveram o pH ajustado para 6,8, os resultados obtidos por Anyango *et al.* (1995), onde esta espécie foi predominante na faixa de pH próxima a neutralidade, foram confirmados.

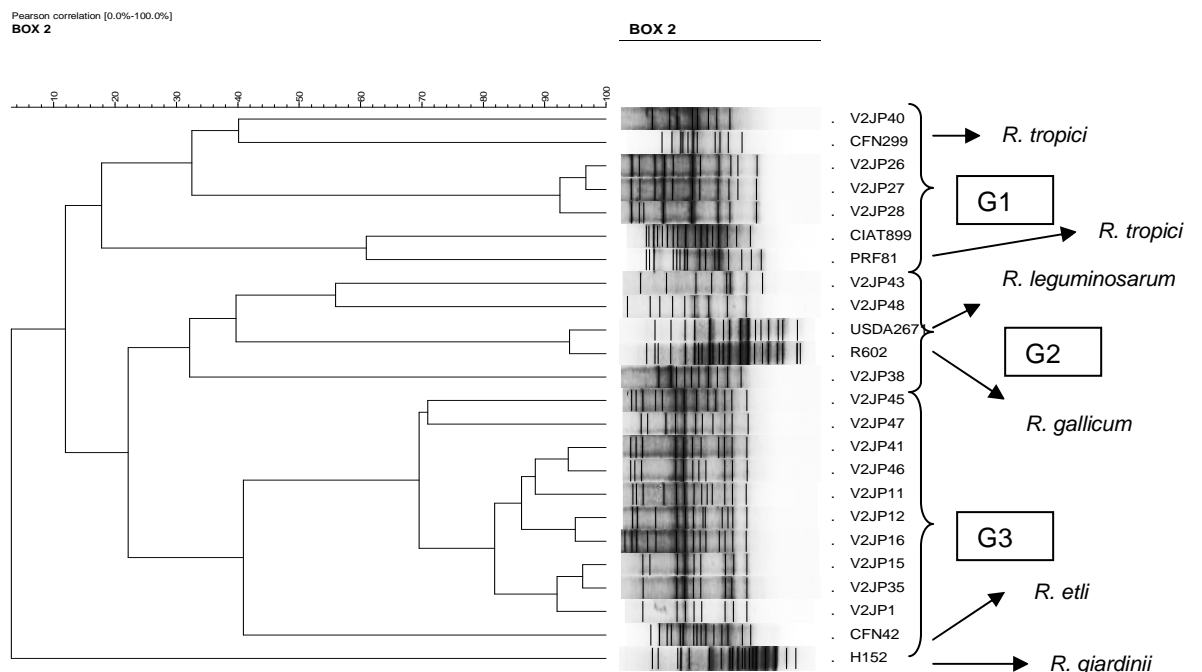
Nas FIGURAS 14 e 15 estão representados os isolados da cv Jalo Precoce (Centro Andino), diluições de solo  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ , respectivamente. Em relação à primeira diluição (FIGURA 14), foram obtidos somente quatro perfis entre 15 isolados, sendo que 12 deles apresentaram 91,02% de similaridade, formando um grupo (G1). A linhagem referência mais semelhante foi *R. etli* (CFN42), apresentando similaridade de 40,07% com os isolados do G1, confirmando sua predominância em ambientes com faixas de pHs mais próximas da neutralidade. Os demais isolados e linhagens referência não formaram grupos definidos.

Os resultados das análises do experimento inoculado com a segunda diluição apresentaram-se mais heterogêneos. Verificou-se maior diversidade, com a formação de três grupos com baixa similaridade (G1, G2 e G3). Novamente a linhagem referência *R. etli* (CFN42) apresentou-se mais similar (40,91%), formando um grupo com 10 isolados (G3). Foi observado um total de sete perfis de amplificação dentre 17 isolados, com similaridade final de 11,93%. No G1 estão quatro isolados e as linhagens de *R. tropici* (CFN299, CIAT899 e PRF81), novamente com baixa similaridade (17,79%). Por outro lado, o G2 apresentou 32,16% de similaridade, o qual inclui três isolados e as linhagens *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (USDA2671) e *R. gallicum* bv. *gallicum* (R602). A linhagem referência *R. giardinii* bv. *giardinii* (H152) não agrupou com nenhum isolado. Parece ter ocorrido nesta diluição a oportunidade de expressão de bactérias geneticamente diferentes pela diminuição da concentração de isolados competitivos observada na diluição  $10^{-1}$  (FIGURA 14). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Alberton; Kaschuk; Hungria (2006), onde foi realizado um experimento com o objetivo de avaliar a diversidade genética de isolados do feijoeiro IAPAR 81 (centro de origem Mesoamericano) por meio de dois tratamentos diferentes: isolados do solo e isolados de vasos contendo solução nutritiva isenta de nitrogênio (vasos de Leonard), inoculados com solo diluído com fator  $10^{-4}$ . A análise comparativa dos resultados evidenciou que existe uma maior variabilidade genética nos isolados dos vasos do que nos do solo. Isso é explicado devido a menor concentração de

bactérias competidoras encontradas no inóculo, como *R. tropici* que bloqueia a nodulação de outras espécies de rizóbios.



**FIGURA 14.** Dendrograma obtido com os produtos de BOX-PCR de isolados de rizóbios obtidos de feijoeiro comum (Jalo Precoce, vasos inoculados com solo diluído  $10^{-1}$ ). Análise de agrupamento utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard



**FIGURA 15.** Dendrograma obtido com os produtos de BOX-PCR de rizóbios isolados de feijoeiro comum (Jalo Precoce, vasos inoculados com solo diluído  $10^{-2}$ ), depois da análise de agrupamento utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard

Utilizando-se os resultados de amplificação de todos os isolados do experimento em vasos representativos do centro de origem Andino, foi gerado o dendrograma apresentado no ANEXO VI. Assim como nos resultados obtidos para os isolados de feijoeiro comum do centro de origem Mesoamericano, a análise conjunta dos resultados do centro Andino demonstrou tendência de agrupamentos específicos entre os isolados de acordo com a diluição de solo utilizada. Da mesma forma, na primeira diluição os isolados apresentaram maiores níveis de similaridade, confirmando que a expressão da diversidade aumenta com a diluição do solo utilizada.

A natureza promíscua do feijoeiro comum provavelmente está associada à sua habilidade em perceber sinais de nodulação de diferentes tipos de rizóbio, no entanto, existem vários trabalhos comprovando simbiose não efetiva com rizóbios indígenas (MICHIELS *et al.*, 1998; HUNGRIA *et al.*, 2000, 2003, MARTÍNEZ-ROMERO, 2003). Conseqüentemente, a promiscuidade do hospedeiro, somada à competitividade do rizóbio em altas concentrações resultam em baixa diversidade do microssimbionte. Por outro lado, a diluição do solo favorece o aumento da diversidade bacteriana entre os isolados, na medida em que diminui a quantidade de espécies mais competitivas (ALBERTON; KASCHUK; HUNGRIA, 2006). Os resultados dos experimentos em vasos deste estudo estão de acordo com os resultados obtidos por Alberton; Kaschuk; Hungria (2006), na medida em que a diversidade bacteriana é expressa na maior diluição do solo.

Com o objetivo de verificar agrupamentos entre os isolados de uma mesma variedade de feijão, foi gerado um dendrograma contendo as análises de todos os isolados do experimento em vasos (ANEXO VII), assim como de cada diluição de solo utilizada (ANEXOS VIII e IX). De um modo geral, os perfis de amplificação não diferem entre isolados de cada cultivar (ANEXOS VIII e IX). Por outro lado, quando comparados todos os isolados (duas cultivares, com as respectivas diluições), observa-se uma tendência na formação de grupos de acordo com a diluição.

Para confirmar a alta diversidade encontrada nas análises de agrupamentos baseados na amplificação dos isolados por BOX-PCR no experimento em vasos, foi realizado um estudo de diversidade genética, obedecendo aos índices de diversidade (SHANNON; WEAVER, 1949) e de riqueza ACE (*Abundance-based Coverage Estimator*)(CHAO; LEE, 1992), apresentados nas TABELAS 07, 08 e 09.

**TABELA 07.** Índices de diversidade e riqueza genética dos isolados do experimento em vasos (Mesoamericano)

Índice de diversidade	Mesoamericano vaso (DN)	Diluição 1 (DN)	Diluição 2 (DN)
Shannon tradicional	2,483 ± 0,133	2,303 ± 0,117	2,247 ± 0,154
Riqueza genética (ACE)	33,5 ± 11,4	25,7 ± 13,6	35,3 ± 16,4
Indivíduos observados	41	15	33
Genótipos observados	17	11	14
Cobertura estimada da amostragem	0,780	0,467	0,727
Similaridade final	9,19%	27,99%	5,65%

Quanto aos índices de diversidade (Shannon) não houve diferença significativa entre as duas diluições utilizadas para a cv Diamante Negro. Por outro lado, considerando-se a riqueza genética, a segunda diluição apresentou-se maior, indicando, portanto, maior diversidade. A diferença das similaridades finais entre os tratamentos é coerente com a maior variabilidade genética observada entre os isolados do experimento inoculado com solo na diluição  $10^{-2}$ , expressos na TABELA 07. Novamente, os dados gerados neste estudo seguem a mesma tendência observada pelos resultados obtidos, e já discutidos, por Alberton; Kaschuk; Hungria (2006).

**TABELA 08.** Índices de diversidade e riqueza genética dos isolados do experimento em vasos (Andino)

Índice de diversidade	Andino vaso (JP)	Diluição 1 (JP)	Diluição 2 (JP)
Shannon tradicional	1,764 ± 0,222	1,673 ± 0,252	2,232 ± 0,180
Riqueza genética (ACE)	36,5 ± 19,5	46,0 ± 44,1	42,2 ± 22,8
Indivíduos observados	39	22	24
Genótipos observados	14	10	13
Cobertura estimada da amostragem	0,744	0,636	0,625
Similaridade final	14,45%	18,96%	11,93%

Considerando os isolados de Jalo Precoce (Andino), os índices de diversidade (Shannon) foram mais elevados na segunda diluição, ainda que a riqueza genética não tenha diferido significativamente. Notou-se, mais uma vez, que a maior diversidade nesta diluição foi confirmada pela menor similaridade final (TABELA 08).

**TABELA 09.** Índices de diversidade e riqueza genética dos isolados do experimento em vasos (Mesoamericano e Andino)

Índice de diversidade	Vaso (DN + JP)	Diluição 1 (DN + JP)	Diluição 2 (DN + JP)
Shannon tradicional	2,408 ± 0,163	2,087 ± 0,209	2,391 ± 0,164
Riqueza genética (ACE)	56,2 ± 19,3	36,5 ± 19,5	67,4 ± 32,1
Indivíduos observados	73	30	50
Genótipos observados	25	14	20
Cobertura estimada da amostragem	0,795	0,667	0,720
Similaridade final	10,76%	18,01%	9,14%

Confirmando a oportunidade de expressão da variabilidade genética em diluições maiores, em condições padronizadas de cultivo, na análise conjunta dos centros de origem em diferentes diluições estão representados valores maiores de diversidade tanto nos índices de Shannon, quanto de riqueza genética para a diluição  $10^{-2}$ . Além disso, sua maior variabilidade foi confirmada pela menor similaridade final (TABELA 09).

#### **4.3. Análise conjunta dos isolados procedentes de campo e casa de vegetação**

Para verificar a existência de agrupamentos entre isolados de diferentes tratamentos foram construídos os dendrogramas representados nas FIGURAS 16 e 17. Na FIGURA 16 estão presentes todos os isolados da cv Diamante Negro (campo e vasos, mesoamericano), onde podem ser observadas tendências de agrupamentos de acordo com o experimento. O mesmo ocorre entre os isolados da cv Jalo Precoce (andino), demonstrado com a obtenção de diferentes perfis de amplificação entre os tratamentos (FIGURA 17).

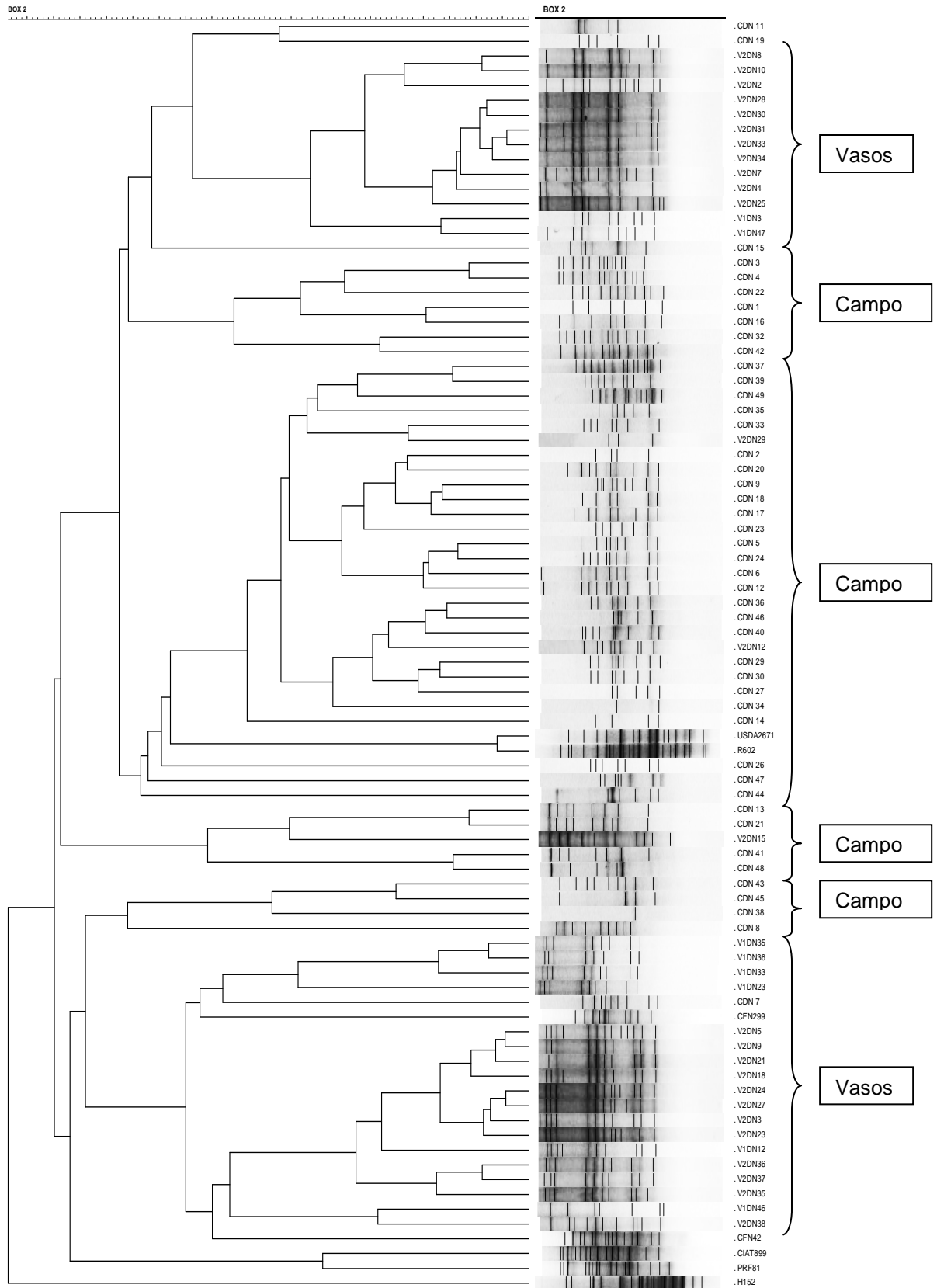
Os resultados obtidos na análise conjunta entre isolados do experimento a campo e do experimento em vasos indicam que as bactérias capazes de nodular o feijoeiro comum nas duas condições são geneticamente diferentes. Isto ocorre possivelmente devido à pressão de seleção presente em cada ambiente. Além disso, no campo a concentração de bactérias encontrada no solo foi baixa, permitindo a expressão de ampla diversidade entre os isolados. Por outro lado,

quando cultivadas em condições experimentais controladas, as plantas apresentaram nodulação por bactérias mais semelhantes geneticamente. Um provável fator limitante pode ter sido a diferença de pH entre os tratamentos, ácido em campo e neutro em vasos (ANYANGO, 1995). Supõe-se ainda que no experimento em vasos, somente bactérias mais competitivas foram capazes de estabelecer nodulação nas plantas inoculadas com solo na diluição  $10^{-1}$ . Neste caso, expressou menor diversidade em relação à diluição  $10^{-2}$ , onde a quantidade de células competitivas era menor. Na menor diluição, a chance de expressão da diversidade foi significativamente maior, como já discutido no item 4.2.

Os índices de diversidade e riqueza genética resultantes da análise conjunta entre os diferentes tratamentos estão apresentados na TABELA 10, onde podem ser observados maiores valores para os isolados de cultivares do centro de origem Mesoamericano. A expressão de maior diversidade entre bactérias que nodulam feijoeiro representativo deste centro novamente está de acordo com a possível origem mesoamericana desta cultura no Brasil.

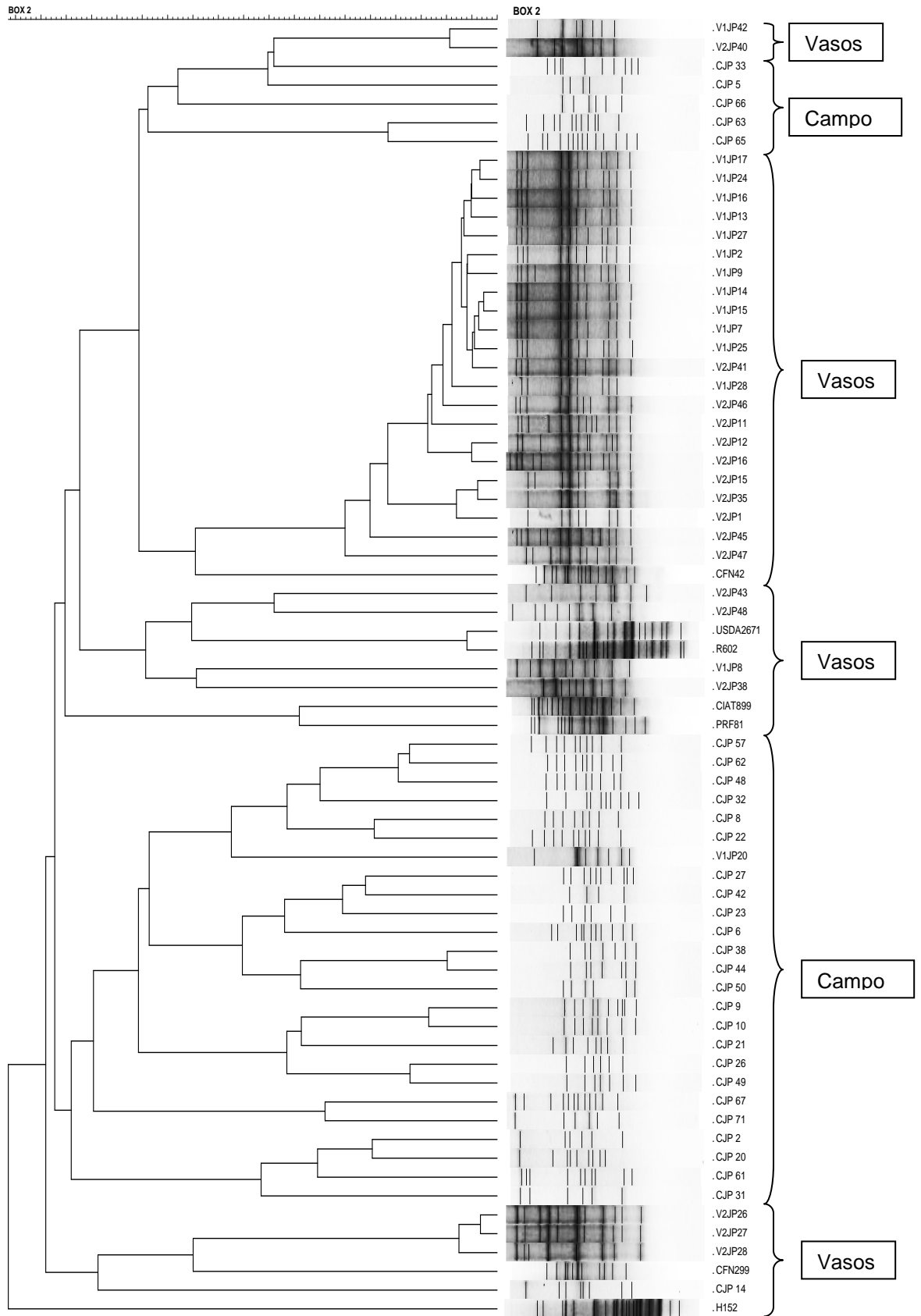
**TABELA 10.** Índices de diversidade e riqueza genética de isolados dos experimentos a campo e em vasos, separados por centro de origem

Índice de diversidade	Mesoamericano (campo + diluições)	Andino (campo + diluições)	Todos isolados
Shannon tradicional	3,422 ± 0,086	2,972 ± 0,156	4,054 ± 0,082
Riqueza genética (ACE)	79,5 ± 17,5	67,6 ± 14,5	176,6 ± 28,2
Indivíduos observados	86	69	192
Genótipos observados	41	35	91
Cobertura estimada da amostragem	0,744	0,667	0,719
Similaridade final	10,13%	10,95%	9,99%



**FIGURA 16:** Dendrograma mostrando linhagens de rizóbios isolados de feijão comum cultivado em diferentes condições (experimento a campo e em vasos, nas diluições de solo  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ , centro de origem mesoamericano), depois da análise de cluster dos produtos usando UPGMA algoritmo e coeficiente de Jaccard.





**FIGURA 17:** Dendrograma mostrando linhagens de rizóbios isolados de feijão comum cultivado em diferentes condições (experimento a campo e em vasos, nas diluições de solo  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ , centro de origem andino), depois da análise de cluster dos produtos usando UPGMA algoritmo e coeficiente de Jaccard.

## 5. CONCLUSÕES

- A diversidade genética de rizóbios microssimbiontes do feijoeiro na região de Bateias, Campo Largo, é elevada. Maior diversidade foi verificada segundo a ordem crescente solo diluído  $10^{-1}$ , solo diluído  $10^{-2}$  e campo.
- A metodologia BOX-PCR foi adequada para capturar a diversidade genética das estirpes isoladas.
- A diversidade genética dos isolados obtidos usando como planta isca cultivares de origem mesoamericana foi superior à obtida com cultivares andinos, o que deve estar relacionado à possível origem da cultura no Brasil.
- Como sugestão de continuidade de pesquisa, podem ser realizados novos estudos baseados na caracterização genética, inicialmente pelo seqüenciamento do gene 16S rRNA.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, O.M.; LOPEZ, M.V.; RICCILO, P.M.; GONZALEZ, 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 beans from the Southern Andes in Argentina. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.3520-3524, 1998.

AGUILAR, O.M.; RIVA, O.; PELTZER, E. Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. **Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.**, v.101, n.37, p.13548-13553, 2004.

ALBERTON, O.; KASCHUK, G.; HUNGRIA, M. Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean. **Soil Biology and Biochemistry**, v.38, p.1298-1307, 2006.

AMANN, R.L.; LUDWIG, W.; ACHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Reviews**, v.59, p.143-169, 1995.

ANDRADE, D.S., MURPHY, P.J., GILLER, K.E., The diversity of *Phaseolus* nodulating rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.4025-4034, 2002.

ANDRADE, D.S., HAMAKAWA, P.J. Estimativa do número de células viáveis de rizóbio no solo e em inoculantes por infecção em plantas. In: HUNGRIA, M., ARAÚJO, R.S. (Ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**, Embrapa: Brasília, p.63, 1994.

ANYANGO, B.; WILSON, K.J.; BEYNON, J.L.; GILLER, K.E. Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pHs. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, p.4016-4021, 1995.

ASUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A., STRUHL, K. (eds). **Current Protocols in Molecular Biology**, John Wiley & Sons: New York, v.1, 1988.

BALA, A., MURPHY, P., GILLER, K.E. Genetic diversity of rhizobia from natural populations varies with the soil dilution sampled. **Soil Biology & Biochemistry**, n.33, p.841-843, 2001.

BARCELLOS, F.G.; MENNA, P.; BATISTA, J.S.S.; HUNGRIA, M. Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian savannah soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.8, p.2635-2643, 2007.

BEEBE, S.; RENJIFO, J.; GAITAN, E.; DUQUE, M.C.; TOHME, J. Diversity and origin of Andean landraces of common bean. **Crop Science**, v.41, n.3, p.854-862, 2001.

BERNAL, G., GRAHAM, P.H. Diversity of rhizobia associated with *Phaseolus vulgaris* L. in Ecuador, and comparisons with Mexican bean rhizobia. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p.526-534, 2001.

BORÉM, 1998. Dicionário. Disponível em [http://www.redeambiente.org.br/dicionario.asp?letra=C&id\\_word=879](http://www.redeambiente.org.br/dicionario.asp?letra=C&id_word=879). Acesso em 10 de Janeiro de 2009.

BROMFIELD, E.S.P., WHEATCROFT, R., BARRAN, L.R. Medium for direct isolation of *Rhizobium meliloti* from soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v.26, p.423-428, 1994.

BUSO, G., AMARAL, Z., BRONDANI, R.P.V., FERREIRA M.E. Microsatellite markers for the common bean *Phaseolus vulgaris*. **Molecular Ecology Notes**, v.06, p.252-254, 2006.

CARVALHO, C.J.B.; CAVICHIOLI, R.R. **Disciplina de biogeografia**. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005. Disponível em [http://zoo.bio.ufpr.br/diptera/bz023/aula\\_11\\_teorica.htm](http://zoo.bio.ufpr.br/diptera/bz023/aula_11_teorica.htm). Acesso em 06 de Janeiro de 2009.

CHAO, A.; LEE, S.M. Estimating the number of classes via sample coverage. **Journal American. Statistic**. Association, v.87, p.210-217, 1992.

CHEN, W.X.; YAN, G.H.; LI, J.L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.45, p.393-397, 1998.

CHEN, L.S., FIGUEREDO, A., PEDROSA, F.O., HUNGRIA, M. Genetic characterization of soybean rhizobia in Paraguay. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.5099-5103, 2000.

CIF (Centro de Inteligência do Feijão), 2008. Quadro comparativo entre área, produção e produtividade: safras 2006/2007 e 2007/2008 – 8º levantamento. Disponível em <<http://www.cif.com.br/>> Acesso em 06 de Janeiro de 2009.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), 2007. Feijão total (1o, 2a e 3a safra)—Brasil—Série histórica da Área Plantada. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/download/safra/FeijaoTotalSerie-Hist.xls>> Acesso 08 de Dezembro de 2008.

COSTA, J.G.C.; VIEIRA, N.R.A. Qualidade, classificação comercial e manejo pós colheita. In: YOKOYAMA, L.P.; STONE, L.F. (Ed.) **Cultura do feijoeiro no Brasil: características da produção**. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA Arroz e feijão, p.51-64, 2000.

COUINHO, H.L.C. 2003. **Biodiversidade: perspectivas e oportunidades biotecnológicas**. Disponível em <<http://www.bdtfat.org.br/publicações/padct/bio/cap9/1/>> Acesso em 12 de Janeiro de 2009.

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

DEBOUCK, D.G. Primary diversification of *Phaseolus* in the Americas: three centers? **Plant Genetic Resources Newsletter**, v.67, p.2–8, 1986.

DEBOUCK, D.G. Systematics and morphology. In: SCHOONHOVEN, A. van; VOYSEST, O. (Ed.). **Common beans: research for crop improvement**. Cali: CIAT, p.55-118, 1991.

DIOUF, A.; DE LAJUDIE, P.; NEYRA, M.; KERTERS, K.; GILLIS, M.; MARTINEZ-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**, v.50, p.159-170, 2000.

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

EADY, R.R. The Mo-, V-, and Fe- based nitrogenase systems of *Azotobacter*. **Advances in Inorganic Chemistry**, v.36, p.77-102, 1991.

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

ELKAN, G.H. Taxonomy of rhizobia. **Canadian Journal Microbiology**, v.38, p. 446-450, 1992.

EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), 2007. **Origem e história do feijão**. Disponível em <<http://www.cnpaf.embrapa.br>> Acesso em 31 de Dezembro de 2008.

ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, n.6, p.2790-2798, 2001.

FAO, (Food and Agriculture Organization), 2007. Disponível em <<http://www.fao.org/>> Acesso em 20 de Dezembro de 2008.

FERREIRA, M.C.; HUNGRIA, M. Recovery of soybean inoculant strains from uncropped soils in Brazil. **Field Crops Research**, v.79, p.139-152, 2002.

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

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

FREITAS, F.O. Evidências genético-arqueológicas sobre a origem do feijão comum no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.1199–1203, 2006.

FRÉMONT, M.; PRIN, Y.; CHAUVIÉRE, M.; DIEM, H.G.; PWEE, K.H.; TAN, T.K. A comparison of *Bradyrhizobium* strains using molecular, cultural and field studies. **Plant Science**, n.141, p.81-91, 1999.

GALLI-TERASAWA, L.V.; GLIENKE-BLANCO, C.; HUNGRIA, M. Diversity of a soybean rhizobial population adapted to a Cerrados soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.19, p.933-939, 2003.

GENIAUX, E.; FLORES, M.; PALACIOS, R.; MARTÍNEZ, E. Presence of megaplasmids in *Rhizobium tropici* and further evidence of differences between the two *R. tropici* subtypes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.45, p.392-394, 1995.

GENTRY, H.S. Origin of the common bean (*P. vulgaris* L.) **Economic Botany**, New York, v.23, p.55-69, 1969.

GEPTS, P.; OSBORN, T.C.; RASHKA, K.; BLISS, F.A. Phaseolin protein variability in wild forms and landraces of the common bean (*Phaseolus vulgaris*): evidence for multiple centers of domestication. **Economic Botany**, v.40, p.451-468, 1986.

GEPTS, P.; DEBOUCK, D. Origin, domestication and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). In: VAN SCHOONHOVEN A.; VOYSEST, O. (Ed.) **Common beans: research for crop improvement**, p.7-53, 1991.

GIONGO, A.; PASSAGLIA, L.M.P.; FREIRE, J.R.J.; SÁ, E.L.S. de. Genetic diversity and symbiotic efficiency of population of rhizobia of *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v.43, p.593-598, 2007.

GRAHAM, P.H.; DRAEGER, K.J.; FERREY, M.L.; CONROY, M.J.; HAMMER, B.E.; MARTÍNEZ, E.; AARONS, S.R.; QUINTO, C. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. **Canadian Journal of Microbiology**, v.40, p.198-207, 1994.

GRAHAM, P.H.; VANCE, C.P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. **Field Crops Research**, v.65, p.93-106, 2000.

GRANGE, L. **A análise polifásica na reclassificação genética de *Rhizobium etli* e o estudo da diversidade genética de isolados dos cerrados brasileiros.** Curitiba (Tese de Doutorado), Universidade Federal do Paraná.

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

GRANGE, L.; HUNGRIA, M.; GRAHAM, P.H.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, v.39, n.4, p.867-876, 2006.

GURTLER, V.; STANISH, V.A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. **Microbiology** (Reading), v.142, p.3-16, 1996.

HARLAN, J.R. Agricultural origins: centers and non-centers. **Science**, n.174, p.468-474, 1971.

HARRISON, S.P., YOUNG, J.P.W., JONES, D.G. *Rhizobium* population genetics: effect of clover variety and inoculum dilution on the genetic diversity sampled from natural populations. **Plant and Soil**, n. 103, p. 147-150, 1987.

HUNGRIA, M. Sinais moleculares envolvidos na nodulação de leguminosas por rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.18, p.339-364, 1994.

HUNGRIA, M., ANDRADE, D.S., CHUEIRE, L.M.O., PROBANZA, A., GUITIERREZ-MANERO, F.J., MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, v.21, p.1515-1528, 2000.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; COLOZZI-FILHO, A.; BALOTA, E.L.; SANTOS, J.C.F. Ecologia microbiana em solos sob cultivos na Região Sul do Brasil. In: HUNGRIA, M.; BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S. (Ed.) **Microbiologia do solo: desafios para o século XXI**. Londrina: IAPAR/EMBRAPA-CNPSO, p.234-270, 1995.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.; CHUEIRE, L.; GRANGE, L.; MEGÍAS, M. Symbiotic effectiveness of fast-growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brasil. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v.33, n.5, p.387-394, 2001.



HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**. Londrina: EMBRAPA Soja, p.15-17, 2007.

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; CAMPO, R.J.; GRAHAM, P.H. The importance of nitrogen fixation to the soybean cropping in South America. In: NEWTON, W.E. (Ed.). **Nitrogen fixation research**, origins and perspectives, v. 7, WERNER, D., (Co-ed.). **Agriculture, Forestry, Ecology and Environment**, Amsterdam: Kluwer, in press, 2003.

HUNGRIA, M., FRANCO, A.A., SPRENT, J.I. New sources of high temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, v.149, p.103–109, 1993

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.65, p.151-164, 2000.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; ARAUJO, R.S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. (Ed.) **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, p.189-295, 1997.

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

JORDAN, D.C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow growing root-nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.32, p.136-139, 1982.

JORDAN, D.C. *Rhizobiaceae*. In.: KRIEG, N.R., (Ed.) **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, v.1, 1984.

KAPLAN, L. Archeology and domestication in American *Phaseolus* (beans). **Economic Botanic**, v.19, p.358-368, 1965.

KAPLAN, L. What is the origin of the common bean?. **Econ. Bot.**, n.35, p.240-254, 1980.

KAPLAN, L.; LYNCH, T.F.; SMITH, C.E. Early cultivated beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) from an intermontane peruvian valley. **Science**, v.179, p.76-77, 1973.

KASCHUK, G., HUNGRIA, M., SANTOS, J.C.P., BERTON-JUNIOR, J.F. Differences in common beans rhizobial populations associated with soil tillage management in southern Brazil. **Soil & Tillage Research**, v.87, n.2, p.205-217, 2006.

KOENIG, R.L.; GEPTS, P. Alloenzyme diversity in wild *Phaseolus vulgaris*: further evidence for two major centers of genetic diversity. **Theoretical Applied Genetics**, v.78, p.809-817, 1989.

KOENIG, R.L.; SINGH, S.P.; GEPTS, P. Novel phaseolin types in wild and cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). **Economic Botanic**, v.44, p.50-60, 1990.

LAGUERRE, G.; MAVINGUI, P.; ALLARD, M.R.; CHARNAY, M.P.; LOUVRIER, P.; MAZURIER, L.; ROGOTTIER-GOIS, S.L.; AMARGER, N. Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprint 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**, v.62, p.2029-2036, 1996.

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

LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I.; MENEZES, E.W. Qualidade nutricional. In: ARAUJO, R.S.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J.O. (Ed.) **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: POTAFOS, p.23-56, 1996.

LAJUDIE, P.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK D.; MAESTROJUAN, G.; NEYRA, M.; COLLINS M.D.; DREYFUS B.; KERSTERS K.; GILLIS M. Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. Nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. **International Journal of Bacteriology**, v.44, p.715-733, 1994.

LAJUDIE, P.; LAURENTE-FULELE, E.; WILLEMS, A.; TORCK, U.; COOPMAN, R.; COLLINS, M.D.; KERSTERS, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixation bacteria nodulate *Neptunia natans* in Senegal. **142 International Journal of Systematic Bacteriology**, v.58, p.1277-1290, 1998.

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

LOUVRIER, P.; LAGUERRE, G.; AMARGER, N. Distribution of symbiotic genotypes in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations isolated directly from soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.4202-4205, 1996.

MANYANI, H.; SOUSA, C.; SORIA DIAZ, M.E.; GIL-SERRANO, A.; MEGIAS, M. Regulation of nod factor sulphation genes in *Rhizobium tropici* CIAT899. **Canadian Journal of Microbiology**, v.47, p.574-579, 2001.

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

MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. **Plant and Soil**, v.252, p.11-23, 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**, v.29, n.4, p.315-332, 2006.

MERCANTE, F.M.; CUNHA, C.O.; STRALIOTTO, R.; RIBEIRO-JUNIOR, W.Q.; VANDERLEY DEN, J.; FRANCO, A.A. *Leucaena leucocephala* as a trap-host for *Rhizobium tropici* strains from the Brazilian cerrado region. **Revista de Microbiologia**, v.29, p.49-58, 1998.

MERCANTE, F.M.; GOI, S.R.; FRANCO, A.A. Importância dos compostos fenólicos na interação entre espécies leguminosas e rizóbio. **Revista Universidade Rural, Série Ciências da Vida**, v.22, n.1, p.65-81, 2002.

MEHTA, A. **Diversidade genética em linhagens de *Xyllela fastidiosa* isoladas de citro**. Campinas, 2000, 103 f. (Dissertação de Mestrado), IB/Unicamp, Universidade de Campinas.

MICHIELS, J., DOMBRECHT, B., VERMEIREN, N., XI, C., LUYTEN, E., VANDERLEYDEN, J. *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. **FEMS Microbiology Ecology**, v.26, p.193–205, 1998.

MIRANDA COLÍN, S. Origen de *Phaseolus vulgaris* L. (frijol comum). **Agrociencia**, Chapingo, v.1, p.99-109, 1967.

MORGANTE, P.G., 2003. Fixação biológica e assimilação de nitrogênio. Disponível em: <<http://www.ciagri.usp.br/~lazropp/FisoVegGrad/NetNito.htm>>. Acesso em: 31 de dezembro de 2008.

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**, v.73, p.121-132, 2002.

NELSON, D.L.; COX M.M. **Lenhinger**: princípios de bioquímica. 3ed. Sarvier: São Paulo, p.640-642, 2002.

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

OLIVE, D.M.; BEAN, P. Minireview: principles and application of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.1661-1669, 1999.

OLSEN, G.J.; WOESE, C.R.; OVERBEEK, R. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. **Journal of Bacteriology**, v.176, p.1-12, 1994.

PALMER, K.M.; YOUNG, J.P.W. Higher diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae populations in arable soils than in grass soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, p.2445-2450, 2000.

PEEL, M.C.; FINLAYSON, B.L.; MCMAHON, T.A. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. **Hydrology and Earth System Sciences**, v.5, n.11, p.1633-1644, 2007.

PEICK, B.; GRAUMANN, P.; SCHMID, R.; MARAHIEL, M.; WERNER, D. Differential pH-induced proteins in *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium etli* CIAT 611. **Soil Biology and Biochemistry**, v.31, p.189-194, 1999.

PIELOU, E.C. *Mathematical Ecology*. Wiley, New York, p.385, 1977.

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

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 and Biochemistry**, v.39, p.1851-1864, 2007.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor, NY : Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANTOS, M.A.; VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Characterization of soybean *Bradyrhizobium* strains adapted to the Brazilian savannas. **FEMS Microbiology Ecology**, v.30, p.261-272, 1999.

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

SESSITSCH, A.; HARDARSON, G.; AKKERMANS, A.D.L.; DE VOS, W.M. Characterization of *Rhizobium etli* and other *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. in an Austrian soil. **Molecular Ecology**, v.6, p.601-608, 1997.

SHANNON, C.E., WEAVER, W. **The Mathematical theory of communication**. University Illinois Press: Urbana, 1949.

SILVA, C.; VINUESA, P.; EGUIARTE, L.E.; MARTINEZ-ROMERO, E.; SOUSA, V. *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in a traditionally managed milpa plot in México: population genetics and biogeographic implications. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, p.884-893, 2003.

SINGH, S.P.; GEPTS, P.; DEBOUCK, D.G. Races of common bean (*Phaseolus vulgaris*, Fabaceae). **Economic Botany**, v.45, p.379-396, 1991.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy**. Freeman, San Francisco, 1973.

SOMASEGARAN, P., HOBEN, H.J. **Methods in legume-*Rhizobium* technology**. Hawaii: NifTAL, 1985, 367 p.

SOUZA, V.; EGUIARTE, L.; AVILA, G.; CAPELLO, R.; GALLARDO, C.; MONTOYA, J.; PIÑERO, D. Genetic structure of *Rhizobium etli* biovar phaseoli associated with wild and cultivated bean plants (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*) in Morelos, México. **Applied and Environmental Microbiology**, v.60, p.1260-1268, 1994.

STRALIOTTO, R.; CUNHA, C.O.; MERCANTE, F.M.; FRANCO, A.A.; RUMJANEK, N.G. Diversity of rhizobia nodulating common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) isolated from Brazilian tropical soils. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, v.71, p.531-543, 1999.

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

SULLIVAN, J.T.; PATRICK, H.N.; LOWTHER, W.L.; SCOTT, D.B.; RONSON, C.W. Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environmental. **Proceeding of the National Academy of Sciences, USA**, v.92, p.8985-8989, 1995.

TOHME, J.; GONZÁLEZ, D.O., BEEBE, S.; DUQUE, M.C. AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. **Crop Science**, v.36, p.1375-1384, 1996.

VAN BERKUN, P.; BEYENE, D.; EARDLY, B.D. Phylogenetic relationships among *Rhizobium* species nodulating the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.46, p.240-244, 1996.

VASQUEZ-ARROYO, J.; SESSISTSCH, A.; MARTINEZ, E.; PEÑA-CABRIALES, J.J. Nitrogen fixation and nodule occupancy by native strains of *Rhizobium* on different cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant and Soil**, v.204, p.147-154, 1998.

VAVILOV, N.I. Asia – the source of species. In: **Origin and geography of cultivated plants**. Cambridge University Press, Cambridge M.A.S., p.367-370 (Reprint 1992; original 1937).

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

VIEIRA, C. **O feijoeiro comum**. Viçosa: Imprensa Universitária da Universidade Federal Rural do Estado de Minas Gerais, p. 219, 1967.

VINCENT, J.M. **Manual for the practical study for root nodule bacteria**. Oxford: Blacwell, 1970, 164p.

VINUESA, P.; RADEMAKER, J.L.W.; DE BRUIJN, F.J.; WERNER, D. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprint, and partial 16S rDNA sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, p.2096-2104, 1998.

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

WOESE, C.R. Bacteria evolution. **Microbiology Reviews**, v.51, p.221-271, 1987.

YOKOYAMA, L.P. **Cultivo do feijoeiro comum: importância econômica**.

Disponível em

<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/Cultivodofeijoeiro/importancia.htm>>Acessado em: 29 mar.2007.

YOUNG, J.P.W.; DOWNER, H.L.; EARDLY, B.D. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **Journal of Bacteriology**, v.173, p.2271-2277, 1991.

YOUNG, J.P. Molecular phylogeny of rhizobia and their relatives. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W.E. (Ed.). **New horizons in nitrogen fixation**. Dordrescht: Kluver Academic Publidshers, p.587-592, 1993.

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

## ANEXOS

ANEXO I -	Análise fisiogeográfica da região de Campo Largo.....	88
ANEXO II -	Dendrograma obtido pelos produtos de amplificação por BOX-PCR de isolados de rizóbios obtidos de feijoeiro comum, cultivares Diamante Negro e Ouro Negro (C. O. Mesoamericano) em experimento a campo.....	89
ANEXO III -	Dendrograma mostrando isolados de rizóbios de feijoeiro comum, em experimento conduzido a campo, com as cultivares Jalo Precoce e Goiano Precoce (centro de origem Andino).....	90
ANEXO IV -	Dendrograma mostrando isolados de rizóbios obtidos de feijoeiro comum relacionados a dois diferentes centros de origem, Mesoamericano e Andino, em ensaio conduzido a campo.....	91
ANEXO V -	Dendrograma obtido com os produtos de BOX-PCR de rizóbios isolados de feijoeiro comum (Diamante Negro, vasos inoculados com solo diluído $10^{-1}$ e $10^{-2}$ ).....	93
ANEXO VI -	Dendrograma obtido com os produtos de BOX-PCR de rizóbios isolados de feijoeiro comum (Jalo Precoce, vasos inoculados com solo diluído $10^{-1}$ e $10^{-2}$ ).....	94
ANEXO VII -	Dendrograma mostrando linhagens de rizóbios isolados de feijoeiro comum de dois diferentes centros de origem (experimento em vasos, diluições de solo $10^{-1}$ e $10^{-2}$ ).....	95
ANEXO VIII -	Dendrograma mostrando linhagens de rizóbios isolados de feijoeiro comum de dois diferentes centros de origem (experimento em vasos, diluição de solo $10^{-1}$ ).....	96
ANEXO IX -	Dendrograma mostrando linhagens de rizóbios isolados de feijoeiro comum de dois diferentes centros de origem (experimento em vasos, diluição de solo $10^{-2}$ ).....	97



## ANEXO I

### Análise fisiogeográfica da região de Campo Largo

*Propriedades químicas do solo utilizado neste estudo:*

pH	Al <sup>+3</sup>	H <sup>+</sup> +Al <sup>+3</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Mg <sup>+2</sup>	K <sup>+</sup>	SB	T	P	C	V	M	Ca/Mg	Argila	N	
CaCl <sub>2</sub>	SMP			dm <sup>3</sup>				mg/dm <sup>3</sup>	g/dm <sup>3</sup>	%	%		g/Kg		
4,70	5,20	0,80	9,00	4,60	2,60	0,43	7,63	16,63	20,70	27,5	46	9	1,8	575,0	3,1

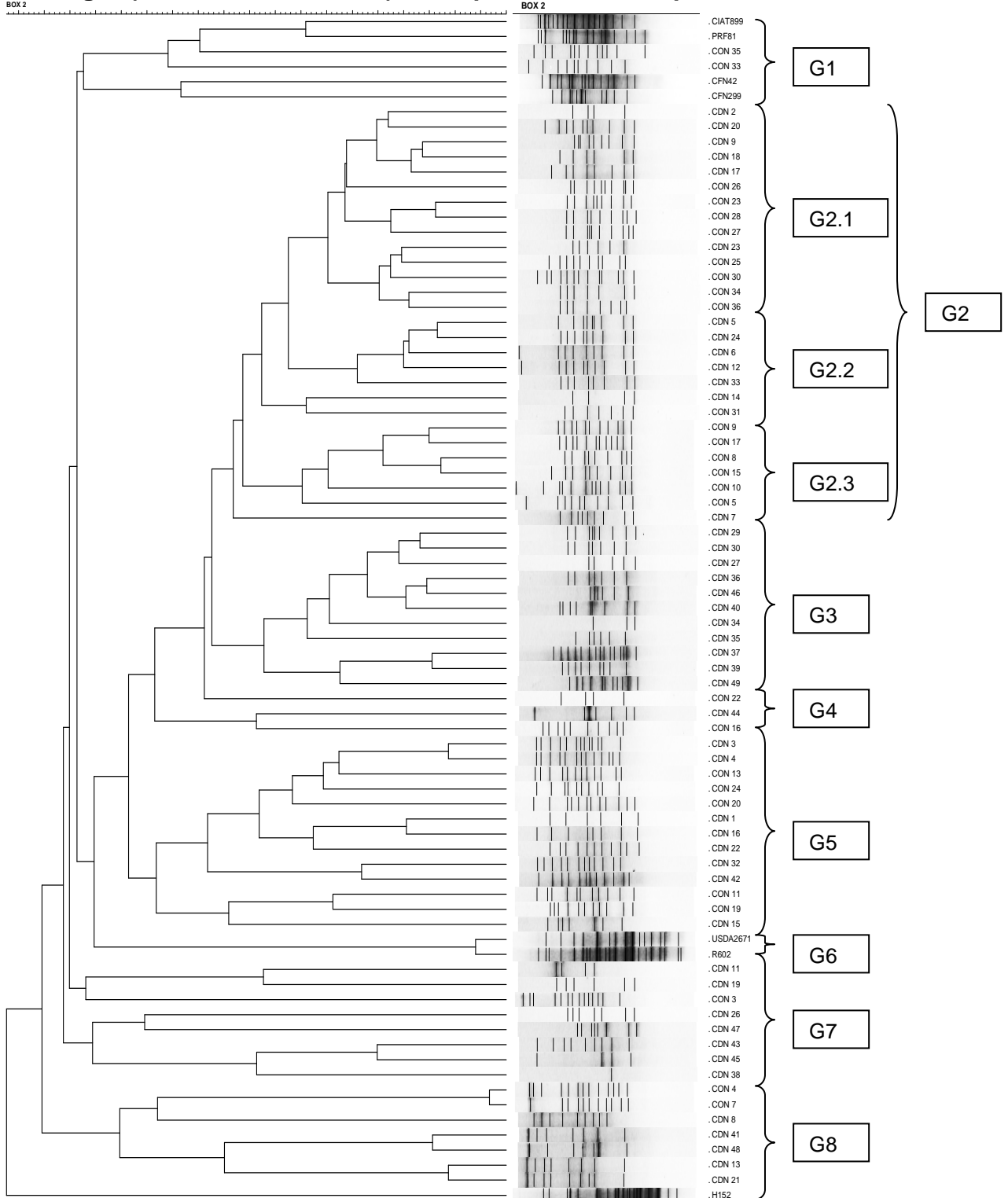
*Condições climáticas (PEEL; FINLAYSON; MCMAHON, 2007):*

O clima da região de Campo Largo é classificado como subtropical úmido (Cfb), seguindo a classificação de Köppen-Geiger. As características deste tipo de clima são:

- Climas mesotérmicos
- Temperatura média do ar dos 3 meses mais frios compreendidas entre 3°C e 18°C
- Temperatura média do mês mais quente > 10°C
- Estações de Verão e Inverno bem definidas
- Clima úmido
- Ocorrência de precipitação em todos os meses do ano
- Inexistência de estação seca definida
- Temperatura média do ar no mês mais quente < 22°C
- Temperaturas médias do ar nos 4 meses mais quentes > 10°C

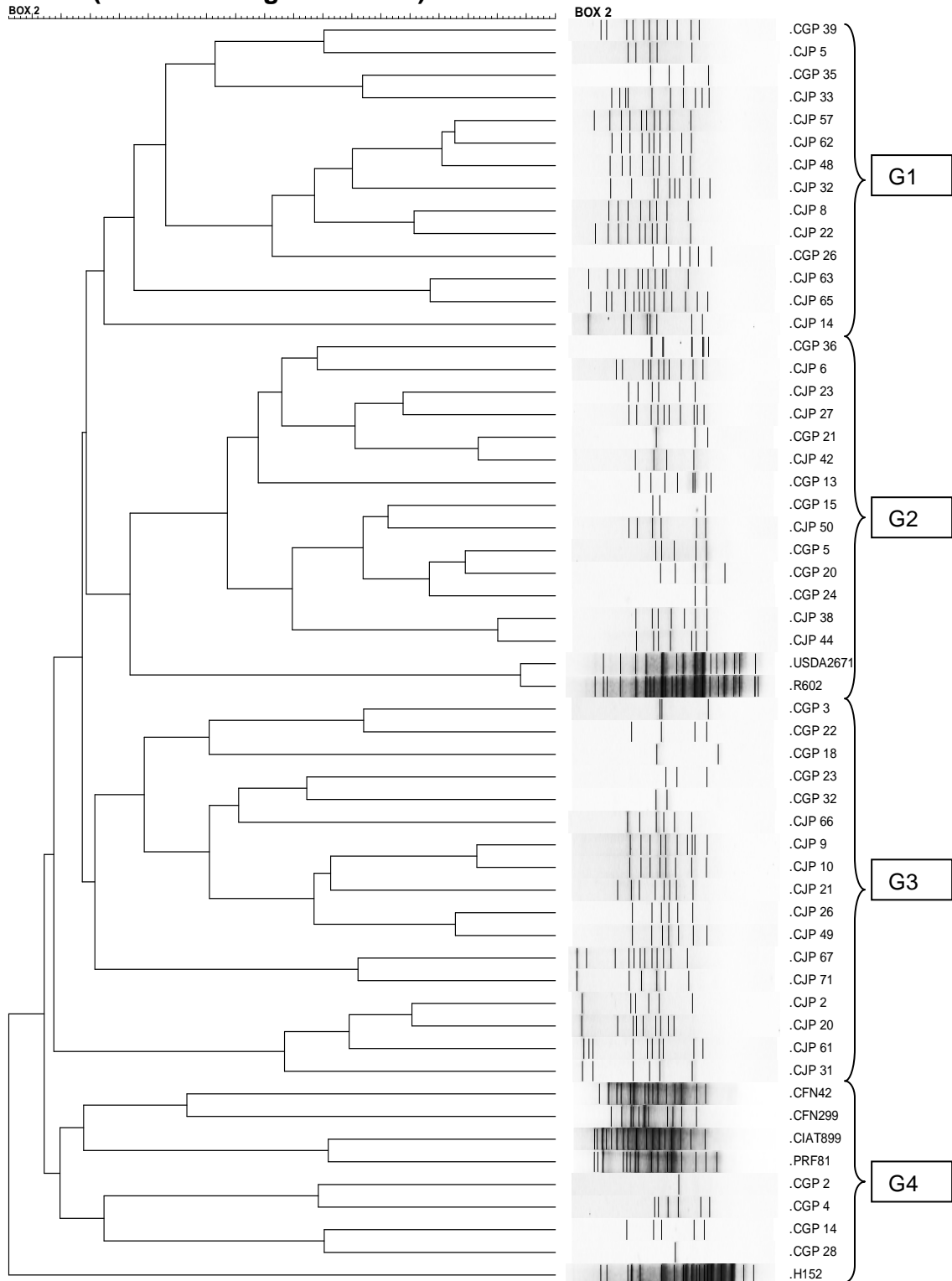
### ANEXO II

Dendrograma obtido pelos produtos de amplificação por BOX-PCR de isolados de rizóbios obtidos de feijoeiro comum, cultivares Diamante Negro e Ouro Negro (C.O. Mesoamericano) em experimento a campo.



## ANEXO III

**Dendrograma mostrando isolados de rizóbios obtidos de feijoeiro comum, em experimento conduzido a campo, com as cultivares Jalo Precoce e Goiano Precoce (centro de origem Andino).**



## ANEXO IV

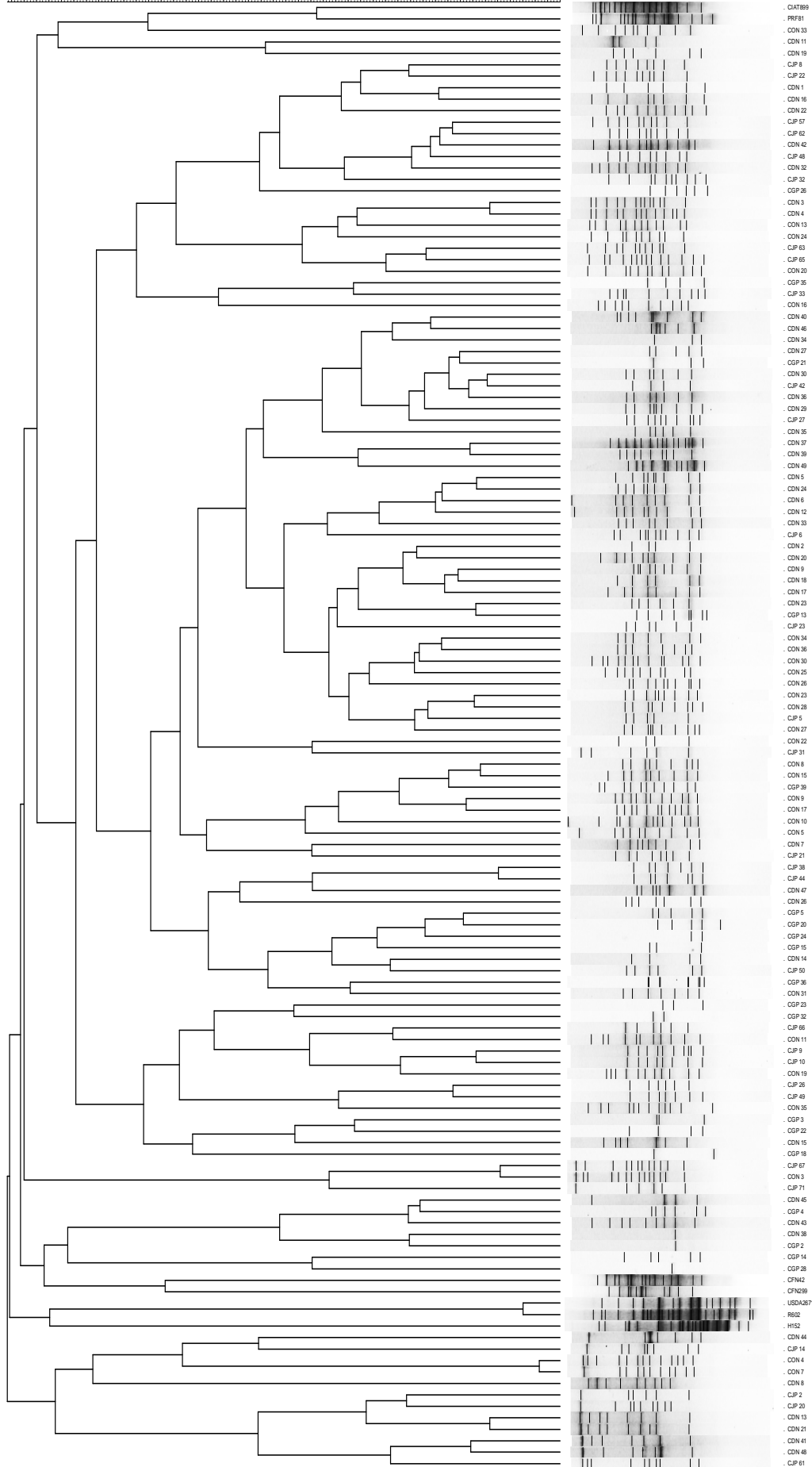
**Dendrograma mostrando isolados de rizóbios obtidos de feijoeiro comum relacionados a dois diferentes centros de origem, Mesoamericano e Andino, em ensaio conduzido a campo.**

Para melhor visualização, a seqüência dos isolados e estirpes de referência deste ANEXO está relacionada na tabela seguinte:

Posição	Isolado/ Referência	Posição	Isolado/ Referência	Posição	Isolado/ Referência	Posição	Isolado/ Referência
<b>1 (G1)</b>	CIAT899	<b>33</b>	CDN30	<b>65</b>	CON22	<b>97</b>	CON35
<b>2</b>	PRF81	<b>34</b>	CJP42	<b>66</b>	CJP31	<b>98</b>	CGP3
<b>3</b>	CON33	<b>35</b>	CDN36	<b>67 (G4)</b>	CON8	<b>99</b>	CGP22
<b>4</b>	CDN11	<b>36</b>	CDN29	<b>68</b>	CON15	<b>100</b>	CDN15
<b>5</b>	CDN19	<b>37</b>	CJP27	<b>69</b>	CGP39	<b>101</b>	CGP18
<b>6 (G2)</b>	CJP8	<b>38</b>	CDN35	<b>70</b>	CON9	<b>102 (G7)</b>	CJP67
<b>7</b>	CJP22	<b>39</b>	CDN37	<b>71</b>	CON17	<b>103</b>	CON3
<b>8</b>	CDN1	<b>40</b>	CDN39	<b>72</b>	CON10	<b>104</b>	CJP71
<b>9</b>	CDN16	<b>41</b>	CDN49	<b>73</b>	CON5	<b>105 (G8)</b>	CDN45
<b>10</b>	CDN22	<b>42</b>	CDN5	<b>74</b>	CDN7	<b>106</b>	CGP4
<b>11</b>	CJP57	<b>43</b>	CDN24	<b>75</b>	CJP21	<b>107</b>	CDN43
<b>12</b>	CJP62	<b>44</b>	CDN6	<b>76 (G5)</b>	CJP38	<b>108</b>	CDN38
<b>13</b>	CDN42	<b>45</b>	CDN12	<b>77</b>	CJP44	<b>109</b>	CGP2
<b>14</b>	CJP48	<b>46</b>	CDN33	<b>78</b>	CDN47	<b>110</b>	CGP14
<b>15</b>	CDN32	<b>47</b>	CJP6	<b>79</b>	CDN26	<b>111</b>	CGP28
<b>16</b>	CJP32	<b>48</b>	CDN2	<b>80</b>	CGP5	<b>112</b>	CFN42
<b>17</b>	CGP26	<b>49</b>	CDN20	<b>81</b>	CGP20	<b>113</b>	CFN299
<b>18</b>	CDN3	<b>50</b>	CDN9	<b>82</b>	CGP24	<b>114 (G9)</b>	USDA2671
<b>19</b>	CDN4	<b>51</b>	CDN18	<b>83</b>	CGP15	<b>115</b>	R602
<b>20</b>	CON13	<b>52</b>	CDN17	<b>84</b>	CDN14	<b>116</b>	H152
<b>21</b>	CON24	<b>53</b>	CDN23	<b>85</b>	CJP50	<b>117 (G10)</b>	CDN44
<b>22</b>	CJP63	<b>54</b>	CGP13	<b>86</b>	CGP36	<b>118</b>	CJP14
<b>23</b>	CJP65	<b>55</b>	CJP23	<b>87</b>	CON31	<b>119</b>	CON4
<b>24</b>	CON20	<b>56</b>	CON34	<b>88 (G6)</b>	CGP23	<b>120</b>	CON7
<b>25</b>	CGP35	<b>57</b>	CON36	<b>89</b>	CGP32	<b>121</b>	CDN8
<b>26</b>	CJP33	<b>58</b>	CON30	<b>90</b>	CJP66	<b>122</b>	CJP2
<b>27</b>	CON16	<b>59</b>	CON25	<b>91</b>	CON11	<b>123</b>	CJP20
<b>28 (G3)</b>	CDN40	<b>60</b>	CON26	<b>92</b>	CJP9	<b>124</b>	CDN13
<b>29</b>	CDN46	<b>61</b>	CON23	<b>93</b>	CJP10	<b>125</b>	CDN21
<b>30</b>	CDN34	<b>62</b>	CON28	<b>94</b>	CON19	<b>126</b>	CDN41
<b>31</b>	CDN27	<b>63</b>	CJP5	<b>95</b>	CJP26	<b>127</b>	CDN48
<b>32</b>	CGP21	<b>64</b>	CON27	<b>96</b>	CJP49	<b>128</b>	CJP61

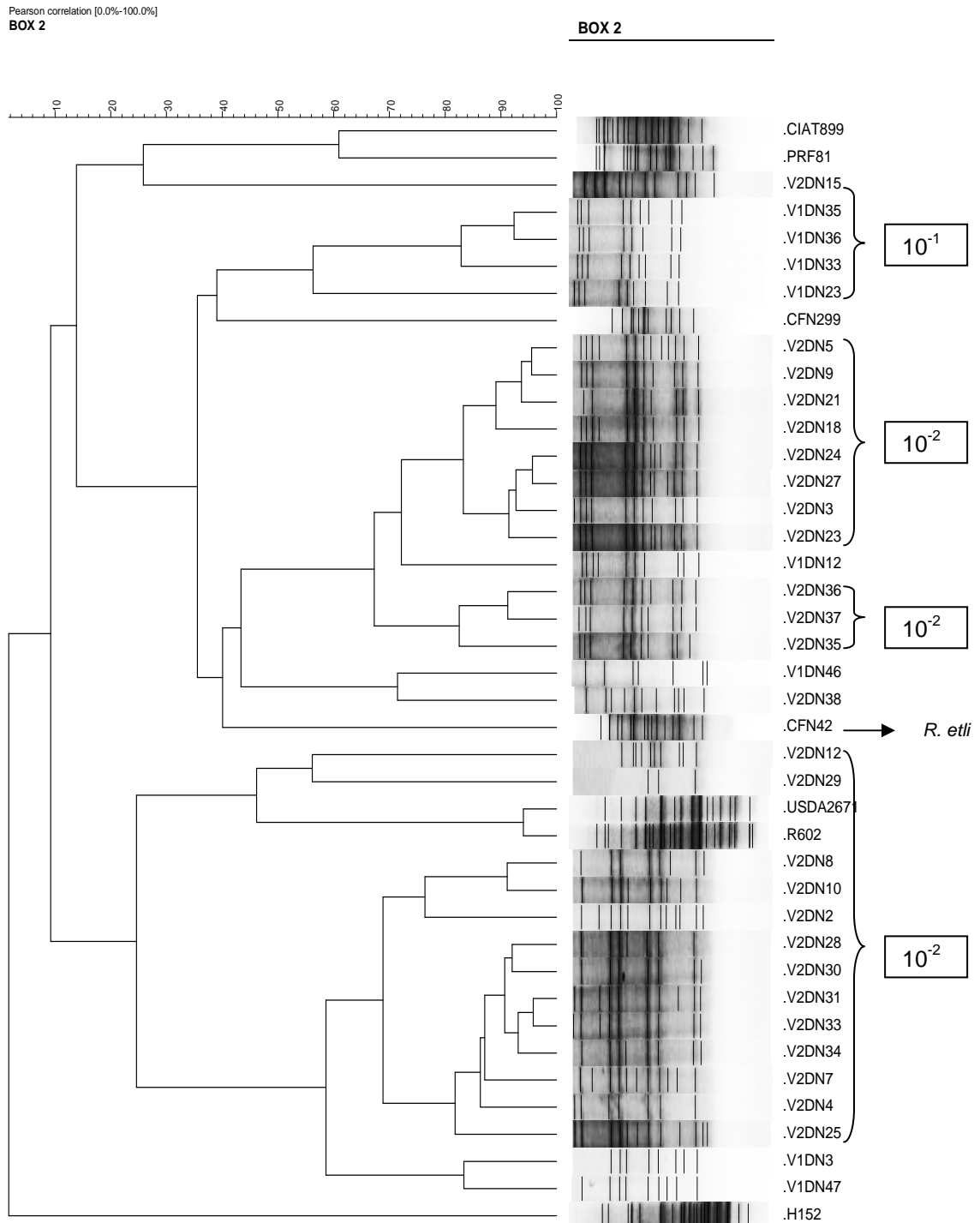
BOX 2

BOX 2



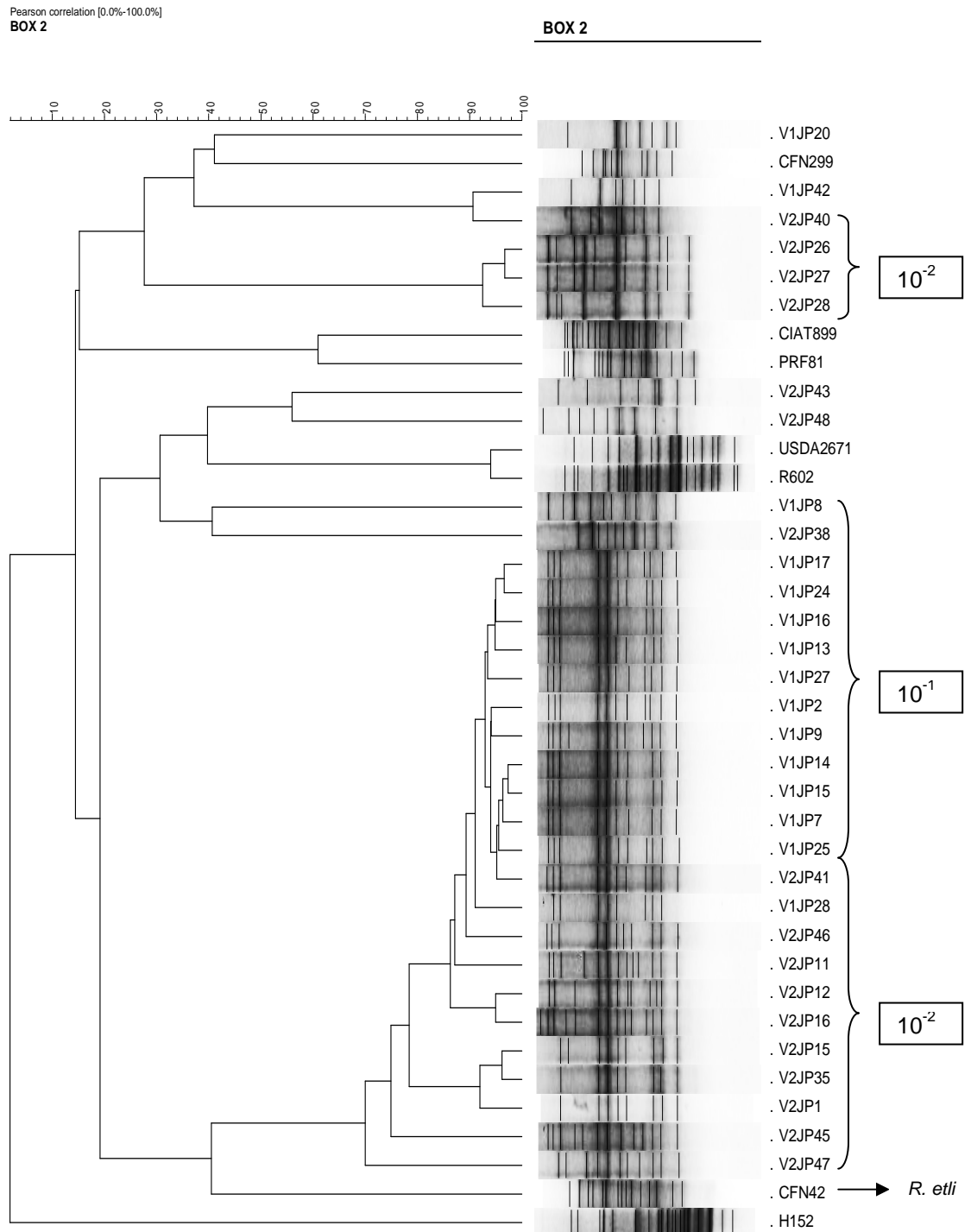
## ANEXO V

Dendrograma obtido com os produtos de BOX-PCR de rizóbios isolados de feijoeiro comum (Diamante Negro, vasos inoculados com solo diluído  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ ).



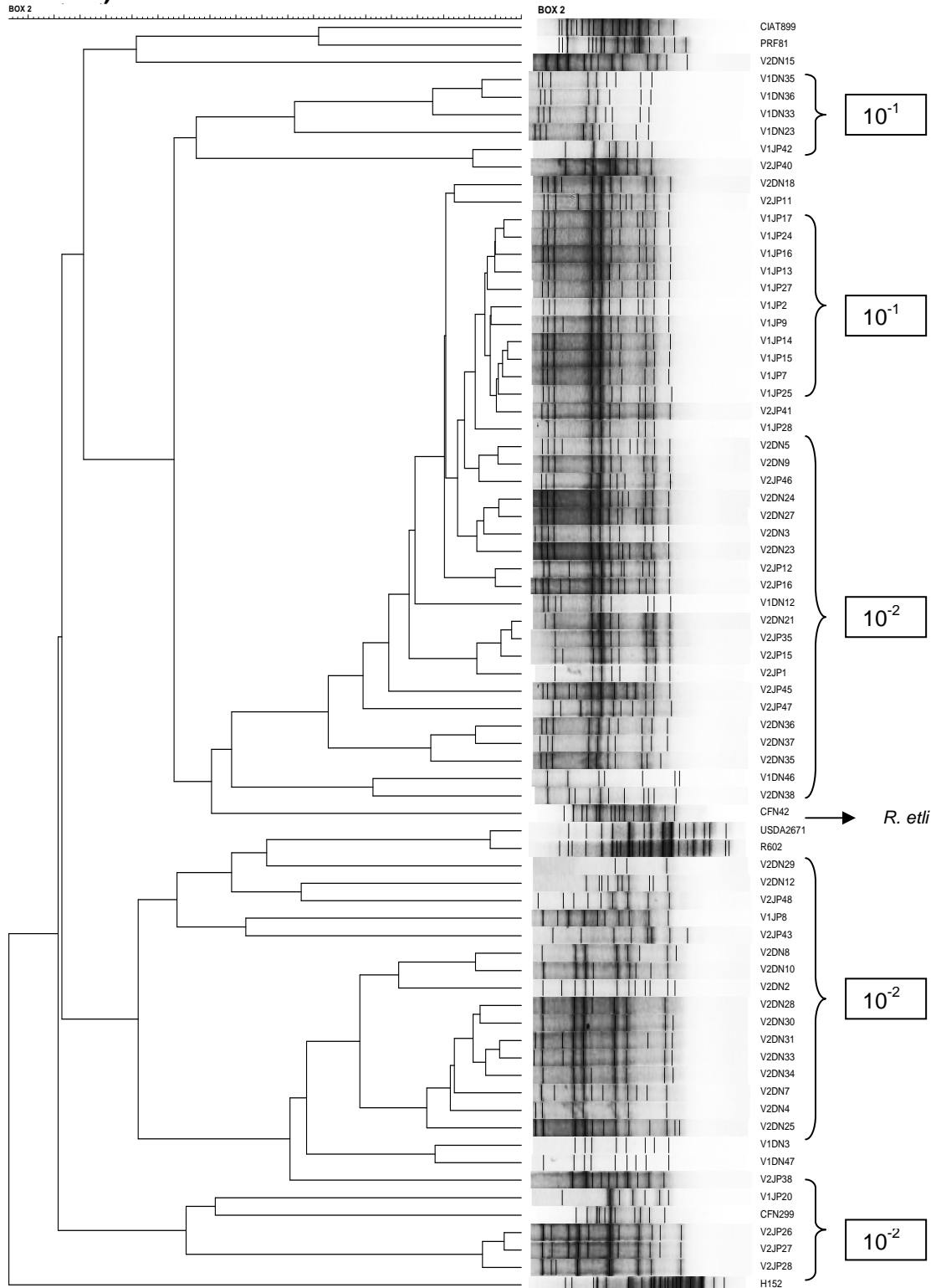
## ANEXO VI

Dendrograma obtido com os produtos de BOX-PCR de rizóbios isolados de feijoeiro comum (Jalo Precoce, vasos inoculados com solo diluído  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ ).



## ANEXO VII

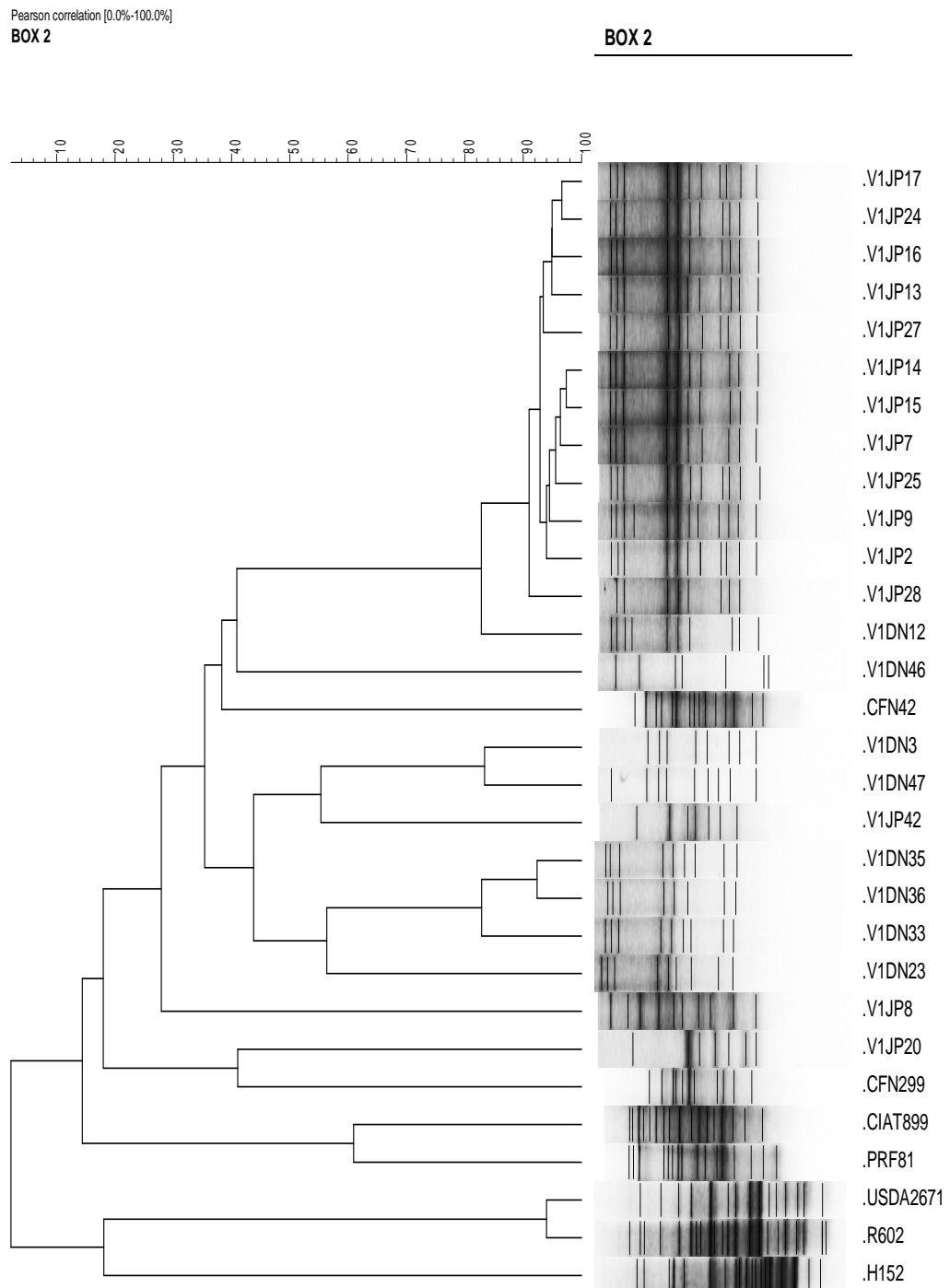
Dendrograma mostrando linhagens de rizóbios isolados de feijoeiro comum de dois diferentes centros de origem (experimento em vasos, diluições de solo  $10^{-1}$  e  $10^{-2}$ ).





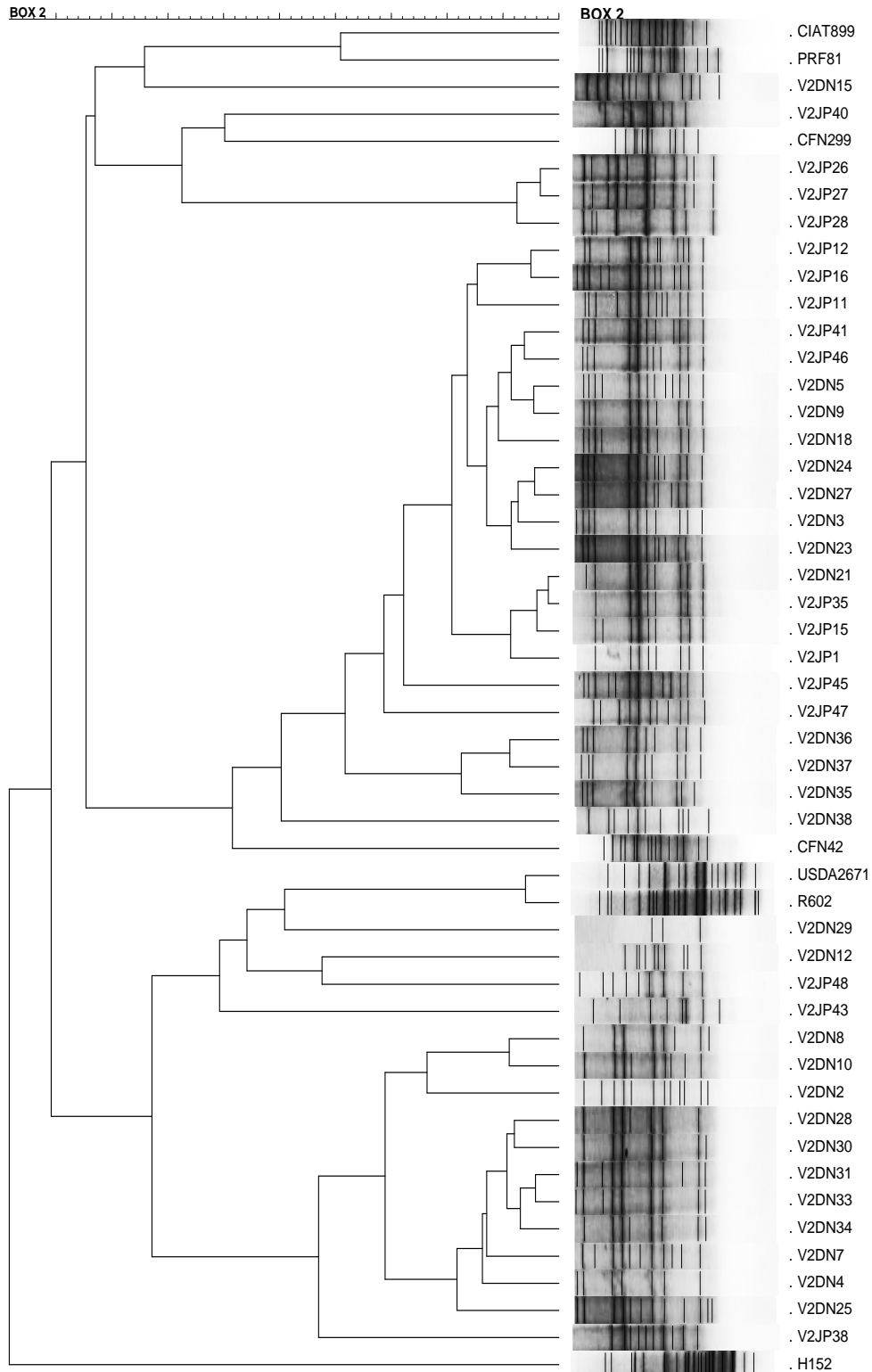
## ANEXO VIII

Dendrograma mostrando linhagens de rizóbios isolados de feijoeiro comum de dois diferentes centros de origem (experimento em vasos, diluição de solo  $10^{-1}$ ).



## ANEXO IX

**Dendograma mostrando linhagens de rizóbios isolados de feijoeiro comum de dois diferentes centros de origem (experimento em vasos, diluição de solo  $10^{-2}$ ).**



# 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](#)