

**DIVERSIDADE GENOTÍPICA E SIMBIÓTICA  
E TOLERÂNCIA A ESTRESSES DE  
BACTÉRIAS ASSOCIADAS A *Sesbania virgata*  
(Cav.) Pers**

**LIGIANE APARECIDA FLORENTINO**

**2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**LIGIANE APARECIDA FLORENTINO**

**DIVERSIDADE GENOTÍPICA E SIMBIÓTICA E TOLERÂNCIA  
A ESTRESSES DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS A *Sesbania virgata*  
(Cav.) Pers**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência do Solo, para a obtenção do  
título de “Doutor”.

Orientadora

Profa. Dra. Fatima Maria de Souza Moreira

LAVRAS,  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Florentino, Ligiane Aparecida.

Diversidade genotípica e simbiótica e tolerância a estresses de bactérias associadas a *Sesbania virgata* (Cav.) Pers / Ligiane Aparecida Florentino. – Lavras : UFLA, 2009.

113 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Fátima Maria de Souza Moreira.

Bibliografia.

1. Fixação biológica de nitrogênio. 2. Simbiose. Leguminosas. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 631.46

**LIGIANE APARECIDA FLORENTINO**

**DIVERSIDADE GENOTÍPICA E SIMBIÓTICA E TOLERÂNCIA  
A ESTRESSES DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS A *Sesbania virgata*  
(Cav.) Pers**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras  
como parte das exigências do Programa de Pós-  
Graduação em Ciência do Solo, para a obtenção do  
título de “Doutor”.

APROVADA em 16 de outubro de 2009.

Messias José Bastos de Andrade

UFLA

Eliana Gertrudes de Macedo Lemos

Unesp Jaboticabal

Sérgio Miana de Faria

Embrapa Agrobiologia

Silvia Regina Goi

UFRRJ

Profa. Dra. Fatima Maria de Souza Moreira  
UFLA  
(Orientadora)

LAVRAS,  
MINAS GERAIS – BRASIL

Aos meus queridos pais, **Antônio Onofre Florentino** e **Leny das Neves Florentino**, por todo o apoio, ensinamentos, conselhos, esperanças, incentivos e compreensão a mim dedicados.

**Ofereço**

**A Deus,**  
Por sempre ter me dado serenidade  
para enfrentar todas as dificuldades  
com muita força e coragem...

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, pela oportunidade de realização do curso de Doutorado.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Fatima Maria de Souza Moreira por mostrar o maravilhoso mundo da pesquisa, por acreditar em meu trabalho, pela amizade, confiança e incentivo durante todos estes anos.

Ao projeto TSBF-CIAT/GEF-UNEP, *Conservation and Sustainable Management of Below Ground Biodiversity*, pelo financiamento para a execução deste trabalho.

A todos os professores do Departamento de Ciência do Solo, por seus ensinamentos, auxílios, apoio e disponibilidade para discussões e esclarecimentos de dúvidas.

A todos os funcionários Departamento de Ciência do Solo, pelo auxílio, apoio, disponibilidade e ajuda prestados.

Aos funcionários Marlene Aparecida de Souza e Manuel Aparecido da Silva pela contribuição na execução de todas as análises, além da infinita amizade construída durante todos estes anos de trabalho em equipe.

Aos professores Romildo da Silva, Rosane Freitas Schwan e Eustáquio Souza Dias, pela grande oportunidade concedida e pelas orientações e sugestões.

Aos membros da banca examinadora, pesquisador Sérgio Miana de Faria, professores Eliana Gertrudes de Macedo Lemos, Silvia Regina Goi e Messias José Bastos de Andrade, pela participação, colaboração e sugestões apresentadas.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia do Solo, em especial às bolsistas de iniciação científica Jacqueline e Karina, pela contribuição em todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao José Francivaldo, pela paciência, amizade, dedicação e apoio em todos os momentos da minha vida, principalmente durante o curso de doutorado.

Às minhas eternas amigas Eliene, Regiane e Walkíria, pelos momentos inéditos que vivemos. Eu amo vocês!

Aos meus pais queridos, Antônio e Leny e à minha irmã, Keny, pelo amor e carinho ao longo de todo o percurso.

**A todos, muito obrigada!!!**

*Quando uma pessoa decide a melhorar suas condições de vida e sabe disciplinar sua mente, com vontade inabalável em direção ao seu objetivo, tudo de bom e oportuno virá ao seu encontro: bons livros, bons amigos, criaturas simpáticas e outros meios que lhe ajudarão a realizar seus justos desejos.*

*James Allen*

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
RESUMO GERAL.....	iv
GENERAL ABSTRACT.....	v
CAPÍTULO 1.....	01
1 Introdução.....	02
2 Referencial Teórico.....	04
2.1 Fixação Biológica de Nitrogênio.....	04
2.2 Simbiose entre Leguminosas e Bactérias Fixadoras de Nitrogênio.....	05
2.3 Importância econômica e ecológica da simbiose entre leguminosas e bactérias nodulíferas.....	09
2.4 Fatores que regulam a simbiose entre bactérias nodulíferas e leguminosas.....	14
2.5 Exopolissacarídeos como mecanismo de adaptação a condições ambientais limitantes.....	16
2.6 Exopolissacarídeos sintetizados por bactérias nodulíferas em leguminosas (BNL).....	18
3 Referências Bibliográficas.....	22
CAPÍTULO 2: Relações simbióticas entre espécies de <i>Sesbania</i> e gêneros de rizóbios .....	34
1 Resumo.....	35
2 Abstract.....	36
3 Introdução.....	37
4 Material e Métodos.....	39
4.1 Distribuição geográfica das espécies, escarificação e germinação das sementes e cultivo das plantas.....	39
4.2 Experimento para verificar as características simbióticas de sete espécies de <i>Sesbania</i> com diferentes gêneros de BNL.....	40
4.3 Experimento para verificar as características simbióticas de sete espécies de <i>Sesbania</i> com população nativa de BNL.....	41
4.4 Delineamento estatístico.....	42
4.5 Isolamento e caracterização morfológica de bactérias que nodulam as sete espécies de <i>Sesbania</i> e o siratro.....	43
5 Resultados e Discussão.....	45
5.1 Teste de nodulação com diferentes espécies de bactérias que nodulam leguminosas (BNL).....	45
5.2 Nodulação de <i>Sesbania</i> spp. com BNL presentes em amostras de	

solos da Amazônia Ocidental.....	48
6 Conclusões.....	51
7 Referências Bibliográficas.....	52
CAPÍTULO 3: Diversidade fenotípica, genotípica e eficiência simbiótica de estirpes de rizóbios capturadas próximo ao sistema radicular de <i>Sesbania virgata</i> usando o caupi como planta isca.....	57
1 Resumo.....	58
2 Abstract.....	59
3 Introdução.....	60
4 Material e Métodos.....	62
4.1 Origem das estirpes e características culturais.....	62
4.2 Diversidade Genética.....	64
4.3 Eficiência simbiótica.....	64
4.4 Tolerância a antibióticos.....	67
4.5 Tolerância à salinidade.....	68
4.6 Tolerância a extremos de pH.....	68
4.7 Tolerância a altas temperaturas.....	69
5 Resultados e Discussão.....	70
5.1 Diversidade Genética.....	70
5.2 Eficiência simbiótica.....	71
5.3 Tolerância a antibióticos.....	73
5.4 Tolerância à salinidade.....	75
5.5 Tolerância a extremos de pH.....	77
5.6 Tolerância a altas temperaturas.....	78
5.7 Variabilidade genotípica, simbiótica e fenotípica de acordo com a origem das estirpes.....	79
6 Conclusões.....	82
7 Referências Bibliográficas.....	83
CAPÍTULO 4: Diversidade genética e tolerância a estresses de estirpes isoladas de <i>Sesbania virgata</i> (cav.) Pers.....	88
1 Resumo.....	89
2 Abstract.....	90
3 Introdução.....	91
4 Material e Métodos.....	93
4.1 Origem das estirpes.....	93
4.2 Diversidade genética das estirpes (BOX-PCR).....	94
4.3 Ensaio Fenotípicos.....	95
4.3.1 Tolerância à salinidade.....	96
4.3.2 Tolerância a valores extremos de pH.....	96
4.3.3 Tolerância a diferentes temperaturas.....	97
4.3.4 Tolerância a antibióticos.....	97
5 Resultados e Discussão.....	99

5.1 Diversidade Genética.....	99
5.2 Testes fenotípicos.....	101
6 Conclusões.....	108
7 Referências Bibliográficas.....	109

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

TABELA 1	Identificação das estirpes de BNL, hospedeiro de origem e características morfológicas em meio de cultura 79.....	41
TABELA 2	Características químicas dos solos de dez áreas sob diferentes sistemas de uso da terra (SUTs) da Amazônia Ocidental.....	43
TABELA 3	Nodulação de <i>Sesbania</i> spp. inoculadas com diferentes gêneros de bactérias nodulíferas em leguminosas.....	46

### CAPÍTULO 3

TABELA 1	Solos de origem, valores de pH, identificação dos nódulos das plantas de caupi em que as estirpes de rizóbios estudadas foram isoladas e características culturais em meio 79.....	63
TABELA 2	Peso da matéria seca da parte aérea (MSPA) de caupi inoculado com estirpes de rizóbio de diferentes procedências.....	73
TABELA 3	Relação entre a origem e as principais características genotípicas, simbióticas e fenotípicas das estirpes.....	80

### CAPÍTULO 4

TABELA 1	Identificação das estirpes de BNL utilizadas nesse estudo.....	94
TABELA 2	Resultados dos testes fenotípicos.....	104

## LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1		
FIGURA 1	Troca de sinais moleculares que antecedem a simbiose entre bactérias nodulíferas e plantas leguminosas.....	07
FIGURA 2	Estrutura primária de EPSs de diferentes espécies de BNL.....	19
CAPÍTULO 2		
FIGURA 1	Distribuição dos isolados de bactérias que nodulam siratro em sete tipos culturais baseados no tempo para a formação de colônias isoladas e na alteração do pH do meio de cultura.....	49
CAPÍTULO 3		
FIGURA 1	Dendrograma de diversidade genética das estirpes isoladas de caupi e de estirpes do gênero <i>Bradyrhizobium</i> aprovadas pelo MAPA para a cultura do caupi, UFLA 03-84 e INPA 03-11B, após a análise de agrupamento dos fragmentos obtidos pela amplificação do DNA por PCR com o primer específico BOX (Versalovic et al., 1994). Análise realizada com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jacard.....	71
FIGURA 2	Dendrograma representando a tolerância das dez estirpes rizóbios aos 15 tipos de antibióticos.....	75
FIGURA 3	Crescimento das estirpes de rizóbios expostas a diferentes concentrações de NaCl (mM) em meio 79.....	76
CAPÍTULO 4		
FIGURA 1	Padrões de bandas de DNA amplificados com o <i>primer</i> BOX das estirpes de bactérias nodulíferas representantes dos principais gêneros, LMG 19424 <sup>T</sup> ( <i>Cupriavidus taiwanensis</i> ); BR 5401 <sup>T</sup> ( <i>Azorhizobium doebereineriae</i> ); ORS 571 <sup>T</sup> ( <i>A. caulinodans</i> ); BR 3405 ( <i>Burkholderia caribensis</i> ); UFLA 03-84 ( <i>Bradyrhizobium</i> sp.); BR 3804 ( <i>Mesorhizobium plurifarium</i> ); BR 6806 ( <i>Sinorhizobium</i> sp.); CIAT 899 <sup>T</sup> ( <i>Rhizobium tropici</i> ) e dos 72 isolados de nódulos de <i>Sesbania virgata</i> .....	101
FIGURA 2	Dendrograma de diversidade genética das estirpes isoladas de <i>Sesbania virgata</i> e estirpes representantes dos principais gêneros de bactérias nodulíferas em leguminosas, após a análise de agrupamento dos fragmentos obtidos pela amplificação do DNA por PCR com o primer específico BOX (Versalovic et al., 1994).	

	Análise realizada com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jacard. 1 – estirpes isoladas de <i>S. virgata</i> ; 2 – BR 5401 <sup>T</sup> , <i>Azorhizobium doebereineriae</i> ; 3 – ORS 571 <sup>T</sup> , <i>A. caulinodans</i> ; 4 – LMG 19424 <sup>T</sup> , <i>Cupriavidus taiwanensis</i> ; 5 – UFLA 03-84, <i>Bradyrhizobium</i> sp.; 6 – CIAT 899 <sup>T</sup> , <i>Rhizobium tropici</i> ; - 7 – BR 3405, <i>Burkholderia caribensis</i> ; 8 - BR 3804 – <i>Mesorhizobium plurifarium</i> ; 9 – BR 6806 – <i>Sinorhizobium</i> sp.....	101
FIGURA 3	Dendrograma representando a tolerância de onze bactérias isoladas de nódulos de <i>S. virgata</i> e de oito estirpes de BNL representantes dos gêneros <i>Rhizobium</i> (CIAT 899 <sup>T</sup> ), <i>Bradyrhizobium</i> (UFLA 03-84), <i>Mesorhizobium</i> (BR 3804), <i>Sinorhizobium</i> (BR 6806), <i>Azorhizobium</i> (ORS 571 <sup>T</sup> e BR 5401 <sup>T</sup> ), <i>Burkholderia</i> (BR 3405) e <i>Cupriavidus</i> (LMG 19424 <sup>T</sup> ), quando submetidas aos testes de tolerância às altas temperaturas e concentrações salinas, valores extremos de pH e a 13 tipos de antibióticos. Análise realizada com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jacard.....	105

## RESUMO GERAL

FLORENTINO, Ligiane Aparecida. **Diversidade genotípica e simbiótica e tolerância a estresses de bactérias associadas a *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.** 2009. 113p. Tese (Doutorado em Ciência do Solo)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG<sup>1</sup>.

O gênero *Sesbania* pertence à família Leguminosae e apresenta cerca de 70 espécies, as quais apresentam um grande potencial de utilização econômica, como em reflorestamento de mata ciliar, recuperação de áreas degradadas, na alimentação de ruminantes, atividades farmacológicas, entre outras. Essas leguminosas têm a capacidade de estabelecer simbiose com as bactérias nodulíferas em leguminosas (BNL), as quais são capazes de fornecer o nitrogênio necessário ao desenvolvimento dessas plantas. No entanto, somente cerca de 10% destas espécies foram estudadas quanto à capacidade de estabelecer simbiose com essas bactérias. Uma das espécies deste gênero que vêm sendo estudadas em relação à nodulação e despertado o interesse científico é a simbiose altamente específica existente entre *Sesbania virgata* e a BNL, *Azorhizobium doebereinae*. Neste caso, a simbiose é sempre eficiente e as estirpes de *A. doebereinae* apresentam alta similaridade fenotípica (características culturais e perfis de proteína total) entre si, dificultando a distinção entre elas. Além disso, os estudos mostram também que nas amostras de solos coletadas próximo do caule de *S. virgata*, além de *A. doebereinae*, ocorre também grande diversidade de BNL nativas. Este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar a nodulação de sete espécies de *Sesbania* com BNL de diferentes gêneros e as características genotípicas (sequências repetitivas de DNA genômico), simbióticas e tolerância a estresses de BNL isoladas de nódulos de *S. virgata* ou oriundas de amostras de solos coletadas próximo do caule de plantas de *S. virgata* encontradas sob áreas de pastagem em municípios do Sul de Minas Gerais. Foi verificada uma grande diversidade em relação à capacidade de estabelecer simbiose das sete espécies de *Sesbania* com os diferentes gêneros de BNL. As BNL isoladas de nódulos e/ou de amostras de solos coletadas próximo do caule de *S. virgata* apresentaram alta diversidade genética e também em relação à capacidade de tolerarem diferentes condições de estresse em meio de cultura. Destas, algumas estabeleceram simbiose eficiente com o caupi, sendo indicadas para novas etapas do processo de seleção para estirpes inoculantes.

---

<sup>1</sup> Orientadora: Fátima Maria de Souza Moreira – UFLA

## GENERAL ABSTRACT

FLORENTINO, Ligiane Aparecida. **Symbiotic and Genotypic diversity and bacteria stress tolerance of bacteria associated to *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.** 2009. 113p. Thesis (Doctorate in Science of the Soil)- Federal University of Lavras, Lavras, MG<sup>2</sup>.

*Sesbania* genus belongs to Leguminosae family and presents around 70 species, which have a great economic utilization potential, such as gallery forest reforestation, recovery of degraded areas, feeding ruminants, pharmacological activities, among others. These leguminous have the capacity to establish symbiosis with Leguminosae-nodulating bacteria (LNB), which are able to supply the necessary nitrogen for their development plants. However, only around 10% of these species were studied in relation to capacity to their establish symbiosis with LNB. One species of this genus that has been studied in relation to nodulation and has driven the scientific interest for its the highly specific symbiosis wise is *Sesbania virgata* and LNB, *Azorhizobium doebereineriae*. In this case, the symbiosis is always efficient and *A. doebereineriae* strains present high phenotypic (characteristics cultural and total protein profiles) similarity between themselves, making difficult the distinction between these ones. Besides this, studies have also shown that the soil samples collected close to the *S. virgata* stem presente, that *A. doebereineriae*, and a great diversity of native LNB from many genera. This work aims to study the nodulation of seven species of *Sesbania* with different genera of LNB and genotypic (repetitive-sequence), symbiotic and phenotypic characteristics of LNB isolated nodules or from soil samples collected closer to *S. virgata* plants stem under pasture areas in South of Minas Gerais municipalities. It was verified a great diversity in relation to the capacity to establish symbiosis for the seven species of *Sesbania* with different LNB genera. LNB isolated from nodules and/or soil samples collected closer to *S. virgata* stem, present high genetic diversity, and also presents capacity to tolerate different stress conditions in culture medium. Some of the have established efficient symbiosis with cowpea, indicating a great potential to use in new stages of selection for inoculant species process.

---

<sup>2</sup>Adviser: Fátima Maria de Souza Moreira – UFLA

**CAPÍTULO 1**  
**INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO**

## 1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos desempenham importantes funções, como a decomposição e a mineralização da matéria orgânica, a ciclagem de nutrientes e a fixação biológica de nitrogênio (FBN), que contribuem para a regulação e o funcionamento dos ecossistemas. Dessa forma, a presença destes no solo pode ser considerada como indicador de sua qualidade (Kennedy & Papendick, 1995). Além disso, esses microrganismos podem representar grande fonte de produtos farmacêuticos, enzimas, corantes, ácidos orgânicos e muitos outros recursos ainda pouco explorados.

O processo de FBN, realizado pelas bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ), tem sido intensivamente estudado devido, principalmente, ao aporte de N nos ecossistemas agrícolas. Nas regiões tropicais, onde os solos geralmente se encontram altamente intemperizados e com baixo nível de fertilidade natural, esse processo tem grande importância econômica.

No Brasil, o melhor exemplo de utilização do processo de FBN é o da inoculação de bactéria nodulífera de leguminosas (BNL) do gênero *Bradyrhizobium* sp. na cultura da soja (*Glycine max.* (L.) Merrill), na qual a adubação nitrogenada é totalmente substituída (Moreira & Siqueira, 2006), garantindo maior competitividade do produto no mercado externo.

No entanto, a eficiência do processo FBN depende de características intrínsecas à leguminosa hospedeira e à bactéria e também das condições ambientais. Fatores como altas temperaturas, estresse hídrico, acidez do solo associado à presença de  $Al^{+3}$  e  $Mn^{+2}$  e deficiência de macro e micronutrientes, especialmente Mo e Co, podem limitar a sobrevivência e a atividade das BNL (Moreira & Siqueira, 2006). Dessa forma, este trabalho foi realizado com os objetivos de estudar as características simbióticas e genotípicas de diversas estirpes de BNL, bem como o comportamento destas quando expostas a

diferentes condições ambientais, como tolerância a altas temperaturas e concentrações salinas, valores extremos de pH e diferentes tipos de antibióticos. Aliado a isso, buscou-se também estudar o envolvimento dos exopolissacarídeos sintetizados pela estirpe CIAT 899<sup>T</sup>, no processo de adaptação a diferentes condições ambientais.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Fixação biológica de nitrogênio

Os organismos do solo, sejam eles macro ou microscópicos, desempenham variadas funções, as quais garantem a manutenção e o equilíbrio dos ecossistemas terrestres. Dentre essas funções, incluem-se a decomposição e a mineralização da matéria orgânica, a ciclagem de nutrientes e a fixação biológica de nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) (FBN). Destes, a FBN tem sido intensivamente estudada, devido à sua grande contribuição no aporte de nitrogênio (N) nos ecossistemas agrícolas.

O N é constituinte de vários compostos, como os aminoácidos, os ácidos nucleicos e a clorofila. Portanto, é um dos nutrientes absorvidos em maiores quantidades pelas plantas cultivadas. Normalmente, o manejo da adubação nitrogenada é dificultada porque este elemento apresenta alta mobilidade no sistema solo-planta-atmosfera, perdendo-se facilmente por volatilização ou lixiviação. Além disso, os fertilizantes nitrogenados têm baixa eficiência de uso. Dessa forma, são necessárias várias aplicações de fertilizantes contendo N mineral para se obter altas produtividades. Aliado a isso, estes fertilizantes apresentam alto custo de produção, o que permite considerar que sua utilização sem critério, além de elevar o custo do produto final, pode contaminar o meio ambiente (Cantarella, 2007).

Estima-se que cerca de 78% do ar atmosférico seja constituído pelo gás dinitrogênio ( $N_2$ ), porém, essa forma não pode ser utilizada pela maioria dos seres vivos. Somente uma parcela dos procariotos, os diazotróficos, que possuem a enzima nitrogenase, conseguem transformar o  $N_2$  em  $NH_3$ .

Apesar de a FBN estar restrita aos procariotos que possuem a enzima nitrogenase, verifica-se que esses organismos apresentam alta diversidade

morfológica, fisiológica, genética e filogenética, podendo ser encontrados em vida livre, associadas ou em simbiose com plantas como as leguminosas, em que ocorre a formação de estruturas especializadas denominadas nódulos, local onde ocorre a redução do  $N_2$  a  $NH_3$ , nas raízes e/ou caules dessas plantas. Essas bactérias também podem ser encontradas em associação com plantas de outras famílias, como as gramíneas, mas, nesse caso, não ocorre a formação de estruturas diferenciadas. Nesse caso das associações, além da contribuição com o N, as bactérias podem excretar compostos, como os ácidos orgânicos e os hormônios, que auxiliam na promoção do crescimento vegetal (Moreira & Siqueira, 2006).

Dessa forma, as bactérias fixadoras de  $N_2$  têm sido intensivamente estudadas, devido aos seus benefícios que vão desde o aumento da produção vegetal até a contribuição para a sustentabilidade dos sistemas agrícolas, principalmente nas regiões tropicais, onde os solos geralmente se encontram altamente intemperizados e com baixo nível de fertilidade natural.

Portanto, o processo de FBN apresenta grande relevância econômica e isso é bem evidenciado no caso da cultura da soja (*Glycine max.* (L.) Merrill), em que a inoculação de estirpes BNL selecionadas do gênero *Bradyrhizobium* sp. nas sementes no momento do plantio permite a substituição total da adubação nitrogenada.

## **2.2 Simbiose entre leguminosas e bactérias fixadoras de nitrogênio**

A família Leguminosae apresenta 700 gêneros, cerca de 20.000 espécies e é dividida em três subfamílias: Papilionoideae, Mimosoideae e Caesalpinoideae. Diversas plantas desta família possuem a capacidade de estabelecer interação simbiótica com as BNL, formando nódulos nas raízes e/ou caules destas plantas. Dessa forma, estas bactérias podem ser chamadas de

bactérias nodulíferas em leguminosas (BNL). Como em toda associação simbiótica, ocorre um benefício mútuo para ambos os organismos. Nesse caso, a planta fornece fotoassimilados e, em troca, a bactéria fornece o nitrogênio (N) necessário ao desenvolvimento da planta.

As BNL formam grupos filogeneticamente diversos e são encontradas nas subclasses  $\alpha$ -proteobactéria e  $\beta$ -proteobactéria, nos gêneros *Allorhizobium* (De Lajudie et al., 1998), *Azorhizobium* (Dreyfus et al., 1988), *Bradyrhizobium* (Jordan, 1982), *Rhizobium* (Frank, 1889), *Mesorhizobium* (Jarvis et al., 1997) e *Sinorhizobium* (De Lajudie et al., 1994), *Methylobacterium* (Sy et al., 2001), *Blastobacter* (Van Berkun & Eardly, 2002) e *Devosia* (Rivas et al., 2002), *Phyllobacterium* (Valverde et al., 2006), *Ochrobactrum* (Trujillo et al., 2005), *Burkholderia* (Moulin et al., 2001) e *Cupriavidus* (Chen et al., 2001).

Estas bactérias possuem os genes da nodulação, genes *nod*, que são expressos em resposta a determinadas moléculas químicas (flavonoides) emitidas pela leguminosa hospedeira. Uma vez expressos, estes genes induzem a bactéria a sintetizar um sinal de reconhecimento pelo hospedeiro, os fatores Nod ou lipoquitooligossacarídeos (LCO). Após a liberação destes compostos, se houver um reconhecimento pela planta, inicia-se o encurvamento do pelo radicular e, posteriormente, a formação dos nódulos (Figura 1). Dessa forma, o processo de nodulação tende a ser específico.

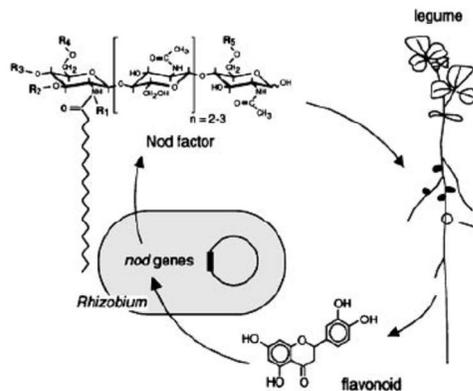


FIGURA 1 Troca de sinais moleculares que antecedem a simbiose entre bactérias nodulíferas e plantas leguminosas (Schultze & Kondorosi, 1998).

O estabelecimento da simbiose pode depender também dos polissacarídeos extracelulares, como os lipopolissacarídeos (LPS) e os exopolissacarídeos (EPS). Os LPS são moléculas constituintes da maioria das bactérias gram-negativas. Estão localizados na membrana bacteriana externa e são formados por três diferentes regiões: o lipídeo A, o polissacarídeo interno e o polissacarídeo O-específico. O lipídeo A apresenta ácidos graxos unidos a um dissacarídeo com composição química que pode variar entre as diferentes espécies bacterianas; o polissacarídeo interno é uma região polissacarídica contendo açúcares de sete carbonos, glicose, galactose e N-acetilglicosamina, ligada ao lipídeo A por uma molécula de cetodesoxioctonato e a terceira região consiste de uma cadeia de açúcares de seis carbonos e dideoxi-açúcares, como abequose, colitose, paratose ou tivelose, que se associam, formando ramificações (Madigan et al., 2004).

Em relação aos LPS, algumas estruturas desses compostos em BNL têm sido descritas em detalhes. A estrutura mais completa descrita até o momento

para um LPS de BNL foi demonstrada primeiramente por Forsberg e Carlson (1998), para *Rhizobium etli*, estirpe CE3. Identificações parciais de LPS de outras espécies de BNL têm sido publicadas e demonstram grande variação estrutural nesta molécula, especialmente para o polissacarídeo O-específico, que parece ser a região que apresenta as maiores diferenças estruturais em comparação com as demais porções (Spaink, 2000; Fraysse et al., 2003).

Os EPS produzidos por BNL são, na maioria das vezes, heteropolissacarídeos formados a partir de unidades repetidas de resíduos de hexoses, como glicose, galactose, manose, ramnose, ácido galacturônico e glucurônico com substituições de piruvil, acetil, succinil e hidroxibutanoil (Lepek & D'Antuono, 2005). Estes compostos podem ser secretados no ambiente ou ficar retidos na superfície bacteriana como um polissacarídeo capsular (CPS) (Skorupska et al., 2006). Uma grande diversidade nas estruturas químicas dos EPS podem ser encontradas entre as BNL, de acordo com a composição dos açúcares e suas ligações em uma subunidade simples, repetindo o tamanho da unidade e o grau de polimerização (Van Workun et al., 1998; Laus et al., 2005).

Os trabalhos de pesquisa demonstram que os mutantes deficientes na produção de LPS apresentam alterações no processo de diferenciação do bacteroide, resultando em nódulos inefectivos (Perotto et al., 1994; Carlson et al., 1995; Noel et al., 2000). Já em relação aos EPS, mutantes de *Sinorhizobium meliloti* e *Rhizobium* sp. na produção desses compostos foram incapazes de nodular plantas de *Medicago sativa*, *Leucaena leucocephala* e *Macropitilium atropurpureum* (Leigh et al., 1985; Djordjevic et al., 1987; Battisti et al., 1992). A restauração da nodulação ou da eficiência simbiótica foi verificada após a adição dos EPS durante a inoculação, indicando que esses compostos, juntamente com outras moléculas, como os fatores Nod, atuam como moléculas sinalizadoras essenciais para o estabelecimento da nodulação e da efetividade simbiótica (Battisti et al., 1992; Urzainqui & Walker, 1992).

### **2.3 Importância econômica e ecológica da simbiose entre leguminosas e bactérias nodulíferas**

As leguminosas apresentam grande potencial para utilização em diversos setores da economia nacional, seja para fornecimento de produtos alimentícios, medicinais, ornamentais, forrageiras, apícolas, madeira, cortiça, fibras, óleo e tanino, entre outros, seja para incorporação em sistemas consorciados, no reflorestamento de matas ciliares e na recuperação de áreas degradadas. Muitas dessas espécies são capazes de estabelecer simbiose com as BNL, que proporciona uma redução na utilização de N mineral no cultivo destas plantas.

Portanto, a simbiose entre BNL e leguminosas apresenta grande importância para os ecossistemas agrícolas, principalmente em solos de regiões tropicais, que apresentam baixas concentrações de nitrogênio assimilável, devido às pequenas quantidades de matéria orgânica. Também nessas regiões, devido ao processo de intenso intemperismo químico, normalmente, os solos se encontram exauridos de nutrientes e com altas concentrações de  $H^+$  e  $Al^{3+}$ , fatores que limitam o desenvolvimento das culturas. Aliado a isso, grande parte dos agricultores utiliza baixo nível tecnológico, em que as práticas de calagem e adubação não são realizadas satisfatoriamente. Dessa forma, a utilização de leguminosas que estabelecem simbiose com as BNL tem sido uma possibilidade de aumentar a produtividade, por meio do incremento de N, com baixo custo de produção.

Atualmente, existem estirpes selecionadas de comprovada eficiência em estabelecer simbiose com 94 espécies leguminosas. No entanto, a maioria dos inoculantes comercializadas são para a cultura da soja (Moreira & Siqueira, 2006).

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e o caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) são exemplos de leguminosas que possuem estirpes inoculantes capazes de estabelecer simbiose eficiente, mas, como dito anteriormente, na

maioria das vezes, esta tecnologia não é utilizada. Essas duas culturas representam importantes fontes de proteína na dieta alimentar de populações de regiões tropicais. No Brasil, o feijão é bastante cultivado nas regiões sudeste, centro-oeste e sul, enquanto o caupi é utilizado nas regiões norte e nordeste.

No caso do feijão, o Brasil é o segundo maior produtor mundial e a produtividade média está em torno de 840 kg ha<sup>-1</sup> (CONAB, 2008). Em áreas que utilizam manejo adequado de adubação e irrigação, as produtividades são geralmente superiores a 1.500 kg ha<sup>-1</sup> (Silveira & Stone, 1994). As baixas produtividades na maioria das propriedades são dependentes de vários fatores, como genótipo da planta, ambiente e uso adequado de fertilizantes, principalmente nitrogenados, fatores indispensáveis para que a cultura possa expressar todo o seu potencial produtivo (Vieira, 2006; Fullin et al., 1999).

Portanto, observa-se que há grande diferença tecnológica entre os agricultores na utilização de fertilizantes, principalmente os nitrogenados. A grande maioria, que cultiva pequenas áreas, em agricultura tipicamente familiar, praticamente não os utiliza. No outro extremo, os empresários rurais, que cultivam extensas áreas irrigadas, empregam grande quantidade desse nutriente, normalmente em doses superiores a 100 kg ha<sup>-1</sup> (Ferreira et al., 2004). Nas primeiras, destaca-se a necessidade do desenvolvimento de tecnologias de baixo custo, capazes de melhorar a produtividade dos pequenos agricultores de forma sustentável.

No caso da cultura do feijão, trabalhos de pesquisa mostram a viabilidade de utilização da inoculação com BNL, as quais conseguem suprir a quantidade de N suficiente para que essa cultura atinja boa produção de grãos (Mendes et al., 1994; Franco, 1995; Ferreira et al., 2000; Soares et al., 2006; Ferreira et al., 2009), justificando a utilização da técnica de inoculação.

O caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), também conhecido por feijão-de-corda, feijão-macassar e feijão-de-praia, apresenta boa capacidade de

adaptação a diferentes tipos de solos e é cultivado nas regiões norte e nordeste do Brasil, em caráter predominantemente de subsistência (Melo et al., 2005; Silva et al., 2006).

Embora o caupi tenha significativa importância socioeconômica para as regiões norte e nordeste, o rendimento médio é relativamente baixo (300 a 400 kg ha<sup>-1</sup>), em decorrência da disponibilidade insuficiente de nutrientes minerais, especialmente do N (Frota & Pereira, 2000).

O processo de FBN é reconhecidamente eficiente em caupi, de forma que o uso de inoculantes com estirpes selecionadas pode dispensar a utilização de outras fontes de N e proporcionar altos níveis de produtividade (Rumjaneck et al., 2005; Soares et al., 2006). As estimativas da contribuição da FBN no campo são, entretanto, bastante variáveis, tendo sido obtidos valores numa faixa de 40% a 90% do total de N acumulado pela cultura. Essa variabilidade pode ser atribuída a diferenças tanto do genótipo da planta como das estirpes inoculantes, que podem influenciar os níveis de FBN (Rumjaneck et al., 2005), podendo-se também considerar as diferentes condições edafoclimáticas das regiões produtoras.

No Brasil, normalmente, não é utilizada adubação nitrogenada na cultura do caupi, porém, caso a produtividade atual fosse mantida à custa da aplicação de adubo nitrogenado, seria necessário um investimento equivalente a cerca de US\$ 13 milhões, somente para a região nordeste brasileira, o que indica a magnitude da contribuição da FBN para essa cultura em condições de campo (Rumjaneck et al., 2005).

Para alguns gêneros de leguminosas arbóreas ou arbustivas, como *Acacia*, *Enterolobium*, *Erythrina*, *Mimosa*, *Leucaena* e *Sesbania*, entre outros, já existem estirpes selecionadas capazes de fornecer a quantidade de N total ou parcial ao desenvolvimento dessas plantas. A simbiose destas leguminosas com BNL tem recebido bastante atenção, devido, principalmente, à possibilidade de

utilização dessas plantas em áreas de recuperação de solos degradados, reflorestamento de matas ciliares, como culturas intercalares com culturas agrícolas (aleias) e como adubação verde.

Dentre essas leguminosas, o gênero *Sesbania* apresenta em torno de 70 espécies, distribuídas entre ervas, arbustos ou árvores de pequeno a médio porte, sendo encontradas nas regiões tropicais e subtropicais. Essas plantas são capazes de tolerar condições de baixa oxigenação, tornando-as aptas para o reflorestamento de matas ciliares. São também indicadas para a recuperação de áreas degradadas, utilização na formação de cercas vivas, barreiras contra o vento e, em alguns casos, como fornecedoras de fibras de boa qualidade e na alimentação animal (Allen & Allen, 1981). Além disso, estas espécies formam simbiose com as BNL presentes nos solos, proporcionando a essas plantas bom desenvolvimento em solos de baixa fertilidade natural e contribuindo para aumentar a quantidade de N disponível no solo (Ndoye et al., 1990).

Os estudos das bactérias que nodulam algumas espécies deste gênero possibilitaram a identificação de um novo gênero e de novas espécies de BNL. Por meio do isolamento de nódulos radiculares e caulinares de *S. rostrata*, foi descrito um novo gênero de BNL, *Azorhizobium* e a espécie *A. caulinodans*, cuja estirpe tipo é a ORS 571<sup>T</sup> (Dreyfus et al., 1988). Outras duas novas espécies de *Sinorhizobium*, *S. saheli* e *S. teranga*, foram isoladas de nódulos de *S. rostrata*, *S. cannabina*, *S. aculeata*, *S. sesban*, *S. grandiflora* e *S. pachicarpa* (De Lajudie et al., 1994). A estirpe S02<sup>T</sup> foi isolada de nódulos de *S. herbacea* e identificada como uma nova espécie: *Rhizobium huautlense* (Wang et al., 1998). Em 2006, foi descrita a segunda espécie do gênero *Azorhizobium*, *A. doebereineriae*, isolada de nódulos de *S. virgata* (Moreira et al., 2006).

Para outras espécies, como *S. cannabina*, *S. exasperata*, *S. punicea* e *S. sericea*, estudos têm sido desenvolvidos visando identificar os microssimbiontes

destas espécies e a faixa de hospedeiros das BNL (Vinuesa et al., 2005; Cummings et al., 2009).

No Brasil, *S. virgata* é a principal espécie representante desse gênero, sendo encontrada nas regiões sul, sudeste e centro-oeste (Pott & Pott, 1994). Em muitos trabalhos, esta planta é considerada como invasora de áreas úmidas ou alagadas, como lavouras de arroz irrigado e pastagens, nas quais pode causar problemas ao gado, devido à presença de compostos tóxicos, principalmente nas sementes (Kissmann & Groth, 1999; Lorenzi, 2000). No entanto, foi demonstrado que *S. virgata* apresenta propriedades farmacológicas (Braggio et al., 2002), pois o tratamento oral com sumo liofilizado de suas folhas em camundongos diminuiu a reação ao estímulo doloroso e reduziu o edema inflamatório.

Além disso, por tolerar condições de baixa oxigenação, *S. virgata* é utilizada no reflorestamento de matas ciliares (Allen & Allen, 1981; Franco et al., 1996), na atividade apícola e como fornecedora de lenha; suas sementes torradas são utilizadas para substituir o café na Argentina (Pott & Pott, 1994).

A estirpe BR 5401<sup>T</sup>, da espécie *A. doebereineriae*, é recomendada como inoculante para essa leguminosa. Os estudos mostram que esta estirpe, quando em simbiose com *S. virgata*, apresenta elevada capacidade de fixar N<sub>2</sub>, fornecendo a quantidade de N necessária ao desenvolvimento desta leguminosa, quando comparada aos tratamentos em que foi adicionado N mineral (Faria & Guedes, 1999; Gonçalves & Moreira, 2004; Florentino & Moreira, 2009; Florentino et al., 2009). Esses estudos mostram também que a simbiose entre esses dois organismos é altamente específica. *S. virgata* somente estabelece simbiose eficiente quando inoculada com estirpes de *A. doebereineriae*. Por outro lado, esta bactéria somente induz nodulação efetiva nesta planta.

## **2.4 Fatores que regulam a simbiose entre bactérias nodulíferas e leguminosas**

Dentre os principais fatores limitantes ao estabelecimento da simbiose entre leguminosas e bactérias nodulíferas fixadoras de N<sub>2</sub>, podem ser incluídas as características intrínsecas da leguminosa hospedeira e da bactéria, e também as condições ambientais.

Em relação às características da leguminosa hospedeira, estudos mostram que pequeno número dessas espécies tem sido investigado quanto à capacidade de nodular. No entanto, observa-se que a capacidade de nodular parece estar correlacionada ao grau de evolução da espécie dentro da família, de modo que, nos grupos mais primitivos de Caesalpinioideae, a maioria das espécies é não nodulífera, enquanto nas Mimosoideae e Papilionoideae o número de espécies não nodulíferas é bem menor (Moreira & Siqueira, 2006).

Em se tratando das características intrínsecas da leguminosa hospedeira, sabe-se que esta libera vários compostos químicos, os quais podem estimular a bactéria nodulífera a expressar os genes da nodulação e iniciar os processos de infecção. Dentre esses compostos, os flavonoides têm sido os mais estudados. Estes são compostos do metabolismo secundário ocorrem em abundância no reino vegetal e caracterizam-se, estruturalmente, por dois anéis aromáticos conectados por uma ponte de três átomos de carbono (C6-C3-C6) (Moreira & Siqueira, 2009).

Dentre as diversas funções dos flavonoides, podem-se citar: proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta e visível, contra insetos, fungos, vírus e bactérias; atração de animais com finalidade de polinização; funcionamento como antioxidantes; controle da ação de hormônios vegetais e ação alelopática, destacando-se, ainda, nas interações entre plantas e microrganismos, principalmente entre leguminosas e bactérias nodulíferas (Wink & Mohamed, 2003).

Tem sido demonstrado que cada planta produz diferentes flavonoides e a quantidade e o espectro desses compostos pode variar com a idade e com o estado fisiológico da planta (Harborne & Williams, 2001). Dessa forma, a liberação de flavonoides pela planta é o primeiro fator que seleciona as possíveis BNL capazes de nodular esta leguminosa.

O reconhecimento dos flavonoides liberados pelas leguminosas pelas BNL no solo é verificado quando ocorre a ativação da proteína NodD da bactéria, desencadeando a transcrição dos genes da nodulação *nodABC* e a síntese dos fatores Nod. A planta reconhece estes fatores Nod e inicia-se o encurvamento do pelo radicular e, posteriormente, a formação dos nódulos (Redmond et al., 1986).

Dessa forma, os flavonoides e os fatores Nod são moléculas essenciais para o estabelecimento de uma interação específica, garantindo que a planta hospedeira somente estabeleça simbiose com uma estirpe de rizóbio compatível.

Outro fator que regula a simbiose entre leguminosas e BNL são as condições ambientais limitantes. Fatores como altas temperaturas e concentrações salinas, estresse hídrico e acidez do solo, associados à presença de  $Al^{+3}$  e  $Mn^{+2}$  e deficiência de macro e micronutrientes, especialmente Mo e Co, podem afetar a sobrevivência, o crescimento e a capacidade de fixação de  $N_2$  pelas estirpes de BNL (Moreira & Siqueira, 2006).

Dentre esses fatores, a acidez do solo e a toxidez por  $Al^{3+}$  têm sido apontadas como causas principais do insucesso no estabelecimento de leguminosas, pois pode prejudicar tanto o crescimento da planta como também o processo de FBN (Duguma et al., 1988).

De modo geral, quanto maior for a tolerância de uma estirpe às condições adversas, maior será a sua competitividade com as BNL nativas, assim como sua capacidade de superar relações antagônicas com populações de

outros organismos; conseqüentemente, essa bactéria terá condições de estabelecer uma simbiose efetiva com a leguminosa hospedeira.

## **2.5 Exopolissacarídeos como mecanismo de adaptação a condições ambientais limitantes**

Para se sobrepor às condições ambientais adversas, os microrganismos podem desenvolver vários mecanismos de proteção (Lindquist, 1986). No caso das BNL, a tolerância a condições de acidez tem sido bastante estudada e os estudos mostram que são vários os prováveis mecanismos adotados nessas condições, como regulação do pH citoplasmático (Chen et al., 1993; Graham et al., 1994), produção de EPS (Cunningham & Munns, 1984), alterações na membrana plasmática (Graham et al., 1994) e produção de glutatona (Ricciolo et al., 2000).

Em relação aos EPS, foi demonstrado que as estirpes de *Rhizobium* que produzem maior quantidade de EPS são mais tolerantes às condições de acidez quando comparadas com estirpes que produzem menor quantidade desses compostos (Cunningham & Munns, 1984). Essa correlação entre tolerância e produção de EPS também é observada em trabalhos em que as estirpes de BNL são submetidas a diferentes níveis de salinidade (Eaglesham et al., 1987; Xavier et al., 1998; Freitas et al., 2007; Xavier et al., 2007). Uma explicação é que os EPS envolvem as células bacterianas, diminuindo o contato da superfície celular com o meio salino, proporcionando maior resistência da célula bacteriana ao efeito osmótico (Elsheikh & Wood, 1990).

A função desses compostos como mecanismo de proteção torna-se mais evidente em alguns casos em que as estirpes de BNL, quando cultivadas em condições ambientais limitantes, passam a produzir maior quantidade de EPS. Isso é evidenciado para estirpes de *Bradyrhizobium* cultivadas em condição de

acidez (Barberi et al., 2004; Miguel & Moreira, 2001; Macció et al., 2002). Nesses casos, o aumento na produção de EPS é considerado um mecanismo de proteção adotado por estas bactérias.

Em *Sinorhizobium meliloti*, também é verificado aumento na síntese de EPS quando esta bactéria é cultivada em condições de baixo fosfato (Mendrygal & Gonzalez, 2000). Para esta bactéria, além dos estudos de produção quantitativa de EPS, foram realizados também estudos da composição e estrutura química desses compostos. *S. meliloti* produz dois tipos de EPS: o EPS I, que é succinoglicano e o EPS II, que é galactoglucana. O succinoglicano é composto por unidades repetidas de octassacarídeos, que são constituídos por uma galactose e sete glicoses contendo radicais acetil, succinil e piruvato. O EPS II é um dissacarídeo constituído por unidades repetidas de glicose e galactose, com radicais acetil e piruvato. A quantidade de fosfato é que regula a produção de um ou de outro EPS nesta bactéria. Quando cultivado em condições normais, *S. meliloti* tende a produzir o EPS I. Já em condições de baixo fosfato, predomina o EPS II (Mendrygal & Gonzalez, 2000).

*S. meliloti* é a BNL que tem sido mais estudada em relação à produção de EPS e à influência desses compostos na adaptação e na nodulação. Uma vez detectado que a composição química desta bactéria é modificada de acordo com a condição de fosfato no meio (Mendrygal & Gonzalez, 2000), foram realizados estudos visando determinar a influência desses compostos na nodulação de *Medicago sativa*. Foi observado que o EPS I é mais eficiente em mediar os processos de invasão, porém, ambos os EPS atuaram no processo de nodulação de *M. sativa* (Pellock et al., 2000). Estes autores relatam que a capacidade de *S. meliloti* produzir dois tipos de EPS e o fato de ambos atuarem no processo de nodulação proporcionam vantagem competitiva a esta estirpe, pois, mesmo em condições ambientais limitantes, os processos de nodulação e fixação do N<sub>2</sub> não serão afetadas.

Para outras bactérias, como *Klebsiella aerogenes*, *Pseudomonas putida* e *Arthrobacter viscosus*, é bem evidenciada a função dos EPS na complexação de metais, o que pode aumentar a sua sobrevivência em solos que contenham estes elementos (Scott & Palmer, 1990).

## **2.6 Exopolissacarídeos sintetizados por bactérias nodulíferas em leguminosas (BNL)**

Grande diversidade nas estruturas químicas dos EPS pode ser encontrada entre as BNL, de acordo com a composição dos açúcares e suas ligações em uma subunidade simples, repetindo o tamanho da unidade e o grau de polimerização (Van Workun et al., 1998; Laus et al., 2005), como se observa na Figura 2.

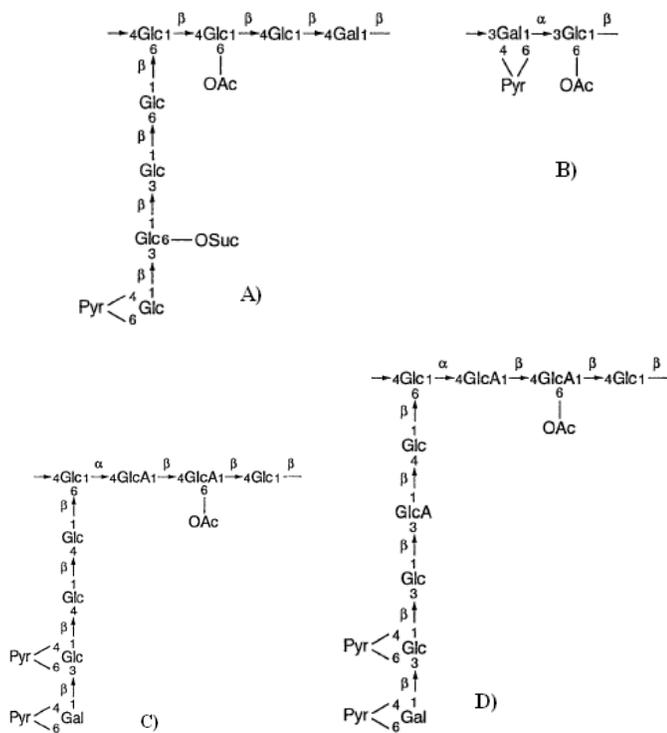


FIGURA 2 Estrutura primária de EPSs de diferentes espécies de BNL. A) EPS I de *S. meliloti*. B) EPS II de *S. meliloti*. C) EPS de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. D) EPS de *R. leguminosarum* bv. *viciae* 248. Glc = glicose; Gal = galactose; GlcA = ácido glucorônico; pyr = piruvato; Suc = succinato; Ac = acetato (Spaink, 2000).

Entre os EPS mais conhecidos produzidos por BNL, está o succinoglicano (EPS I), produzido por varias estirpes de *Sinorhizobium meliloti*. É composto de um octassacarídeo de unidades repetidas contendo uma galactose e sete glicoses ligadas por ligações glicosídicas  $\beta$ -1,3,  $\beta$ -1,4,  $\beta$ -1,6 (Leigh et al., 1985; Reinhold et al., 1994). *S. meliloti* também possui a habilidade de sintetizar um outro exopolissacarídeo distinto, designado de galactoglucano (EPS II), que é um dissacarídeo de unidades repetidas, composto por uma glicose acetilada e

uma galactose piruvatada, com ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,3 e  $\beta$ -1,3 (Zhan et al., 1989; Her et al., 1990).

Estirpes de *Rhizobium leguminosarum*, apesar de pertencentes a diferentes biovares (ex. *trifolii* e *viciae*) e nodularem diferentes plantas hospedeiras, possuem um EPS conservado, composto por glicose, ácido galacturônico e galactose, na proporção de 5:2:1, com ligações glicosídicas  $\beta$ -1,6 (Robertsen et al., 1981; O'Neil et al., 1991). No entanto, algumas linhagens secretam EPS com diferentes conteúdos de açúcar e comprimento de cadeia, como *R. leguminosarum* pv. *viciae* 248, que possui resíduo de ácido galacturônico adicional aos demais açúcares presentes no EPS padrão descrito para as demais linhagens (Canter-Cremers et al., 1991).

A composição de monossacarídeos do EPS sintetizado por *Bradyrhizobium japonicum* é constituída por manose, glicose, ácido galacturônico, galactose, 4-O-metil galactose, ramnose e 4-O-metil-ácido galacturônico. No entanto, é observada grande variação nas proporções desses monossacarídeos entre as diferentes estirpes (Huber et al., 1984).

Estudos estruturais de EPS produzidos por espécies de *Burkholderia* têm sido descritos, principalmente para espécies patogênicas de humanos e animais. Como exemplo de EPS descrito para espécies fixadoras de N<sub>2</sub>, pode ser citada a estirpe *B. brasiliensis* M130, que produz dois EPS distintos, descritos como EPS A e EPS B. O EPS A é composto de ramnose, glicose e galactose, na proporção de 2:2:1, enquanto o EPS B é composto por ramnose, galactose, glicose e glicose A, na proporção de 2:2:2:2 (Mattos et al., 2001).

A composição química de EPS produzidos por outras espécies de BNL, como o produzido pela estirpe KYGT207 de *Rhizobium sllae*, também está descrita na literatura. O EPS desta linhagem é composto de resíduos de glicose, galactose e ácido manurônico, na proporção de 2:1:1 (Kaci et al., 2005).

O EPS produzido pela estirpe ORS571<sup>T</sup> de *Azorhizobium caulinodans*, diferentemente dos demais EPSs produzidos por outras espécies de BNL, é um homossacarídeo linear, composto apenas de resíduos de  $\alpha$ -1,3-4,6-0-(1-carboxyetilideno)-D-galactosil (D' Haeze et al., 2004).

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, O. N.; ALLEN, E. K. **The leguminosae**: a source book of characteristics, uses and nodulation. Wisconsin: University of Madison, 1981.
- BARBERI, A.; MOREIRA, F. M. S.; FLORENTINO, L. A.; RODRIGUES, M. I. D. Crescimento de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe BR 29 em meios de cultivo com diferentes valores de pH inicial. **Ciência e agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 2, p. 397, mar/abr. 2004.
- BATTISTI, L.; LARA, J. C.; LEIGH, J. A. Specific oligosaccharide form of the *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide promotes nodule invasion in alfalfa. **Biochemistry**, Washington, v. 89, n. 12, p. 5625-5629, June 1992.
- BRAGGIO, M. M.; LIMA, M. E. L.; VEASEY, E. A.; HARAGUCHI, M. Atividades farmacológicas das folhas da *sesbania virgata* (cav.) pers. **Arquivo do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 69, n. 4, p. 49-53, out./dez. 2002.
- CANTER-CREMERS, H. C. J.; STEVENS, K.; LUGTENBERG, B. J. J.; WIJFFELMAN, C. A.; BATLEY, M.; REDMOND, J. W.; BREEDVELD, M.; ZEVENHUIZEN, L. P. T. M. Unusual structure of the exopolysaccharide of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* strain 248. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 218, p. 185-200, Sept. 1991.
- CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. 1017 p.
- CARLSON, W. R.; RHEUS, B.; CHEN, T. B.; BHAT, U. R.; NOEL, K. D. Lypopolysaccharide Core Structures in *Rhizobium etli* and mutants deficient in O-antigen. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 270, n. 20, p.11783-11788, May 1995.
- CHEN, H.; RICHARDSON, A. E.; ROLFE, B. G. Studies of the physiological and genetic basis of acid tolerance in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 6, n. 59, p. 1798-1804, June 1993.

CHEN, W. X.; LAEVENS, S.; LEE, T.; COENYE, T.; VOS, P.; MERGEAY, M.; VANDAMME, P. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov. isolated from nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Spencers Wood, v. 51, n. 5, p. 1729-1735, Sept. 2001.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Previsão e acompanhamento da safra 2007/2008**: quarto levantamento, janeiro/2008. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 2 fev. 2008.

CUMMINGS, S. P.; GYANESHWAR, P.; VINUESA, P.; FARRUGGIA, F. T.; ANDREWS, M.; HUMPHRY, D.; ELLIOTT, G. N.; NELSON, A.; ORR, O.; PETTITT, D.; SHAH, G. R.; SANTOS, S. R.; KRISHNAN, H. B.; ODEE, D.; MOREIRA, F. M. S.; SPRENT, J. I.; YOUNG, J. P. W.; JAMES, E. K. Nodulation of *Sesbania* species by *Rhizobium* (*Agrobacterium*) strain IRBG74 and other rhizobia. **Environmental Microbiology**, Washington, v. 11, n. 10, p. 2510-2525, June 2009.

CUNNINGHAM, S. D.; MUNNS, D. N. Effects of rhizobial extracellular polysaccharide on pH and aluminum activity. **Soil Science Society American Journal**, Madison, v. 48, n. 6, p. 1276-1280, July 1984.

DE LAJUDIE, P.; WILLENS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; MAESTROJUAN, G.; NEYRA, M.; COLLINS, M. D.; DREYFUS, B. Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. Nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov. & *Sinorhizobium teranga* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 44, n. 4, p. 715-733, Oct. 1994.

D'HAENZE, W.; GLUSHKA, J.; DE RYCKE, R.; HOLSTERS, M.; CARLSON, R. W. Structural characterization of extracellular polysaccharides of *Azorhizobium caulinodans* and importance for nodule initiation on *Sesbania rostrata*. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 52, n. 2, p. 485-500, Apr. 2004.

DE LAJUDIE, P.; WILLENS, A.; NICK, G.; MOREIRA, F.; MOLOUBA, F.; HOSTE, B.; TORCK, N.; NEYRA, M.; COLLINS, M. D.; LINDSTROM, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v. 48, n. 2, p. 369-382, Apr. 1998.

DJORDJEVIC, S., P.; CHEN, H.; BATLEY, M.; REDMOND, J. W.; ROLFE, B. G. Nitrogen fixation ability of exopolysaccharide synthesis mutants of *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *Rhizobium trifolii* is restored by the addition of homologous exopolysaccharides. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 169, n. 1, p. 53-60, Jan. 1987.

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**, Washington, v. 38, n. 1, p. 89-98, Jan. 1988.

DUGUMA, B.; KANG, B. T.; OKALI, D. U. U. Effect of liming and phosphorus application on performance of *Leucaena leucocephala* in acid soils. **Plant and Soil**, The Hague, v. 110, n. 1, p. 57-61, Aug. 1988.

EAGLESHAM, A. R. J.; STOWERS, M. D.; MAINA, M. L.; GOLDMAN, B. J.; SINCLAIR, M. J.; AYANABA, A. Physiological and biochemical aspects of Diversity of *Bradyrhizobium* sp. (Vigna) from three West African Soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 19, n. 5, p. 575-581, 1987.

ELSHEIKH, E. A. E.; WOOD, M. Salt effects on survival and multiplication of chick pea and soybean rhizobia. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 22, n.3, p. 343-347, 1990.

FARIA, S. M.; GUEDES, R. E. **Obtenção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies florestais**. Seropédica: Embrapa, 1999. p. 1-4. (Recomendação Técnica, 5).

FERREIRA, A. C. B.; ANDRADE, M. J. B.; ARAÚJO, G. A. A. Nutrição e adubação do feijoeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 25, n. 223, p. 61-72, 2004.

FERREIRA, A. N.; ARF, O.; CARVALHO, M. A. C.; ARAÚJO, R. S.; SÁ, M. E.; BUZETTI, S. Estirpes de *Rhizobium tropici* na inoculação do feijoeiro. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n.3, p. 507-512, Jul./Sep. 2000.

FERREIRA, P. A. A.; SILVA, M. A. P.; CASSETARI, A.; RUFINI, M.; MOREIRA, F. M. S.; ANDRADE, M. J. B. Inoculação com cepas de rizóbio na cultura do feijoeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 7, p. 2210-2212, Out. 2009.

- FLORENTINO, L. A.; GUIMARÃES, A. P.; RUFINI, M.; SILVA, K.; MOREIRA, F. M. S. *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbionts of other species. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n.5, p. 667-676, sep/oct. 2009.
- FLORENTINO, L. A.; MOREIRA, F. M. S. Características simbióticas e fenotípias de *Azorhizobium doebereineriae*, microssimbiote de *Sesbania virgata*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 33, n. 2, p. 215-226, abr. 2009.
- FORSBERG, L. S.; CARLSON, R. W. The Structures of the Lipopolysaccharides from *Rhizobium etli* Strains CE358 and CE35. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, n. 5, p. 2747-2757, Jan. 1998.
- FRANCO, A. A. Nutrição nitrogenada na cultura do feijoeiro. **Informe Agrônômico**, Piracicaba, n. 70, p. 4-5, 1995.
- FRANCO, A. A.; CAMPELO, E. F. C.; DIAS, L. E.; FARIA, S. M. **Uso de leguminosas associadas a microrganismos na revegetação de áreas de mineração de bauxita em Porto-Trombetas-PA**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1996. 69 p.
- FRANK, B. Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, Berlin, v.7, p.332-346, 1889.
- FRAYSSE, N.; COUDERC, F.; POINSOT, V. Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 270, n. 7, p. 1365-1380, Apr. 2003.
- FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, C. L.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; LYRA, M. C. C. P. Caracterização de rizóbios isolados de jacatupé cultivado em solo salino do estado de Pernambuco, Brasil. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 3, p. 497-504, 2007.
- FROTA, A. B.; PEREIRA, P. R. Caracterização da produção de feijão-feijão-caupi na região Meio-Norte do Brasil. In: CARDOSO, M. J. (Org.). **A cultura do feijão-feijão-caupi no meio-norte do Brasil**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2000. p. 9-25. (Circular Técnica, 28).

FULLIN, E. A.; ZANGRANDE, M. B.; LANI, J. A.; MENDONÇA, L. F.; DESSAUNE FILHO, N. Nitrogênio e molibdênio na adubação do feijoeiro irrigado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 7, p. 1145-1149, jul. 1999.

GONÇALVES, M.; MOREIRA, F. M. S. Specificity of the Legume *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. and its Nodule Isolates *Azorhizobium johannae* with other Legume Hostes and Rhizobia. I. **Symbiosis**, Phyladelphia, v. 36, n. 1, p. 57-68, Jan. 2004.

GRAHAM, P. H.; DRAEGER, K. J.; FERREY, M. L.; CONROY, M. J.; HAMMER, B. E.; MARTINEZ, 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**, Ottawa, v. 40, n. 3, p. 198-207, Mar. 1994.

GRAHAM, P. H.; VITERI, S. E.; MACKIE, F.; VARGAS, A. A. T.; PALACIOS, A. Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 5, p. 121-128, Sept. 1982.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A.. Anthocyanins and other flavonoids. **Natural Product Report**, Cambridge, v. 21, n. 4, p. 539-573, Sept. 2001.

HER, G. R.; GLAZEBROOK, J.; WALKER, G. C.; REINHOLD, V. N. Structural studies of a novel exopolysaccharide produced by a mutant of *Rhizobium meliloti* strain Rm 1021. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 198, n. 2, p. 305-312, May 1990.

HUBER, T. A.; AGARWAL, A. K.; KEISTER, D. L. Extracellular polysaccharide composition, ex plant nitrogenase activity, and DNA homology in *Rhizobium japonicum*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 158, n. 3, p. 1168-1171, 1984.

JARVIS, B. D. W.; VAN BERKUM, W. X.; CHEN, S. M.; NOUR, M. P.; FERNANDEZ, J. C.; CLEYET-MAREL, J. C.; GILLIS, M. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium mediterraneum* and *Rhizobium tiashanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 47, n. 1, p. 895-898, Apr. 1997.

- 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**, Washington, v. 32, n. 2, p. 136-139, Apr. 1982.
- KACI, Y.; HEYRAUD, A.; BARAKAT, M.; HEULIN, T. Isolation and identification of an EPS-producing *Rhizobium* strain from arid soil (Algeria): characterization of its EPS and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure. **Research in Microbiology**, Paris, v. 156, n. 4, p. 522-531, May 2005.
- KENNEDY, A. C.; PAPENDICK, R. I. Microbial characteristics of soil quality. **Journal of Soil and Water Conservation**, Ankeny, v. 50, n. 3, p. 243-248, May, 1995.
- KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 2. ed. São Paulo: BASF Brasileira, 1999. t. 2.
- LAUS, M. C.; VAN BRUSSEL, A. A. N.; KIJNE, J. W. Role of Cellulose Fibrils and Exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* in Attachment to and Infection of *Vicia sativa* Root Hairs. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.18, n. 6, p.533-538, June 2005.
- LEIGH, J. A.; SIGNER, E. R.; WALKER, G. C. Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 82, p. 6231-6235, Sept. 1985.
- LEPEK, C. V.; D'ANTUONO, A. Bacterial surface polysaccharides and their role in the rhizobia-legume association. **Lotus Newsletter**, Missouri, v. 35, n. 1, p. 93-105, July 2005.
- LINDQUIST, S. The heat shock response. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 55, p. 1151-1191, July, 1986.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3. ed. Nova Odessa: Instituto plantarum, 2000.
- MACCIÓ, D.; FABRA, A.; CASTRO, S. Acidity and calcium interaction affect the growth of *Bradyrhizobium* sp. and the attachment to peanut roots. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 34, n. 2, p. 201-208, Feb. 2002.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M. ; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10. ed. São Paulo: Prentice Hall, 2004. 608 p.

MATTOS, K. A.; JONES, C.; HEISE, N.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L. Structure of an acidic exopolysaccharide produced by the diazotrophic endophytic bacterium *Burkholderia brasiliensis*. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 268, n. 11, p. 3174-3179, June 2001.

MELO, F. B.; CARDOSO, M. J.; SALVIANO, A. A. C. Fertilidade do solo e adubação. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO V. Q. (Ed). **Feijão-Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa, 2005.

MENDES, I. C.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R.; VARGAS, M. A. T. Eficiência fixadora de estirpes de rizóbio em duas cultivares de feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 18, n. 3, p. 421-425, out./dez. 1994.

MENDRYGAL, K.; GONZALEZ, J. Environmental Regulation of Exopolysaccharide Production in *Sinorhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 182, n. 3, p. 599-606, Feb. 2000.

MIGUEL, D. L. MOREIRA, F. M. S. Influência do pH do meio de cultivo e da turfa no comportamento de estirpes de *Bradyrhizobium*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 25, n. 4, p. 873-883, out./dez. 2001.

MOREIRA, F. M. S.; CRUZ, L.; FARIA, S. M.; MARSH, T.; MARTINEZ-ROMERO, E.; PEDROSA, F. O.; YOUNG, P. P. W. *Azorhizobium doebereineriae* sp. nov. Microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 29, n. 3, p. 197-206, Oct. 2006.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002. 626p.

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the  $\beta$ -subclass of proteobacteria. **Nature**, London, v. 411, n. 6850, p. 948-950, June 2001.

NDOYE, L.; TOMEKPE, K.; DREYFUS, B.; DOMMERGUES, Y. R. *Sesbania* and *Rhizobium* symbiosis: nodulation and nitrogen fixation. In: MACKLIN, B.; EVANS, D. O. **Perennial *Sesbania* species in agroforestry systems**. Waimanalo: Nitrogen fixing tree association, 1990.

NOEL, D. K.; FORSBEG, L. S.; CARLSON, R. W. Varying the Abundance of O Antigen in *Rhizobium etli* and Its Effect on Symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 182, n. 19, p. 5317-5324, Oct. 2000.

O'NEILL, M. A.; DARVILL, A. G.; ALBERSHEIM, P. The degree of esterification and points of substitution by O-acetyl and O-(3-hydroxybutanoyl) groups in the acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* biovars *viciae*, *trifolii*, and *phaseoli* are not related to host range. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 266, n. 15, p. 9549-9555, May 1991.

PELLOCK, B. J.; CHENG, H.; WALKER, G. C. Alfalfa Root Nodule Invasion Efficiency Is Dependent on *Sinorhizobium meliloti* Polysaccharides. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 182, n. 15, p. 4310-4318, Aug. 2000.

PEROTTO, S.; BREWIN, N. J.; KANNENBERG, E. L. Cytological evidence for a host defence response that reduces cell and tissue invasion in pea nodules by lipopolysaccharides-defective mutants of *Rhizobium leguminosarum* strain 3841. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 7, n. 1, p. 99-112, Oct. 1994.

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do Pantanal**. Corumbá: EMBRAPA, 1994. 320p.

REDMOND, J. W.; BATLEY, M.; DJORDJEVIC, M. A.; INNES, R. W.; KUEMPEL, P. L.; ROLFE, B.G. Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. **Nature**, London, v. 323, n. 6089, p. 632-635, Oct. 1986.

REINHOLD, B. B.; CHAN, S. Y.; REUBER, T. L.; MARRA, A.; WALKER, G. C.; REINHOLD, V. N. Detailed structural characterization of succinoglycan, the major symbiotically important exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* strain Rm1021. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 176, n. 7, p. 1997-2002, Apr. 1994.

RICCILLO, P. M.; MUGLIA, C. I.; DE BRUIJN, F. J.; ROE, A. J.; BOOTH, I. R.; AGUILAR, O. M. Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 182, n. 6, p. 1748-1753, Mar. 2000.

RIVAS, R.; VELASQUEZ, E.; WILLEMS, A.; VIZCAINO, N.; SUBBA-RAO, N. S.; MATEOS, P. F.; GILLIS, M.; DAZZO, F. B.; MARTINEZ-MOLINA, E. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 11, p. 5217-5222, Nov. 2002.

ROBERTSEN, B. K.; AMAN, P.; DARVILL, A. G.; MCNEIL, M.; ALBERSHEIM, P. Hostsymbiont interactions: The structure of acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 67, n. 3, p. 389-400, Mar. 1981.

RUMJANECK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P. Fixação biológica do nitrogênio. In: FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO V. Q. (Ed.). **Feijão-Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa, 2005.519 p

RUMJANECK, N. G.; XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; MORGADO, L. B.; NEVES, M. C. P. **Feijão-caupi tem uma nova estirpe de rizóbio, BR 3267, recomendada como inoculante**. Seropédica: Embrapa, 2006. 16p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 15).

SCHULTZE, M.; KONDOROSI, A. Regulation of symbiotic root nodule development. **Annual Review Genetics**, Palo Alto, v. 32, p. 33-57, Dec. 1998.

SCOTT, J. A.; PALMER, S. J. Sites of cadmium uptake in bacteria used for biosorption. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 33, n. 2, p. 221-225, May 1990.

SILVA, V. N.; SILVA, L. E. S. F.; FIGUEIREDO, M. V. B. Co-inoculação de sementes de feijão-caupi com *Bradyrhizobium* e *Paenibacillus* e sua eficiência na absorção de cálcio, ferro e fósforo pela planta. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 36, n. 2, p. 95-99, jul./ago. 2006.

SILVEIRA, P. M.; STONE, L. F. Irrigação do feijoeiro. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 17, n. 178, p. 28-34, 1994.

SKORUPSKA, A.; JANCZAREK, M.; MARCZAK, M.; MAZUR, A.; KRÓL, J. Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. **Microbial Cell Factories**, London, v.5, n.7, p.1-19, Feb. 2006.

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

SPAINK, H. P. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.54, p.257-288, Oct. 2000.

SY, A.; GIRAUD, E.; JOURAND, P.; GARCIA, N.; WILLEMS, A.; DE LAJUDIE, P.; PRIN, Y.; NEYRA, M.; GILLIS, M.; BOIVIN-MASSON, C.; DREYFUS, B. *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, n. 1, p. 214-220, Jan. 2001.

TRUJILLO, M. E.; WILLEMS, A.; ABRIL, A.; PLANCHUELO, A. M.; RIVAS, R.; LUDENA, D.; MATEOS, P. F.; MARTINEZ-MOLINA, E.; VELASQUEZ, E. Nodulation of *Lupinus albus* by Strains of *Ochrobactrum lupine*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n.3, p. 1318-1327, Mar. 2005.

URZAINQUI, A.; WALKER, G. C. Exogenous suppression of the symbiotic deficiencies of *Rhizobium meliloti* *exo* mutants. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 174, n. 10, p. 3403-3406, May 1992.

VALVERDE, A.; VELAZQUEZ, E.; FERNANDEZ-SANTOS, F.; VIZCAINO, N.; RIVAS, R.; MATEOS, P. F.; MARTINEZ-MOLINA, E.; IGUAL, J. M.; WILLEMS, A. *Phyllobacterium trifolii* sp. nov., nodulating *Trifolium* and *Lupinus* in Spanish soils. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Spencers Wood, v. 56, n. 10, p. 1985-1989, Oct. 2006.

VAN BERKUN, P.; EARDLY, B. D. The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificand* is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschinomene indica*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 3, p. 1132-1136, Mar. 2002.

VAN WORKUM, W. A. T.; VAN SLAGEREN, S.; VAN BRUSSEL, A. A. N.; KIJNE, J. W. Role of exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* as host plant-specific molecules required for infection thread formation during nodulation of *Vicia sativa*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 11, n. 12, p. 1233-1241, Dec. 1998.

VIEIRA, C. Adubação mineral e calagem. In: VIEIRA, C.; PAULA JÚNIOR., T. J.; BOREM, A. (Ed.). **Feijão**. 2. ed. atual. Viçosa, MG: UFV, 2006. p. 115-142.

VINUESA, P.; SILVA, C.; LORITEB, M. J.; IZAGUIRRE-MAYORAL, M. L.; BEDMAR, E. J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from rrs, atpD, recA and nifH sequences, and their use in the classification of *Sesbania* microsymbionts from Venezuelan wetlands. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 28, n. 8, p. 702-716, Oct. 2005.

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea, rhizobia population. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 27, n. 4, p. 386-392. Sept. 1998.

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; RUMJANEK, N. G.; NEVES, M. C. P. Tolerância de rizóbio de feijão-caupi à salinidade e à temperatura em condição in vitro. **Caatinga**, Mossoró, v. 20, n. 4, p. 1-9, out./dez. 2007.

WANG, E. T.; MATÍNEZ-ROMERO, E. *Sesbania herbacea*-*Rhizobium huautlense* nodulation in flooded soils and comparative characterization of *S. herbacea*-nodulating rhizobia in different environments. **Microbial Ecology**, New York, v. 40, n. 1, p. 25-32, Jan. 2000.

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

WINK, M.; MOHAMED, G. I. A. Evolution of chemical defense traits in the Leguminosae: mapping of distribution patterns of secondary metabolites on a molecular phylogeny inferred from nucleotide sequences of the *rbcL* gene. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 31, n. 8, p. 897-917, Aug. 2003.

ZHAN, H.; LEVERY, S. B.; LEE, C. C.; LEIGH, J. A. A Second Exopolysaccharide of *Rhizobium meliloti* Strain SU47 that can function in root nodule invasion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 86, n. 9, p. 3055-3059, May 1989.

## **CAPÍTULO 2**

### **RELAÇÕES SIMBIÓTICAS ENTRE ESPÉCIES DE *Sesbania* E GÊNEROS DE RIZÓBIOS**

## 1 RESUMO

As leguminosas do gênero *Sesbania* apresentam grande potencial de utilização em áreas de recuperação de solos degradados, no reflorestamento de matas ciliares e em pequenas propriedades, onde são utilizadas, principalmente, como adubos verdes e forrageiras na alimentação de ruminantes. Essas plantas estabelecem simbiose com bactérias nodulíferas em leguminosas (BNL), no entanto, somente cerca de 10% das espécies foram estudadas quanto a esta capacidade. O trabalho foi realizado com os objetivos de estudar a nodulação de sete espécies de *Sesbania* (*S. emerus*, *S. exasperata*, *S. rostrata*, *S. tetraptera*, *S. grandiflora*, *S. sesban* e *S. virgata*), quando inoculadas com oito estirpes de BNL pertencentes a sete gêneros: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Burkholderia* e *Cupriavidus* e com as BNL presentes em dez amostras de solos sob áreas de diferentes sistemas de uso da terra (SUTs) (pastagem, floresta, agricultura, agrofloresta, capoeira e capoeira nova), na Amazônia Ocidental. Foi observada nodulação em todas as espécies de *Sesbania*, quando inoculadas com pelo menos um dos diferentes gêneros de BNL testados. A espécie *S. rostrata* estabeleceu simbiose com maior número de gêneros de BNL (cinco dos sete testados). *S. exasperata*, *S. tetraptera* e *S. virgata* foram mais restritas à nodulação, estabelecendo simbiose somente com um dos gêneros. Dos sete gêneros de BNL estudados, *Azorhizobium* foi o que apresentou o maior número de hospedeiros, dentre as sete espécies de *Sesbania*. Apesar de grande diversidade de BNL presente nas amostras de solos da região Amazônica, não foram encontrados nódulos nas espécies de *Sesbania* quando inoculadas e que foram detectadas utilizando-se siratro como planta isca com essas amostras de solos. Por outro lado, espécies características desses gêneros foram isoladas por siratro. Indicando que a competição com estirpes de outros gêneros impediu a infecção das plantas de *Sesbania* spp..

## 2 ABSTRACT

The leguminous genus *Sesbania* present a great utilization potential for recovering degradade areas, gallery forest reforestation and in small farms, where they are used mainly as green manure and forage for feeding ruminants. These plants establish symbiosis with the Leguminosae-nodulating bacteria (LNB), however, only around 10% of the species were studied in relation to this capacity. This work aimed to study the nodulation of seven *Sesbania* species (*S. emerus*, *S. exasperata*, *S. rostrata*, *S. tetraptera*, *S. grandiflora*, *S. sesban* and *S. virgata*) when inoculated with eight LNB strains belonging to seven genera: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Burkholderia* and *Cupriavidus* and with the LNB present in ten soil samples under different land use systems (LUSs) (pasture, forest, agriculture, agroforestry, old secondary forest and young secondary forest) in Western Amazonia. It was observed nodulation in all *Sesbania* strains when inoculated with at least one of the different LNB genera. The species *S. rostrata* established symbiosis with a greater number of LNB genera (five out of seven tested ones). *S. exasperata*, *S. tetraptera* and *S. virgata* were more specific regarding to nodulation, establishing symbiosis with only with one of the genera. From the seven LNB genera studied, *Azorhizobium* was the one which presented a higher number of hosts among the seven *Sesbania* species. In spite of the great BNL diversity present in the soil samples from Amazonia region that were detected by using siratro as trap species, it was not found nodules in *Sesbania* species when inoculated with these soil samples. On the other hand, siratro was nodulated by all these genera. Indicating that the competition with strains of other genera prevented the *Sesbania* plants infection.

### 3 INTRODUÇÃO

O gênero *Sesbania* pertence à família Leguminosae e subfamília Papilionoideae. Apresenta em torno de setenta espécies, distribuídas entre ervas, arbustos ou árvores de pequeno a médio porte e são encontradas nas regiões tropicais e subtropicais. Essas espécies se desenvolvem bem em solos com baixa fertilidade natural e alagados, apresentando grande potencial de utilização em áreas de recuperação de solos degradados, no reflorestamento de matas ciliares, como adubos verdes, na formação de cercas vivas, em barreiras contra o vento, como fornecedoras de fibras de boa qualidade e forrageiras na alimentação de ruminantes (Allen & Allen, 1981). Algumas espécies, como *S. punicea*, *S. virgata* e *S. grandiflora*, também apresentam atividades farmacológicas (Matsuda et al., 1985; Braggio et al., 2002; Doddola et al., 2008).

O nitrogênio necessário ao crescimento dessas leguminosas pode ser fornecido por meio da simbiose com bactérias que nodulam leguminosas (BNL), presentes nos solos. No entanto, considerando-se o grande número de espécies de *Sesbania*, somente cerca de 10% foram estudadas quanto à nodulação.

Para algumas espécies, como *S. grandiflora* (Turk & Keyser, 1992), *S. punicea* (Frioni et al., 1998) e *S. virgata* (Faria & Guedes, 1999; Gonçalves & Moreira, 2004; Florentino & Moreira, 2009; Florentino et al., 2009), os trabalhos de inoculação cruzada têm mostrado que a simbiose se estabelece preferencialmente com BNL homólogas, ou seja, isoladas de nódulos da mesma espécie. Nesses trabalhos, observa-se que, quando ocorre simbiose com BNL isolada, de outros hospedeiros, ela é ineficiente.

Para a espécie *S. virgata*, os estudos realizados em solos do Sul de Minas Gerais indicam a existência de correlação entre a presença da leguminosa e a do seu microsimbionte, *Azorhizobium doebereinae* (Florentino et al., 2009;

Florentino & Moreira, 2009). No entanto, estirpes de *A. doebereinae* foram isoladas de nódulos da planta isca *Macropitilium atropurpureum* inoculada com amostras de solos da Amazônia (Lima et al., 2009). Em levantamento botânico realizado nessa região, *S. virgata* não foi encontrada entre as 1.241 espécies da família existentes nos principais herbários (Silva et al., 1989), sugerindo que, além da leguminosa hospedeira, outros fatores podem favorecer a presença de *A. doebereinae* nestes solos.

No caso da espécie africana *S. sesban*, apesar de estabelecer simbiose com três gêneros de BNL, *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium*, os estudos indicam que BNL capazes de nodular esta espécie são encontradas principalmente em solos nos quais *S. sesban* ocorre (Bala et al., 2002; 2003). Para outras espécies de *Sesbania*, como *S. emerus* e *S. tetraptera*, embora existam registros de nodulação (Allen & Allen, 1981), as BNL que estabelecem simbiose com estas espécies ainda não foram caracterizadas.

O trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar se sete espécies de *Sesbania*: *S. emerus*, *S. exasperata*, *S. rostrata*, *S. tetraptera*, *S. grandiflora*, *S. sesban* e *S. virgata* apresentam características semelhantes quanto à capacidade de estabelecer simbiose com BNL de diferentes gêneros: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Burkholderia* e *Cupriavidus* e analisar a capacidade dessas leguminosas em estabelecer simbiose com BNL nativas de amostras de solos de áreas sob diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia Ocidental.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Distribuição geográfica das espécies, escarificação e germinação das sementes e cultivo das plantas

A espécie *S. virgata* é nativa da América do Sul. As demais espécies estudadas, *S. emerus*, *S. exasperata*, *S. grandiflora*, *S. rostrata*, *S. sesban* e *S. tetraptera* são nativas de regiões africanas e asiáticas. As sementes de *S. virgata* foram coletadas em áreas de pastagem no Sul de Minas Gerais e as sementes das outras espécies foram doadas pelo Instituto de Zootecnia de Nova Odessa, SP.

Para a escarificação, as sementes foram imersas em ácido sulfúrico concentrado durante 120 minutos para *S. tetraptera* e durante 40 minutos para as demais espécies de *Sesbania*. Após a escarificação, as sementes foram lavadas em água esterilizada e colocadas em placas de Petri contendo algodão e papel de filtro umedecido com água esterilizada, até o surgimento da radícula.

Posteriormente, as sementes recém-germinadas foram inseridas em frascos de vidro escuro contendo 500 mL de solução nutritiva de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950) sem nitrogênio a  $\frac{1}{4}$  da concentração total, previamente autoclavados por 40 minutos, à pressão de  $1,5 \text{ kg cm}^{-2}$ , a  $127^\circ\text{C}$ . Foi cultivada uma planta por frasco. Não houve reposição de solução nutritiva durante a condução dos experimentos.

Os frascos para o cultivo foram preparados conforme a metodologia de Florentino & Moreira (2009), em que cada frasco continha no seu interior uma folha de papel de filtro retangular (3 x 25 cm), que serviu de suporte e condução de solução para as raízes, principalmente quando elas ainda estavam pequenas. Os frascos foram hermeticamente tampados com papel alumínio para evitar contaminação. No momento da semeadura, nessas tampas foi feito um orifício, assepticamente, para a introdução da radícula e dos inóculos (cultura de estirpe ou suspensões de solo).

#### 4.2 Experimento para verificar as características simbióticas de sete espécies de *Sesbania* com diferentes gêneros de BNL

Foi instalado um experimento em casa de vegetação para avaliar a capacidade de *S. emerus*, *S. exasperata*, *S. rostrata*, *S. tetraptera*, *S. grandiflora*, *S. sesban* e *S. virgata* em estabelecer simbiose com oito estirpes de sete gêneros de BNL: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium*, pertencentes à subclasse  $\alpha$ -proteobactéria e *Burkholderia* e *Cupriavidus*, pertencentes à subclasse  $\beta$ -proteobactéria. A identificação dessas estirpes, seus hospedeiros de origem e as características morfológicas em meio de cultura 79 com azul de bromotimol e pH 6,8 (Fred & Waksman, 1928) são apresentados na Tabela 1.

As estirpes ORS 571<sup>T</sup> e BR 5401<sup>T</sup>, do gênero *Azorhizobium*, são recomendadas como inoculante para as espécies *S. rostrata* e *S. virgata*, respectivamente. Neste trabalho, essas duas estirpes foram consideradas como controles positivos para testar se as condições experimentais eram adequadas à nodulação dessas espécies. Para as espécies *S. emerus*, *S. exasperata*, *S. tetraptera*, *S. grandiflora* e *S. sesban*, não foram utilizados estirpes de BNL como controle positivo.

As estirpes de BNL foram cultivadas em meio de cultura 79 líquido, sob agitação por quatro dias. Um mL de meio de cultura contendo 10<sup>9</sup> células foi inoculado em cada semente, no momento da semeadura.

TABELA 1 Identificação da estirpe de BNL, hospedeiro de origem e características morfológicas em meio de cultura 79

Estirpes e códigos de identificação	Hospedeiro de origem	Características morfológicas meio 79				Referência
		ACI <sup>1</sup>	pH <sup>2</sup>	EPS <sup>3</sup>	Cor	
CIAT 899 <sup>1</sup> <i>Rhizobium tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	3	ácido	alta	Amarela	Martínez-Romero et al. (1991)
UFLA 03-84 <i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Vigna unguiculata</i>	7	alcalino	média	Branca	Lacerda et al. (2004); Moreira (2005)
ORS 571 <sup>1</sup> <i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	3	alcalino	baixa	Transparente	Dreyfus et al. (1988)
BR 5401 <sup>1</sup> A. <i>doebereineriae</i>	<i>S. virgata</i>	3	alcalino	baixa	Transparente	Moreira et al. (2006)
BR 6806 <i>Sinorhizobium</i> sp. ( <i>Ensifer adhaerens</i> )	<i>Pithecellobium dulce</i>	4	ácido	alta	Amarela	Moreira et al. (1993); Willems et al. (2003)
BR 3804 <i>Mesorhizobium plurifarum</i>	<i>Chamaecrista ensiformis</i>	4	ácido	alta	Amarela	Moreira et al. (1993)
BR 3405 <i>Burkholderia caribensis</i>	<i>Mimosa caesalpinifolia</i>	4	ácido	média	Amarela	Faria (1997)
LMG 19424 <sup>1</sup> <i>Cupriavidus taiwanensis</i>	<i>Mimosa pudica</i>	3	alcalino	média	Branca	Chen et al. (2001)

<sup>1</sup>Tempo em dias para aparecimento de colônia isolada, <sup>2</sup> reação do meio de cultivo após crescimento de colônias, <sup>3</sup> produção de exopolissacarídeos (alta, média, baixa)

#### 4.3 Experimento para verificar as características simbióticas de sete espécies de *Sesbania* com populações nativas de BNL

Nesse experimento, foi estudada a capacidade de *S. emerus*, *S. exasperata*, *S. rostrata*, *S. tetraptera*, *S. grandiflora*, *S. sesban* e *S. virgata* em estabelecer simbiose com BNL nativas de solos sob diferentes sistemas de uso

da terra (SUTs) na Amazônia Ocidental. O local da coleta foi a região do Alto Solimões, na tríplice fronteira Brasil, Colômbia e Peru, entre as coordenadas geográficas 4°20' e 4°26' Sul e 69°36' e 70°2' Oeste. Os sistemas de uso da terra (SUTs) estudados foram caracterizados, por Fidalgo et al. (2005), quanto à cobertura vegetal e ao uso atual. Antes da coleta das amostras em cada ponto, retirou-se a serrapilheira do local e todo material a ser utilizado foi flambado para evitar contaminação microbiológica entre os pontos. As amostras de solos foram coletadas em março de 2008 e armazenadas a 4°C até a data de instalação do experimento, julho de 2008. Nessas áreas não ocorre espécies de *Sesbania* (Silva et al., 1989).

Para este estudo, foram selecionadas dez amostras de solos, sendo duas sob pastagem, floresta, roça e agrofloresta e uma sob capoeira e capoeira nova. A análise das características químicas do solo foi realizada conforme Embrapa (1997) e os resultados encontram-se na Tabela 2. Sessenta gramas de cada amostra de solo foram suspensas em 60 mL de solução salina (NaCl 0,85%) e mantidos sob agitação por 30 minutos, a 150 rpm e um mL desta suspensão foi inoculado em cada semente no momento da semeadura.

As suspensões de amostras de solos foram inoculadas também em siratro (*Macropitilium atropurpureum*), o qual foi utilizado como controle positivo por ser considerada uma planta promíscua, ou seja, capaz de capturar alta diversidade de BNL nativas presentes nas amostras de solos. Para a escarificação, as sementes de siratro foram imersas em ácido sulfúrico concentrado por 40 minutos e, depois, seguiram-se os mesmos procedimentos adotados para *Sesbania* spp.

#### **4.4 Delineamento estatístico**

Além da inoculação com as estirpes bacterianas (primeiro experimento) e com as suspensões de solos (segundo experimento), foram adicionados, nos

dois experimentos, dois controles sem inoculação: um sem N mineral e o outro contendo N. Os dois experimentos foram instalados em delineamento estatístico inteiramente casualizado (DIC), com três repetições. O primeiro experimento teve, portanto, 70 tratamentos, enquanto o segundo teve 96 tratamentos. As plantas foram cultivadas por 40 dias, quando foi avaliada a presença ou ausência de nodulação.

TABELA 2 Características químicas dos solos de dez áreas sob diferentes sistemas de uso da terra (SUTs) da Amazônia Ocidental

SUTs	pH	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>	P	K	S	MO
		cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>			mg dm <sup>-3</sup>		dag kg <sup>-1</sup>	
Pastagem, ponto 82	5,2	2,3	1,7	3,4	2,8	39	5,4	1,4
Pastagem, ponto 94	5,2	1,8	0,6	4,7	2,3	31	5,8	1,6
Floresta, ponto 7	4,5	2,7	1,9	5,2	3,7	52	4,9	1,6
Floresta, ponto 57	4,5	5,1	2,9	4,2	4,0	86	8,4	2,2
Agricultura, próximo ponto 82	5,2	2,3	1,7	3,4	2,8	39	5,4	1,4
Agricultura, ponto 49	5,1	5,6	2,3	2,2	7,1	136	6,6	2,1
Agrofloresta, ponto 72	5,5	9,9	2,7	0,3	9,3	63	10,3	1,6
Agrofloresta, ponto 77	5,8	12,7	4,3	0,2	2,5	58	6,2	2,1
Capoeira nova, ponto 19 <sup>a</sup>	5,5	7,7	1,6	0,7	2,8	74	8,9	1,6
Capoeira, ponto 70A	4,7	4,9	2,8	4,2	2,3	52	5,4	1,6

#### 4.5 Isolamento e caracterização morfológica de bactérias que nodulam as sete espécies de *Sesbania* e o siratro

Para o isolamento das BNL presentes nos nódulos, foi realizada a desinfestação superficial, conforme Vincent (1970) e as bactérias foram isoladas

em placas contendo meio de cultura 79 (Fred & Waksman, 1928), também conhecido como YMA (Vincent, 1970), com azul de bromotimol e com pH 6,8. As bactérias foram cultivadas sob temperatura de 28°C. Colônias isoladas foram selecionadas e plaqueadas para purificação. Após a purificação dos isolados, foram analisadas a alteração do pH do meio de cultura e taxa de crescimento avaliado pelo tempo de formação de colônias isoladas.

No primeiro experimento, foi realizado o isolamento para confirmar se as BNL que estabeleceram simbiose com as sete espécies de *Sesbania*, *S. emerus*, *S. exasperata*, *S. rostrata*, *S. tetraptera*, *S. grandiflora*, *S. sesban* e *S. virgata*, apresentavam características morfológicas correspondentes às estirpes inoculadas nas plantas. Para o isolamento, foram selecionados, aleatoriamente, seis nódulos de cada planta.

Em relação ao segundo experimento, o objetivo do isolamento foi analisar a diversidade de BNL presentes nos nódulos das sete espécies de *Sesbania* e do siratro. Todos os nódulos presentes nas plantas foram utilizados para isolamento e todas as bactérias presentes nos nódulos foram selecionadas para estudos da caracterização morfológica.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Teste de nodulação com diferentes espécies de bactérias que nodulam leguminosas (BNL)

Todas as sete espécies de *Sesbania* estudadas foram capazes de formar simbiose com pelo menos uma das estirpes de BNL testadas (Tabela 3), o que também atestou que as condições experimentais eram adequadas para o estabelecimento da simbiose em todos os hospedeiros. Não foram encontrados nódulos nas plantas dos tratamentos controle sem inoculação com ou sem nitrogênio, indicando a ausência de contaminação por bactérias nodulíferas.

*S. rostrata* estabeleceu simbiose com o maior número de estirpes de diferentes gêneros: CIAT 899<sup>T</sup> (*Rhizobium tropici*), ORS 571<sup>T</sup> (*A. caulinodans*), BR 5401<sup>T</sup> (*A. doebereineriae*), BR 3804 (*Mesorhizobium plurifarum*), BR 3405 (*Burkholderia caribensis*) e LMG 19424<sup>T</sup> (*Cupriavidus taiwanensis*). Os dados da literatura mostram que esta leguminosa estabelece simbiose com a espécie *A. caulinodans* (Dreyfus et al., 1988; Boivin et al., 1997) e duas espécies do gênero *Sinorhizobium*, *S. teranga* bv. *sesbaniae* e *S. saheli* (Boivin et al., 1997). No entanto, essas espécies de *Sinorhizobium* foram isoladas de nódulos de *S. rostrata*, estirpes homólogas. No presente estudo, com exceção da estirpe ORS 571<sup>T</sup>, todas as BNL foram isoladas de hospedeiros distintos, indicando que *S. rostrata* estabelece simbiose com BNL isoladas de outros hospedeiros.

Verificou-se, ainda (Tabela 3), que *S. rostrata* foi a única das espécies de *Sesbania* testadas que formou simbiose com as duas estirpes de gêneros de  $\beta$ -proteobacteria, BR 3405 (*Burkholderia caribensis*) e LMG 19424<sup>T</sup> (*Cupriavidus taiwanensis*).

*S. emerus* e *S. sesban* formaram simbiose com três das oito estirpes de BNL testadas, tendo as duas estirpes do gênero *Azorhizobium* (ORS 571<sup>T</sup> e BR 5401<sup>T</sup>) como microssimbiontes em comum. *S. emerus* foi a única espécie capaz

de estabelecer simbiose com a estirpe UFLA 03-84, do gênero *Bradyrhizobium*, que apresenta crescimento lento (7 a 10 dias para aparecimento de colônia isolada). Esse resultado difere de dados encontrados na literatura, em que relacionam a nodulação de espécies de *S. punicea*, *S. exasperata*, *S. sericea*, *S. rostrata*, *S. herbácea* e *S. sesban* com bactérias de crescimento rápido (Frioni et al., 1998; Vinuesa et al., 2005). No entanto, não foram encontradas na literatura características das BNL que nodulam *S. emerus*.

TABELA 3 Nodulação de *Sesbania* spp. inoculadas com diferentes gêneros de bactérias nodulíferas em leguminosas

	Espécies de <i>Sesbania</i>						
	Sem <sup>1</sup>	Sex <sup>2</sup>	Sgr <sup>3</sup>	Sro <sup>4</sup>	Sse <sup>5</sup>	Ste <sup>6</sup>	Svi <sup>7</sup>
Controles sem inoculação:							
Solução completa (com N)	-	-	-	-	-	-	-
Sem N	-	-	-	-	-	-	-
Estirpes:							
CIAT 899 <sup>T</sup> - <i>Rhizobium tropici</i>	-	+	-	+	-	-	-
UFLA 03-84 - <i>Bradyrhizobium</i>	+	-	-	-	-	-	-
ORS 571 <sup>T</sup> - <i>Azorhizobium</i>	+	-	+	+	+	+	-
BR 5401 <sup>T</sup> - <i>A. doebereineriae</i>	+	-	-	+	+	-	+
BR 6806 - <i>Sinorhizobium</i> sp.	-	-	+	-	-	-	-
BR 3804 - <i>Mesorhizobium</i>	-	-	-	+	+	-	-
BR 3405 - <i>Burkholderia</i>	-	-	-	+	-	-	-
LMG 19424 <sup>T</sup> - <i>Cupriavidus</i>	-	-	-	+	-	-	-

Presença (+) e ausência (-) de nódulos, <sup>1</sup>*Sesbania emerus*, <sup>2</sup>*S. exasperata*, <sup>3</sup>*S. grandiflora*, <sup>4</sup>*S. rostrata*, <sup>5</sup>*S. sesban*, <sup>6</sup>*S. tetraptera*, <sup>7</sup>*S. virgata*.

Foram encontrados nódulos em *S. grandiflora* nos tratamentos inoculados com as estirpes ORS 571<sup>T</sup> (*A. caulinodans*) e BR 6806 (*Sinorhizobium* sp.). *S. exasperata*, *S. tetraptera* e *S. virgata* foram as hospedeiras mais restritas, formando simbiose somente com uma estirpe, respectivamente, CIAT 899<sup>T</sup> (*Rhizobium tropici*), ORS 571<sup>T</sup> (*Azorhizobium caulinodans*) e 5401<sup>T</sup> (*A. doebereinae*). Resultados sobre a simbiose entre *S. virgata* e *A. doebereinae* mostram que esta planta somente forma simbiose somente quando inoculada com estirpes homólogas (Gonçalves & Moreira, 2004; Florentino & Moreira, 2009).

Dos sete gêneros de BNL estudados, *Azorhizobium* foi o que apresentou o maior número de hospedeiros dentre *Sesbania* spp. Com exceção de *S. exasperata*, todas as espécies de *Sesbania* formaram simbiose com *A. caulinodans* e/ou *A. doebereinae*. Segundo Lorquin et al. (1997), uma das possíveis causas dos microsimbiontes de espécies de *Sesbania* estabelecerem simbiose preferencialmente com as plantas deste gênero, pode ser a composição química do fator Nod dessas bactérias. Estes autores verificaram que o fator Nod de *S. saheli*, *S. teranga* bv. *sesbaniae* e de *A. caulinodans*, BNL isoladas de *Sesbania* spp., apresentam alta similaridade entre si e distinguem-se de outras espécies de BNL.

Considerando o grande potencial econômico apresentado pelas leguminosas do gênero *Sesbania* e que a simbiose com BNL pode aumentar o sucesso de estabelecimento dessas plantas, os resultados obtidos no presente estudo contribuem para o processo inicial de seleção de estirpes inoculantes para estas espécies.

## **5.2 Nodulação de *Sesbania* spp. com BNL presentes em amostras de solos da Amazônia Ocidental**

Não foi observada nodulação em *Sesbania* spp. quando inoculadas com as dez suspensões de amostras de solos sob diferentes SUTs na Amazônia.

O siratro, que foi utilizado como um controle positivo de nodulação com as BNL destes solos, somente não formou simbiose com as amostras de solos sob o SUT agrofloresta. Dos demais SUTs, foram obtidos 221 isolados, que foram agrupados em sete tipos culturais baseados no tempo de formação de colônias isoladas e na alteração do pH do meio de cultura (Figura 1). Observa-se que o maior número e diversidade de isolados foram obtidos no SUT pastagem, seguido de agricultura, capoeira e floresta. Os resultados encontrados diferem dos encontrados por Lima et al. (2009), pois estes autores verificaram maior número de isolados no SUT agricultura e, em relação à diversidade morfológica, encontraram maior número de isolados com capacidade para acidificar o meio de cultura. Estes autores, porém, durante o processo de isolamento, selecionaram, para purificação e caracterização morfológica, somente uma colônia por placa. No presente estudo, foram selecionadas todas as colônias distintas, oriundas dos nódulos para posterior caracterização.

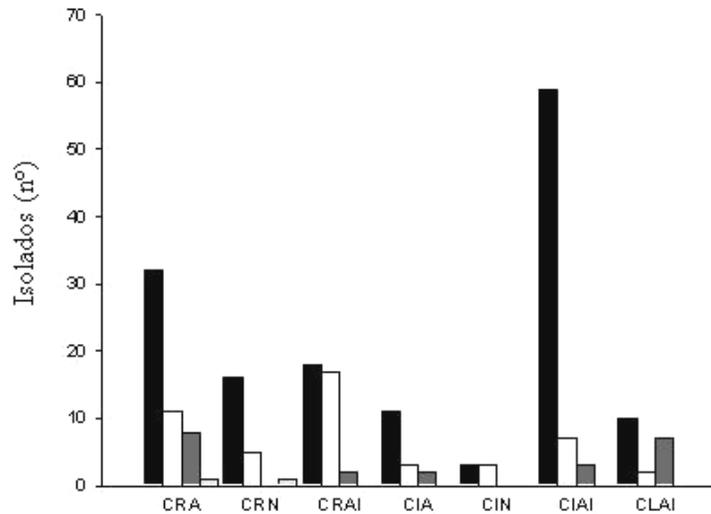


FIGURA 1 Distribuição dos isolados de bactérias que nodulam siratro em sete tipos culturais baseados no tempo para a formação de colônias isoladas e na alteração do pH do meio de cultura para pastagem (■), agricultura (□), capoeira (■) e floresta (□). CRA, crescimento rápido e acidifica o meio; CRN, crescimento rápido e não modifica o pH do meio; CRAI, crescimento rápido e alcaliniza o meio; CIA, crescimento intermediário e acidifica o meio; CIN, crescimento intermediário e não modifica o pH do meio; CIAI, crescimento intermediário e alcaliniza o meio, CLAI, crescimento lento e alcaliniza o meio de cultura.

A ausência de nodulação nas sete espécies de *Sesbania* com BNL dos solos da Amazônia pode ser explicada por Lie et al. (1987). De acordo com estes autores, o centro de diversidade das BNL coincide com o centro de diversidade da leguminosa hospedeira. Das espécies de *Sesbania* estudadas nesse trabalho, somente *S. virgata* é nativa da América do Sul, porém, no Brasil, esta espécie está distribuída principalmente nas regiões sul, sudeste e centro-oeste (Pott & Pott, 1994).

Para a espécie *S. sesban*, os estudos mostram que ela somente estabelece simbiose com BNLs nativas oriundas de locais de ocorrência da própria leguminosa hospedeira (Bala et al., 2002; 2003). Nesses trabalhos, foram isoladas BNLs dos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium* de nódulos de *S. sesban*.

Para *S. virgata*, foi evidenciado que a espécie somente nodula com BNLs nativas de amostras de solos coletadas próximo do sistema radicular desta leguminosa (Florentino & Moreira, 2009). Nesse caso, a maioria das BNLs nativas capazes de estabelecer simbiose com *S. virgata* apresentaram características fenotípicas similares a *A. doebereinae*. No entanto, o gênero *Azorhizobium* foi encontrado em solos da região amazônica (Lima et al., 2009) e esses isolados apresentam características fenotípicas, avaliadas pela técnica de eletroforese em SDS-PAGE, altamente similares aos isolados de *A. doebereinae* capturados de amostras de solos do sul de Minas Gerais (Florentino & Moreira, 2009).

No presente estudo, também foram obtidas BNLs com características morfológicas semelhantes ao gênero *Azorhizobium* (Figura 1), o qual, quando inoculado em cultura pura (Experimento 1), foi capaz de estabelecer simbiose com as sete espécies de *Sesbania* utilizadas. Esse gênero apresenta características fenotípicas em meio 79 que permitem rápida distinção de outros gêneros como crescimento rápido, alcalinização do meio de cultura e produção escassa de EPS (Moreira et al., 2006).

A ausência de nodulação das espécies de *Sesbania* em relação ao siratro sugere que este último seja mais promíscuo, conseguindo estabelecer simbiose com uma ampla faixa de microsimbiontes.

## 6 CONCLUSÕES

Observa-se grande variabilidade de nodulação entre *Sesbania* spp. e diferentes gêneros de bactérias nodulíferas em leguminosas (BNL). Dentre eles, o gênero *Azorhizobium* é o que apresenta maior capacidade de estabelecer simbiose com *Sesbania* spp.

As BNL capturadas pelo siratro nos solos da Amazônia não são capazes de nodular as sete espécies de *Sesbania*.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, O. N.; ALLEN, E. K. **The leguminosae: a source book of characteristics, uses and nodulation.** Wisconsin: University of Madison, 1981.
- BALA, A.; MURPHY, P.; GILLER, K. E. Distribution and diversity of rhizobia nodulating agroforestry legumes in soils from three continents in the tropics. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, n. 4, p.917-930, Apr. 2003.
- BALA, A.; MURPHY, P.; GILLER, K. E. Occurrence and genetic diversity of rhizobia nodulating *Sesbania sesban* in African soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 34, n. 11, p.1759-1768, Nov. 2002.
- BOIVIN, C.; NDOYE, I.; LORTET, G.; NDIAYE, A.; DE LAJUDIE, P.; DREYFUS, B. The *Sesbania* root symbionts *Sinorhizobium saheli* and *S. teranga* bv. *sesbaniae* can form stem nodules on *Sesbania rostrata*, although they are less adapted to stem nodulation than *Azorhizobium caulinodans*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 3, p. 1040-1047, Mar. 1997.
- BRAGGIO, M. M.; LIMA, M. E. L.; VEASEY, E. A.; HARAGUCHI, M. Atividades farmacológicas das folhas da *sesbania virgata* (cav.) pers. **Arquivo do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 69, n. 4, p. 49-53, out./dez. 2002.
- CHEN, W. X.; LAEVENS, S.; LEE, T.; COENYE, T.; VOS, P.; MERGEAY, M.; VANDAMME, P. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov. isolated from nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Spencers Wood, v. 51, n. 5, p. 1729-1735, Sept. 2001.
- DODDOLA, S.; PASUPULATI, H.; KOGANTI, B.; PRASAD, K. V. S. R. G. Evaluation of *Sesbania grandiflora* for antiurolithiatic and antioxidant properties. **Journal of Natural Medicines**, Tokyo, v. 62, n.3, p. 300-307, July, 2008.
- 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**, Washington, v. 38, n. 1, p. 89-98, Jan. 1988.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Manual de métodos de análise de solo**. 2. ed. Rio de Janeiro: Centro Nacional de Pesquisa de Solos, 1997. 212p.

FARIA, S. M. **Obtenção de Estirpes de Rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies florestais**. Seropédica: Embrapa, 1997, p. 1-4. (Recomendação técnica, 1).

FARIA, S. M.; GUEDES, R. E. **Obtenção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies florestais**. Seropédica: Embrapa, 1999. p. 1-4. (Recomendação Técnica, 5).

FERREIRA, P. A. A.; SILVA, M. A. P.; CASSETARI, A.; RUFINI, M.; MOREIRA, F. M. S.; ANDRADE, M. J. B. Inoculação com cepas de rizóbio na cultura do feijoeiro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 7, p. 2210-2212, Out. 2009.

FIDALGO, E. C.; COELHO, M. R.; ARAÚJO, F. O.; MOREIRA, F. M. S.; SANTOS, H. G.; SANTOS, M. L. M; HUISING, J. **Levantamento do uso da terra de seis áreas amostrais relacionadas ao projeto “Conservation and sustainable management of below-ground biodiversity: Phase 1”**, Município de Benjamin Constant (AM). Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2005. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 71).

FLORENTINO, L. A.; GUIMARÃES, A. P.; RUFINI, M.; SILVA, K.; MOREIRA, F. M. S. *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbionts of other species. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 5, p. 667-676, set/oct. 2009.

FLORENTINO, L. A.; MOREIRA, F. M. S. Características simbióticas e fenotípias de *Azorhizobium doebereinae*, microssimbionte de *Sesbania virgata*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 33, n. 2, p. 215-226, abr. 2009.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology**: with special reference to the microorganisms of the soil. New York: McGraw-Hill Book, 1928. 145 p.

FRIONI, L.; MALATÉS, D.; IRIGOYEN, I.; DODERA, R. Promiscuity for nodulation and effectivity in the N<sub>2</sub>-fixing legume tree *Acacia caven* in Uruguay. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 7, n. 3, p. 239-244, May, 1998.

GONÇALVES, M.; MOREIRA, F. M. S. Specificity of the Legume *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. and its Nodule Isolates *Azorhizobium johannae* with other Legume Hostes and Rhizobia. I. **Symbiosis**, Phyladelphia, v. 36, n. 1, p. 57-68, Jan. 2004.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. T. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: California Agriculture Experiment Station, 1950. 32 p. (University of California. Circular, 347).

LACERDA; A. M.; MOREIRA, F. M. S.; ANDRADE, M. J. B.; SOARES, A. L. L. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão-caupi. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 51, n. 293, p. 67-82, jan./fev. 2004.

LIE, T. A.; GOKTAN D.; ENGIN M.; PIJNENBORG J.; ANLARSAL, E. Co-evolution of the legume-*Rhizobium* association. **Plant and Soil**, The Hague, v. 100, p. 171-181, Feb. 1987.

LIMA, A. S.; NÓBREGA, R. S. A.; BARBERI, A.; SILVA, K.; FERREIRA, D. F.; MOREIRA, F. M. S. Nitrogen-fixing bacteria communities occurring in soils under different uses in the Western Amazon Region as indicated by nodulation of siratro (*Macroptilium atropurpureum*). **Plant and Soil**, The Hague, v. 319, n. 1/2, p. 127-145, Jan. 2009.

LORQUIN, J.; LORTET, G.; FERRO, M.; MÉAR, N.; DREYFUS, B.; PROMÉ, J.; BOIVIN, C. Nod Factors from *Sinorhizobium saheli* and *S. teranga* bv. *sesbaniae* Are Both Arabinosylated and Fucosylated, a Structural Feature Specific to *Sesbania rostrata* Symbionts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 10, n. 7, p. 879-890, 1997.

MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F. M.; FRANCO, A. A.; GRAHAM, P.; PARDO, M. A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v. 41, n. 3, p. 417-426, July, 1991.

MATSUDA, F.; KAWASAKI, M.; TERASHIMA, S. Efficient synthesis and antitumor activity of an enantiomeric pair of the sesbanimide AB-ring systems. **Tetrahedron Letters**, Elmsford, v. 26, n. 38, p. 4639-4642, 1985.

MOREIRA, F. M. S. Estirpes de bactérias altamente eficientes que fornecem nitrogênio para o caupi foram selecionadas na UFLA e já são recomendadas para a produção de inoculantes comerciais. **Boletim de Extensão da UFLA**, Lavras, n. 102, 2005. Disponível em: <www.ufla.br/editora/publicações/ boletim de extensão>. Acesso em: 19 abr. 2009.

MOREIRA, F. M. S.; CRUZ, L.; FARIA, S. M.; MARSH, T.; MARTINEZ-ROMERO, E.; PEDROSA, F. O.; YOUNG, P. P. W. *Azorhizobium doebereineriae* sp. nov. Microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 29, n. 3, p. 197-206, Oct. 2006.

MOREIRA, F. M. S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERS, K.; FRANCO, A. A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, n. 1, v. 16, p. 135-146, Feb. 1993.

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do Pantanal**. Corumbá: EMBRAPA, 1994. 320p.

SILVA, M. F.; CARREIRA, L. M. M.; TAVARES, A. S.; RIBEIRO, I. C.; JARDIM, M. A. A. G.; LOBO, M. G. A.; OLIVEIRA, J. Leguminosas da Amazônia brasileira: lista prévia. In: CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 39, 1989, Belém. **Anais...**Cuiabá: UFMT, 1989. p. 193-237.

TURK, D.; KEYSER, H. H. Rhizobia that nodulate tree legumes: specificity of the host for nodulation and effectiveness. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, p. 451-460, Jan. 1992.

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

VINUESA, P.; SILVA, C.; LORITEB, M. J.; IZAGUIRRE-MAYORAL, M. L.; BEDMAR, E. J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from rrs, atpD, recA and nifH sequences, and their use in the classification of *Sesbania* microsymbionts from Venezuelan wetlands. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 28, n. 8, p. 702-716, Oct. 2005.

WILLEMS, A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; MUÑOZ-ADELANTADO, E.;  
GORIS, J.; DE VOS, P.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; TORO, N.; GILLIS, M.  
Description of new *Ensifer* strains from nodules and proposal to transfer *Ensifer*  
*adhaerens* Casida 1982 to *Sinorhizobium* as *Sinorhizobium adhaerens* comb.  
nov. Request for an Opinion. **International Journal of Systematic and**  
**Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 53, n. 4, p. 1207-1217, July 2003.

### **CAPÍTULO 3**

#### **DIVERSIDADE FENOTÍPICA, GENOTÍPICA E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ESTIRPES DE RIZÓBIOS CAPTURADAS PRÓXIMO AO SISTEMA RADICULAR DE *Sesbania virgata* USANDO CAUPI COMO PLANTA ISCA**

## 1 RESUMO

Dez estirpes de rizóbios, sendo oito isoladas de amostras de solos coletadas próximo ao sistema radicular de *Sesbania virgata* no sul de Minas Gerais e duas recomendadas como inoculante para o caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) foram avaliadas quanto à diversidade genética, à eficiência simbiótica em caupi e à tolerância a altas temperaturas, a concentrações salinas, a valores extremos de pH e a 15 tipos de antibióticos. A análise de diversidade genética utilizando a técnica do Rep-PCR, com o primer BOX, revelou alta diversidade, pois cada estirpe apresentou perfil único de DNA. O teste de eficiência simbiótica conduzido em vasos de Leonard indicou que as estirpes UFLA 03-30 e UFLA 03-38 demonstraram alto potencial em fixar N<sub>2</sub> em simbiose com o caupi, proporcionando resultados de matéria seca da parte aérea e dos nódulos, eficiência relativa e acúmulo de nitrogênio na parte aérea superiores aos das estirpes recomendadas como inoculantes. Todas as estirpes cresceram em meios com valores de pH variando de 4,0 a 9,0. Em relação à tolerância aos antibióticos, observou-se que as estirpes eficientes em fixar N<sub>2</sub> em simbiose com o caupi foram as que apresentaram tolerância a um maior número desses compostos. No entanto, essas estirpes apresentaram comportamento semelhante em relação à tolerância à salinidade, constituindo o grupo de maior sensibilidade. Com exceção das estirpes UFLA 03-84 e UFLA 03-37, todas as estirpes toleraram até 40°C. Embora as estirpes estudadas tenham sido isoladas de solos da mesma região, à exceção das recomendadas para inoculante oriundas da Amazônia, constatou-se que elas têm comportamentos distintos quando submetidas aos diferentes testes de diversidade genética, fenotípica e simbiótica, justificando a inclusão desses testes no processo de seleção de estirpes simbióticas em caupi.

## 2 ABSTRACT

Ten rhizobia strains, being eight isolates from soil samples collected closer to the root system of *Sesbania virgata*, in the South of Minas Gerais State and two recommended as inoculants for cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) were evaluated in relation to: genetic diversity; symbiotic efficiency in cowpea; tolerance to high temperatures, saline concentrations, extreme pH values and to 15 antibiotic types. The genetic diversity analysis using the Rep-PCR technique, with primer BOX, revealed high diversity, once each strain presented a single DNA profile. The symbiotic efficiency tested in Leonard jars indicated that strains UFLA 03-30 and UFLA 03-38 have high potential in fixing N<sub>2</sub> in symbiosis with cowpea with shoot and nodules dry matter, relative efficiency and nitrogen contents in the shoot dry matter superior to those obtained the strains recommended as inoculants. All strains were able grow in media with pH values ranging from 4,0 to 9,0. In relation to antibiotic tolerance, it was observed that the efficient strains in fixing N<sub>2</sub> in symbiosis with cowpea were the ones which presented tolerance to a higher number of these compounds. However, these strains presented similar behavior in relation to salinity tolerance, forming the group of higher sensitivity. Except the strains UFLA 03-84 and UFLA 03-37, all the strains tolerated up to 40°C. Although the studied strains have been isolated from soils of the same region, except the ones recommended for inoculant from Amazonia, it was observed that these presented different behavior when submitted to different genotypic, phenotypic and symbiotic tests, justifying the importance to include these tests in the process of symbiotic strain selection for cowpea.

### 3 INTRODUÇÃO

O caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), popularmente conhecido por feijão-de-corda, feijão-macassar e feijão-de-praia, é uma leguminosa de alto valor proteico. O grão dessa cultura é um alimento de excelente valor nutritivo, consumido principalmente por populações de baixa renda. É cultivado, principalmente, nas regiões norte e nordeste do Brasil, predominantemente em caráter de subsistência. Além do Brasil, cultiva-se o caupi também em países da África, Ásia, América Central e em outros da América do Sul.

Essa cultura apresenta boa capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais e tipos de solos. No entanto, o cultivo de caupi no Brasil é feito com baixo nível tecnológico e a produtividade média é baixíssima, de aproximadamente 500 kg ha<sup>-1</sup> (Moreira, 2005; Freire Filho et al., 2005). Uma das limitações que são causas dessa baixa produtividade é o cultivo dessa leguminosa em solos que apresentam baixa fertilidade natural (Melo et al., 2005). No caso do nitrogênio (N), este nutriente pode ser fornecido pelo processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN), realizada pelos rizóbios em simbiose com esta leguminosa. Alguns estudos mostram que a inoculação com rizóbios é uma alternativa viável e promissora para os agricultores de caupi, podendo dispensar a utilização de outras fontes de N e proporcionar altos níveis de produtividade (Lacerda et al., 2004; Soares et al., 2006).

Atualmente, existem três estirpes do gênero *Bradyrhizobium* recomendadas como inoculantes pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) para o caupi: UFLA 03-84 e INPA 03-11B (Lacerda et al., 2004; Moreira, 2005) e BR 3267 (Martins et al., 2003). No entanto, devido à diversidade de condições climáticas e edáficas brasileiras, a seleção de novas estirpes capazes de estabelecer simbiose eficiente com o caupi ainda é objetivo de vários laboratórios de fixação biológica de nitrogênio. Nesses estudos, as

estirpes são testadas quanto à capacidade de estabelecer simbiose eficiente com o caupi e, também, em relação à sua capacidade em tolerar diferentes condições ambientais. Geralmente, os testes de tolerância são realizados “in vitro”, em que as estirpes são submetidas a condições similares às que ocorrem nos solos em que futuramente serão introduzidas como estirpes inoculantes. No caso do caupi, que é predominantemente cultivado nas regiões norte e nordeste, destacam-se as altas temperaturas, as concentrações salinas e os valores extremos de pH como fatores essenciais a serem avaliados nos estudos de seleção de estirpes inoculantes para esta cultura. A tolerância a antibióticos reveste-se de particular importância em todas as condições edáficas, pois é um dos mecanismos de superação das relações antagônicas exercidas por vários outros organismos.

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a diversidade genética e a eficiência simbiótica de estirpes de rizóbios isoladas de amostras de solos coletadas próximas do sistema radicular da leguminosa *Sesbania virgata*, no sul de Minas Gerais, utilizando o caupi como planta-isca. Essas estirpes foram submetidas também a testes de tolerância a altas temperaturas e concentrações salinas, a valores extremos de pH e a diferentes tipos de antibióticos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Origem das estirpes e características culturais

Foram utilizadas oito estirpes de rizóbios isoladas de nódulos da planta-caupi, cultivar BR 17 Gurgueia e oriundas de diferentes amostras de solos, coletadas próximo do sistema radicular de plantas de *Sesbania virgata*, nos municípios de Nepomuceno e Ribeirão Vermelho, sul de Minas Gerais (Florentino, 2007; Florentino et al., 2009). Essas estirpes, quando cultivadas em meio de cultura 79 (Fred & Waksman, 1928), também denominado YMA (Vincent, 1970), contendo azul de bromotimol e pH 6,8, apresentaram características culturais típicas do gênero *Bradyrhizobium*: tempo de crescimento lento (7 a 10 dias), média produção de exopolissacarídeos (EPS) e produção de reação alcalina no meio. No entanto, em relação à cor da colônia e à consistência dos EPS, observou-se que três estirpes apresentaram colônias brancas e EPS de consistência aquosa. As cinco estirpes apresentaram colônias de cor creme e consistência gomosa dos EPS, conforme mostrado na Tabela 1. Na mesma Tabela também são apresentados os locais de coleta das amostras de solo, os valores de pH dessas amostras e a identificação dos nódulos das plantas de caupi em que as estirpes de rizóbios estudadas foram isoladas. As duas estirpes isoladas de solos de Nepomuceno foram obtidas de amostras distintas de solos. Já as seis estirpes isoladas de amostras de solos do município de Ribeirão Vermelho são oriundas de três plantas de caupi, sendo duas estirpes isoladas de nódulos distintos por planta.

Neste estudo, também foram utilizadas duas estirpes isoladas de solos da região amazônica, UFLA 03-84 e INPA 03-11B, aprovadas pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) como inoculantes para a cultura do caupi e pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* (Lacerda et al., 2004; Moreira, 2005; Soares et al., 2006) (Tabela 1).

TABELA 1 Solos de origem, valores de pH, identificação dos nódulos das plantas de caupi em que as estirpes de rizóbios estudadas foram isoladas e características culturais em meio 79

Estirpes	pH dos solos de origem	Hospedeiro de origem e fonte do isolado	Características culturais em meio 79		Referência	
			Cor colônia	Consistência EPS <sup>1</sup>		
<b>Solos de origem: Nepomuceno, MG</b>						
UFLA 03-30	6,8	<i>Vigna unguiculata</i> , planta 1	nódulo 1	Creme	Gomosa	Florentino et al. (2009)
UFLA 03-31	6,0	<i>V. unguiculata</i> , planta 1	nódulo 4	Creme	Gomosa	
<b>Solos de origem: Ribeirão Vermelho, MG</b>						
UFLA 03-38	6,6	<i>V. unguiculata</i> , planta 2	nódulo 1	Branca	Aquosa	Florentino et al. (2009)
UFLA 03-33			nódulo 2	Branca	Aquosa	
UFLA 03-29	5,6	<i>V. unguiculata</i> , planta 1	nódulo 1	Branca	Aquosa	
UFLA 03-37			nódulo 2	Creme	Gomosa	
UFLA 03-28	7,3	<i>V. unguiculata</i> , planta 4	nódulo 3	Creme	Gomosa	
UFLA 03-34			nódulo 4	Creme	Gomosa	
<b>Solos de origem: região Amazônica, AM</b>						
UFLA 03-84	5,3	<i>V. unguiculata</i>		Branca	Aquosa	
		<i>Centrosema pubescens</i>			Aquosa	
INPA 03-11B				Branca		Soares et al. (2006)

<sup>1</sup>Exopolissacarídeos

Essas estirpes foram analisadas quanto a diversidade genética, eficiência simbiótica em caupi e tolerância a altas temperaturas, altas concentrações salinas, valores extremos de pH e diferentes antibióticos.

#### 4.2 Diversidade genética

A diversidade genética das estirpes foi analisada pela técnica do Rep-PCR, utilizando o *primer* BOX (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3') (Versalovic et al., 1994). Para a extração do DNA bacteriano, colônias isoladas das bactérias foram introduzidas em microtubos de 1,5 mL contendo 1 mL de água ultrapura estéril e aquecidas, por 10 minutos, a 95°C.

A reação de amplificação (20 µL) foi realizada com os seguintes volumes (µL): água milli-Q estéril, (9,45), dNTPs, (1,25), tampão Gitschier 5X (5,0), BSA (0,4), DMSO (2,5), *primer* (1,0) e Taq (0,4); DNA (5,0). Os ciclos de amplificação consistiram de: um ciclo de desnaturação inicial a 95°C, por 7 minutos; 35 ciclos de desnaturação (1 minuto a 94°C), anelamento (1 minuto a 53°C) e extensão (8 minutos a 65°C); um ciclo de extensão final a 65°C, por 16 minutos; manutenção a 4°C. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese a 70 V em gel de agarose a 1,5%, de 20 x 20 cm, em tampão TAE 0,5 X por 16 horas, em temperatura ambiente. Utilizou-se como tamanho molecular o marcador 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen™). Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídio e fotografado.

A diversidade genética das estirpes foi analisada pela observação da presença ou da ausência de bandas polimórficas no gel. Para a presença ou a ausência das bandas, atribuíram-se, respectivamente, os valores 1 e 0, para a construção de uma matriz. Os dados da matriz foram agrupados utilizando-se o algoritmo *unweighted pairgroup mean arithmetic method* (UPGMA) e o coeficiente de Jaccard do programa NTSYS-pc versão 2.02.

#### 4.3 Eficiência simbiótica

O experimento de eficiência simbiótica consistiu das 10 estirpes em estudo (Tabela 1) e de dois tratamentos controle sem inoculação, contendo nitrogênio (N) mineral e o outro sem N mineral. As estirpes recomendadas como

inoculante para o caupi, UFLA 03-84 e INPA 03-11B, foram utilizadas para testar se as condições experimentais eram adequadas à nodulação e a expressão da eficiência simbiótica.

A pesquisa foi conduzida em casa de vegetação, com as plantas de caupi cultivadas em vasos de Leonard (Vincent, 1970). Os vasos continham, na parte superior, uma mistura na proporção de 1:1 de areia (250 mL) e vermiculita (250 mL) e, na parte inferior, solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1950) isenta de nitrogênio, exceto para o tratamento sem inoculação e com N mineral que, a força completa, apresenta 210 mg de N, sendo 14 mg na forma de  $\text{NH}_4^+$  e 196 mg na forma de  $\text{NO}_3^-$ . O conjunto foi autoclavado por uma hora, à pressão de 1,5  $\text{kg cm}^{-2}$ , a 127°C, para posterior semeadura. Antes da semeadura, as sementes foram desinfestadas superficialmente utilizando-se etanol a 99,8% (30 segundos) e, em seguida, hipoclorito de sódio a 2% (2 minutos). Após a desinfestação, as sementes foram lavadas em água destilada esterilizada. Finalmente, foram colocadas em placas de Petri contendo algodão e papel de filtro umedecido com água destilada esterilizada e permaneceram por 24 horas até o momento da semeadura.

Foram semeadas quatro sementes por vaso e, em seguida, inoculado 1 mL das estirpes cultivadas em meio 79 contendo  $10^9$  células de rizóbios por semente. Depois, a superfície dos vasos foi coberta com uma fina camada de mistura esterilizada de areia, benzeno e parafina, na proporção de 5:1:0,015 (v:v:v), respectivamente, com a finalidade de evitar possíveis contaminações. Decorridos três a cinco dias da germinação, foi realizado o desbaste, deixando-se duas plântulas por vaso. Durante os 15 dias iniciais de cultivo, foi utilizada a solução de Hoagland a  $\frac{1}{4}$  de força. Posteriormente, as plantas foram cultivadas em solução a  $\frac{1}{2}$  força. A solução nutritiva dos vasos foi repostada periodicamente, de acordo com a taxa de absorção das plantas.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com três repetições e doze tratamentos (dez estirpes e duas sem inoculação). As plantas foram cultivadas por 50 dias, quando, etnã, atingiram o estágio de florescimento. Foram analisadas as seguintes variáveis: matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca dos nódulos (MSN), número de nódulos (NN), eficiência relativa (ER) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA). Além disso, procedeu-se ao isolamento de bactérias de quatro nódulos de cada planta. Esse isolamento teve como objetivo confirmar se os rizóbios presentes nos nódulos apresentavam as mesmas características culturais dos rizóbios inoculados nas sementes no momento do plantio.

Para o isolamento dos rizóbios presente nos nódulos, estes foram desinfestados superficialmente, conforme Vincent (1970) e macerados em placas contendo meio de cultura 79 com azul de bromotimol e pH 6,8. As bactérias foram cultivadas sob temperatura de 28°C. Todos os nódulos, incluindo os utilizados para o isolamento, foram quantificados para a determinação do NN. Em seguida, esses nódulos foram submetidos, assim como a parte aérea do caupi, à estufa de circulação forçada (65°C a 70°C), até atingir massa constante, para a determinação da MSN e MSPA.

A eficiência relativa de cada tratamento foi calculada pela fórmula de Bergensen et al. (1971):  $ER = (MSPA \text{ inoculada} / MSPA \text{ com N}) \times 100$ , em que a ER é a eficiência relativa; MSPA inoculada é a matéria seca da parte aérea da planta com inoculação e MSPA com N é a matéria seca da parte aérea da planta com N mineral. O nitrogênio total foi analisado pelo método semi-microkjeldahl (Sarruge & Haag, 1979), tendo-se determinado a porcentagem de N na matéria seca. O N acumulado na parte aérea foi calculado com a multiplicação da massa da matéria seca da parte aérea (g) pela porcentagem de N.

Os dados de MSPA, MSN, NN, ER e ANPA foram submetidos à análise de variância, com o emprego do programa SISVAR. Nos casos de significância

do teste F, as médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

#### **4.4 Tolerância a antibióticos**

O teste de tolerância a antibióticos foi realizado assepticamente e em triplicata e constituiu-se de 15 antibióticos em discos, contendo concentrações definidas. Estes antibióticos foram obtidos no Centro de Controle e Produtos para Diagnósticos Ltda. (CECON). Alíquotas de 100 µL de cada cultura bacteriana contendo  $10^9$  células foram espalhadas em placas de Petri contendo meio 79 ou YMA. Em seguida, foram inseridos aleatoriamente três discos contendo três tipos de antibióticos por placa. Esses discos foram dispostos separados uns dos outros, para evitar a sobreposição dos halos de inibição, caso ocorresse sensibilidade das estirpes aos compostos testados. Foram utilizados os seguintes discos antibióticos, contendo as seguintes concentrações (µg): amoxicilina – AMO (10), ampicilina – AMP (10), estreptomicina – EST (10), gentamicina – GEN (10), azitromicina – AZI (15), claritromicina – CLA (15), eritromicina – ERI (15), ácido nalidíxico – NAL (30), cloranfenicol – CLO (30), kanamicina – KAN (30), rifamicina – RFM (30), tetraciclina – TET (30), vancomicina – VAN (30) e sulfonamidas – SUL (300). Foi testada também bacitracina – BC (10 U.I.).

As placas foram incubadas por sete dias a 28°C. Após este período, foi observada a presença ou ausência de halo de inibição, indicando, respectivamente, sensibilidade e tolerância dos rizóbios aos antibióticos testados.

Os resultados dos testes de antibióticos foram convertidos em matriz binária, gerando dendrograma pelo algoritmo UPGMA, utilizando o coeficiente *simple matching* (SM).

#### **4.5 Tolerância à salinidade**

As estirpes foram avaliadas quanto à tolerância à salinidade em meio 79 (ou YMA). Antes das estirpes serem submetidas às placas contendo meio 79 e diferentes concentrações de NaCl, procedeu-se à lavagem das células com solução salina (0,85%), objetivando a remoção de resíduos do meio de cultura do inóculo que poderiam resultar num falso crescimento positivo (Trannin et al., 2001; Matsuda et al., 2002; Nóbrega et al., 2004). Alíquotas de 1,0 mL de cada cultura bacteriana contendo  $10^9$  células foram transferidas para microtubos esterilizados, com capacidade de 1,5 mL, para centrifugação a 10.000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1,0 mL de solução salina (0,85%) estéril e recentrifugadas. O processo de descarte do sobrenadante, ressuspensão das células e centrifugação foi repetido por três vezes.

Em seguida, alíquotas de 0,1 mL dessas suspensões de bactérias foram inoculadas e espalhadas, com alça de Drigalsky, em placas contendo meio de cultura 79, modificado por adição de soluções NaCl, com oito concentrações finais: 0; 86; 171; 256; 342; 427; 513 e 684 mM. Os tratamentos foram distribuídos ao acaso, com três repetições. Para avaliar a tolerância das bactérias ao NaCl, foi observada a presença (+) ou ausência (-) de crescimento no meio de cultura, após sete dias de incubação a 28°C, plotando-se os resultados em histograma.

#### **4.6 Tolerância a extremos de pH**

O teste de tolerância a valores extremos de pH foi realizado em placas contendo meio 79 com os seguintes valores de pH: 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0. Como tratamento-controle, foi utilizado o meio de cultura 79 com pH 6,8, que é empregado rotineiramente nos laboratórios de microbiologia para isolamento e cultivo de rizóbios. Para lavagem das células, inoculação, tempo de incubação e

avaliação do crescimento das bactérias nos meios contendo os diferentes valores de pH, seguiu-se o mesmo procedimento adotado no teste de tolerância a salinidade.

#### **4.7 Tolerância a altas temperaturas**

Para o teste de tolerância às altas temperaturas, os procedimentos de lavagem das células, inoculação, tempo de incubação e avaliação do crescimento das bactérias foram realizados como descrito anteriormente para os testes de tolerância a salinidade e extremos de pH. O teste foi realizado em placas contendo meio 79. Após a inoculação das estirpes, as placas foram incubadas às temperaturas de 36°, 40° e 45°C. Como tratamento-controle, foi utilizado o meio de cultura 79, incubado à temperatura de 28°C.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Diversidade genética

O dendrograma formado a partir da análise dos padrões de bandas de DNA, amplificados com a técnica do Rep-PCR utilizando o *primer* BOX-PCR, revelou que as 10 estirpes de rizóbios estudadas apresentaram perfis únicos de DNA (Figura 1). O grau máximo de similaridade, 66%, foi observado entre as estirpes UFLA 03-33 e UFLA 03-38. Esse alto grau de diversidade genética entre as estirpes comprova a eficiência da utilização deste *primer* para discriminar as estirpes bacterianas (Versalovic et al., 1994). Outros autores, utilizando também essa técnica do Rep-PCR com os *primers* REP e ERI para estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, encontraram resultados semelhantes (Laguerre et al., 1996; Laguerre et al., 1997; Chueire et al., 2000). A alta diversidade observada entre as estirpes de rizóbios estudadas corrobora a ideia de que o caupi tem comportamento promíscuo, ou seja, é capaz de nodular com estirpes de rizóbios de espécies de vários gêneros (Moreira, 2008).

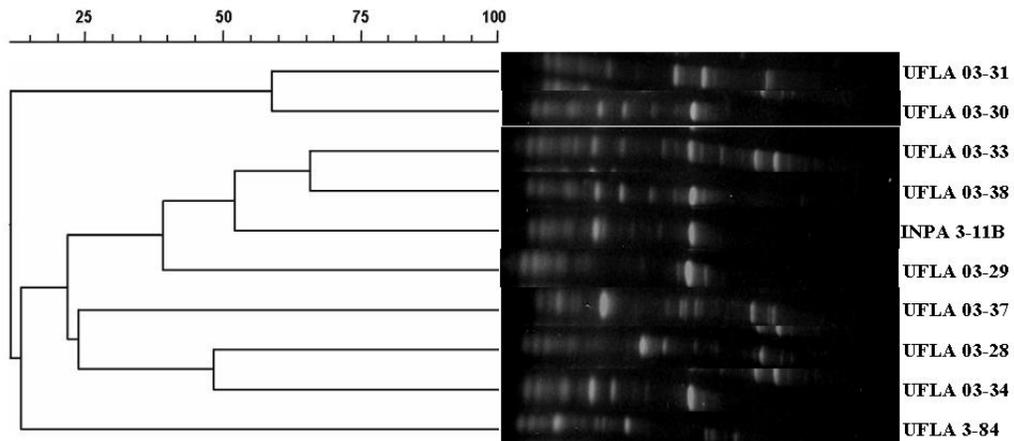


FIGURA 1 Dendrograma de diversidade genética das estirpes isoladas de caupi e de estirpes do gênero *Bradyrhizobium* aprovadas pelo MAPA para a cultura do caupi, UFLA 03-84 e INPA 03-11B, após a análise de agrupamento dos fragmentos obtidos pela amplificação do DNA por PCR com o *primer* específico BOX (Versalovic et al., 1994). Análise realizada com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jacard.

## 5.2 Eficiência simbiótica

Observa-se, por meio das variáveis MSPA, NN, MSN, ER e ANPA, alta variabilidade entre as estirpes testadas e os controle positivo e o negativo (Tabela 2). As estirpes recomendadas como inoculantes para caupi, UFLA 03-84 e INPA 03-11B, proporcionaram valores de MSPA superiores ao do tratamento em que foi adicionado N mineral. A alta eficiência simbiótica dessas duas estirpes em caupi é comprovada tanto em experimentos conduzidos em condições controladas de cultivo como em vasos de Leonard (Lima et al., 2005), e em experimentos de campo (Lacerda et al., 2004; Soares et al., 2006).

Dentre as oito estirpes testadas, oriundas de amostras de solos coletadas próximas ao sistema radicular de *S. virgata*, destacam-se a UFLA 03-38 e a UFLA 03-30, apresentando resultados superiores em relação a todas as variáveis

analisadas. Estas duas estirpes foram superiores também às estirpes inoculantes, UFLA 03-84 e INPA 03-11B, em relação a todos os parâmetros, exceto em NN. Neste quesito, a UFLA 03-38 foi menor que a UFLA 03-84. As estirpes UFLA 03-38 e UFLA 03-30 também proporcionaram resultados de MSPA, ER e ANPA superiores ao tratamento N mineral.

Esses resultados demonstram que as estirpes UFLA 03-38 e UFLA 03-30 apresentam alto potencial de fixar  $N_2$  em simbiose com o caupi. Portanto, elas já estão selecionadas para etapas posteriores que visem avaliar sua adaptação a outros estresses edáficos e competitividade com as estirpes nativas do solo, uma vez que, neste estudo, a eficiência simbiótica foi avaliada em condições axênicas, em solução nutritiva.

TABELA 2 Peso da matéria seca da parte aérea (MSPA) de caupi inoculado com estirpes de rizóbio de diferentes procedências <sup>(1)</sup>.

Tratamentos	MSPA (mg planta <sup>-1</sup> )	NN	MSN (mg planta <sup>-1</sup> )	ER (%)	ANPA (mg planta <sup>-1</sup> )
Tratamentos sem inoculação					
Sem N-mineral	90 h	0 d	0 f	2,66 h	1,87 f
Com N-mineral <sup>2</sup>	3710 d	0 d	0 f	100,00 d	133,24 c
Tratamentos inoculados					
UFLA 03-84	4240 c	491 a	370 b	114, 24 c	171, 92 b
INPA 03-11B	4610 b	298 b	390 b	124,24 b	187,83 b
UFLA 03-38	5480 a	269 b	440 a	147,47 a	261,87 a
UFLA 03-33	3920 d	169 c	110 e	105,63 d	168,59 b
UFLA 03-29	2250 f	263 b	210 d	60,70 f	104,43 c
UFLA 03-37	200 h	53 e	47 f	5,16 h	3,29 f
UFLA 03-28	2500 f	246 b	200 d	67,29 f	102,89 d
UFLA 03-34	3120 e	227 b	350 b	84,00 e	127,06 c
UFLA 03-30	5700 a	452 a	480 a	153,50 a	254,35 a
UFLA 03-31	1770 g	139 c	120 e	47,77 g	79,52 e
CV (%)	8,23	18,87	12,64	8,23	11,9

<sup>(1)</sup>Valores seguidos da mesma letra, na coluna, teste de Scott-Knot, a 5% de probabilidade; os dados de MSN e NN foram transformados para raiz quadrada ( $x + 1$ ); <sup>2</sup>Solução de Hoagland & Arnon (1950) contendo 210 mg de N, sendo 14 mg na forma de  $\text{NH}_4^+$  e 196 na forma de  $\text{NO}_3^-$ . Esta solução foi utilizada a  $\frac{1}{4}$  de força durante os 15 primeiros dias de cultivo e, posteriormente, a  $\frac{1}{2}$  força.

### 5.3 Tolerância a antibióticos

Em relação à tolerância aos 15 tipos de antibióticos, as estirpes de rizóbio foram agrupadas em quatro grupos (Figura 2) e todos foram tolerantes aos antibióticos VAN, BC e SUL. O grupo I foi constituído pelo maior número de estirpes: UFLA 03-28, UFLA 03-29, UFLA 03-31, as duas estirpes inoculantes INPA 03-11B e UFLA 03-84 e a estirpe UFLA 03-30, que apresentou alta eficiência em fixar  $\text{N}_2$  em simbiose com o caupi. Este grupo também foi o único que apresentou tolerância a todos os antibióticos. O grupo II incluiu as estirpes UFLA 03-33 e UFLA 03-34 e apresentou 93% de

similaridade com o grupo I, não sendo tolerante somente ao antibiótico RFM. No caso das estirpes inoculantes, isso explica, pelo menos em parte, seu sucesso nas condições de campo (Lacerda et al., 2004; Soares et al., 2006), pois este pode ser um mecanismo de superar as relações antagônicas exercidas por outros organismos.

Os grupos III e IV foram constituídos somente por uma estirpe, UFLA 03-37 e UFLA 03-38, respectivamente. O grupo III apresentou tolerância a dez tipos de antibióticos: EST, NAL, VAN, GEN, BC, AZI, ERI, CLO, CLA e SUL. O grupo IV foi o que apresentou tolerância a um menor número de antibióticos, sete: VAN, AMO, BC, ERI, AMP, CLO e SUL. A estirpe representante deste grupo, UFLA 03-38, estabeleceu simbiose efetiva com a caupi. Em condições de campo, esta baixa tolerância aos antibióticos pode afetar a competitividade com as estirpes nativas, uma vez que estudos mostram o estabelecimento de populações de actinomicetos produtores de antibióticos em diversos tipos de solos do Brasil (Pereira et al., 1999).

Em relação à tolerância de rizóbios a diferentes antibióticos, alguns estudos mostram correlação entre taxa de crescimento e tolerância dos rizóbios a esses compostos. Estirpes de crescimento rápido foram mais tolerantes aos antibióticos EST, KAN e AMP em relação às estirpes de crescimento lento (Odee et al., 1997). Resultados contraditórios foram observados por Dowdle & Bohlool (1985), segundo os quais as estirpes de crescimento lento são mais tolerantes a diferentes tipos de antibióticos em relação às estirpes de crescimento rápido. No entanto, alguns trabalhos demonstram que não há relação entre taxa de crescimento de estirpes de rizóbio e resistência aos antibióticos (Xavier et al., 1998; Maâtallah et al., 2002).

Alguns desses antibióticos, como EST, KAN, NAL, CLO, RFM, TET e VAN, foram testados em outro trabalho, em que todas as estirpes de crescimento lento apresentaram tolerância a estes compostos (Dowdle & Bohlool, 1985).

Porém, no presente estudo, foram utilizados esses mesmos antibióticos, em concentrações superiores, e outros não testados por estes autores. Mesmo assim, a maioria das estirpes que apresentaram crescimento lento foi tolerante a um grande número desses compostos.

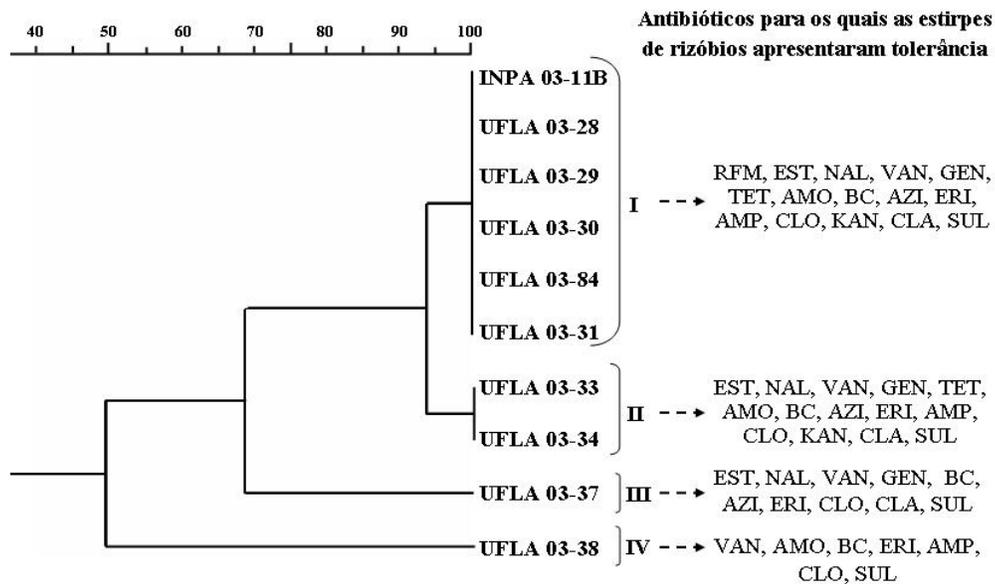


FIGURA 2 Dendrograma representando a tolerância das dez estirpes rizóbios aos quinze tipos de antibióticos. Análise realizada com o algoritmo UPGMA e o coeficiente Simple Matching (SM).

#### 5.4 Tolerância à salinidade

Nos testes de tolerância dos rizóbios a diferentes concentrações de NaCl em meio 79, notou-se que todas as estirpes cresceram no meio contendo 86 mM de NaCl. Com o aumento na concentração de sal, houve redução no número de estirpes capazes de crescer nestas concentrações e não foi verificado crescimento na concentração de 684 mM de NaCl (Figura 3). Na concentração de 171 mM de

NaCl, apenas cinco das dez estirpes cresceram. Nesta concentração, a estirpe UFLA 03-33, as duas que apresentaram maior eficiência simbiótica com o caupi, UFLA 03-38 e UFLA 03-30, e as duas estirpes inoculantes para caupi, UFLA03-84 e INPA03-11B, foram sensíveis, não apresentando crescimento no meio. Dentre as estirpes que cresceram no meio contendo concentração de 171 mM de NaCl, UFLA 03-29, UFLA 03-37, UFLA 03-28, UFLA 03-31 e UFLA 03-34, esta última não cresceu nas concentrações de 256, 342, 427 e 513 mM de NaCl, respectivamente. Destas, a estirpe UFLA 03-29 foi a que apresentou maior tolerância, crescendo em meio contendo 513 mM de NaCl.

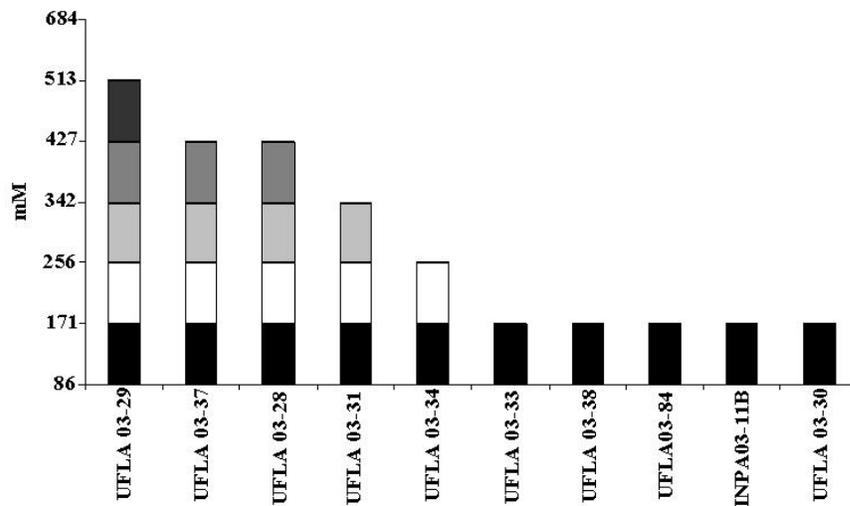


FIGURA 3 Crescimento das estirpes de rizóbios expostas a diferentes concentrações de NaCl (mM) em meio 79.

Analisando-se os parâmetros de eficiência simbiótica das estirpes de rizóbio em caupi e os resultados de tolerância à salinidade, observa-se que não houve correlação entre esses dois testes. As estirpes que apresentaram maior

eficiência simbiótica, UFLA 03-38, UFLA 03-30 e as recomendadas como inoculante para o caupi, UFLA 03-84 e INPA 03-11B, estão entre o grupo de estirpes de maior sensibilidade ao NaCl, não apresentando crescimento em concentrações maiores que 86 mM em meio 79. No entanto, em um outro estudo, a estirpe UFLA 03-84 tolerou até 30 g.L<sup>-1</sup> de NaCl (513 mM) (Nóbrega et al., 2004).

Alguns estudos têm demonstrado que estirpes de rizóbios que apresentam maior produção de exopolissacarídeos (EPS) são mais tolerantes à salinidade (Eaglesham et al., 1987; Xavier et al., 1998; Freitas et al., 2007; Xavier et al., 2007). No presente estudo, todas as estirpes apresentam média produção de EPS, no entanto, foi verificada grande variabilidade em relação à tolerância destas estirpes a diferentes concentrações salinas. Há estirpes que toleraram concentrações salinas iguais ou até superiores àquelas consideradas tolerantes em outros trabalhos e oriundas de solos salinos da região nordestina (Freitas et al., 2007; Xavier et al., 2007). Esses resultados sugerem que as estirpes ora testadas podem apresentar outros mecanismos que proporcionam tolerância à salinidade. Alguns autores citam as alterações na composição da membrana celular e produção de trehalose como mecanismos envolvidos no processo de adaptação e sobrevivência dos rizóbios em condições de estresse salino (Streeter, 2003; Medeot et al., 2007).

### **5.5 Tolerância a valores extremos de pH**

Todas as estirpes de rizóbios estudadas foram capazes de crescer em meio contendo todos os valores de pH. De um modo geral, as oito estirpes de rizóbios oriundas de solos do sul de Minas Gerais foram isoladas de amostras de solos que apresentaram valores de pH relativamente elevados (Tabela 1), quando comparados com os valores de pH dos solos das regiões tropicais. No entanto,

isso não limitou o crescimento em condições ácidas. A tolerância de rizóbios à variação de pH em meio de cultura tem sido bem estudada e, geralmente, observa-se que não existe correlação entre pH do solo em que o rizóbio foi isolado e a tolerância deste aos diferentes valores de pH em meio de cultura (Ruiz-Díez et al., 2009). No entanto, foi demonstrado que, embora estirpes de *Bradyrhizobium*, incluindo a estirpe INPA 03-11B, apresentem crescimento em diferentes valores de pH, a faixa adequada que proporciona maior desenvolvimento destas estirpes é a de pH igual a 6,0 (Miguel & Moreira, 2001).

As estirpes inoculantes, UFLA 03-84 e INPA 03-11B, também apresentaram crescimento em todos os valores de pH estudados. A tolerância de todas as estirpes aos valores extremos de pH estudados demonstra a existência de uma característica desejável em estirpes para uso em inoculantes comerciais.

## **5.6 Tolerância a altas temperaturas**

Todas as estirpes estudadas apresentaram crescimento nas temperaturas de 28° e 36°C. Já a 45°C, não houve crescimento de nenhuma estirpe. De modo geral, temperaturas acima de 40°C inibem o crescimento de estirpes de rizóbios (Osa-Afiana & Alexander, 1982; Maâtallah et al., 2002). No presente estudo, a 40°C, somente as estirpes UFLA 03-84 e UFLA 03-37 não foram tolerantes. Em solos tropicais, normalmente, a temperatura do solo, na camada superficial de 0 a 20 cm, pode alcançar valores acima de 40°C (Hafeez et al., 1991). Dessa forma, os resultados ora obtidos sugerem que a inoculação com a estirpe UFLA 03-84 em sementes de caupi deve ser indicada para solos com temperaturas abaixo de 40°C. Já a outra estirpe inoculante, INPA 03-11B, juntamente com as estirpes isoladas de solos do sul de Minas Gerais e que apresentaram alta eficiência simbiótica, UFLA 03-30 e UFLA 03-38, apresentaram crescimento à temperatura de 40°C.

### **5.7 Variabilidade genotípica, simbiótica e tolerância a estresses de acordo com a origem das estirpes**

Todas as estirpes, independentemente do solo e/ou nódulo de origem na planta, apresentaram comportamento variável diante dos testes fenotípicos, de diversidade genética e eficiência simbiótica. De modo geral, não foi possível estabelecer nenhum tipo de relação entre esses testes e a origem dos isolados.

Pelos dados da Tabela 3 observa-se que a maior similaridade genética foi observada entre as estirpes UFLA 03-33 e UFLA 03-38, que foram isoladas de nódulos distintos em uma mesma planta e oriundas de amostras de solos coletadas no município de Ribeirão Vermelho. Estas estirpes constituíram os mesmos grupos de eficiência relativa, tolerância à salinidade e altas temperaturas.

No teste de eficiência em fixar  $N_2$  em simbiose com o caupi, foram encontradas estirpes em solos das três localidades estudadas que proporcionaram desenvolvimento da parte aérea das plantas superior ao do tratamento em solução nutritiva contendo N mineral (ao qual foi atribuído eficiência relativa igual a 100%). Observa-se que as estirpes obtidas de nódulos distintos em uma mesma planta apresentaram eficiência simbiótica altamente variável. Estes resultados sugerem que os estudos de seleção de estirpes eficientes em fixar  $N_2$  a partir de isolados capturados pela planta-isca caupi devem abranger o maior número possível de isolados, uma vez que existe grande variabilidade na capacidade de fixação de  $N_2$  entre eles, mesmo para os isolados oriundos da mesma planta e mesmo local.

Das características fenotípicas avaliadas, a capacidade de crescer em meios contendo valores extremos de pH, seguida da tolerância a altas temperaturas, foi aquela para a qual as estirpes apresentaram comportamentos mais homogêneos, apesar de elas terem sido isoladas de solos com ampla faixa de valores de pH (5,3 – 7,3) e de diferentes regiões climáticas.

Para o teste de tolerância a antibióticos, foi observada grande variabilidade entre as estirpes oriundas dos diferentes solos e estirpes isoladas das mesmas plantas. Resultados similares foram obtidos para tolerância a antibióticos por estirpes de rizóbios oriundas da região nordeste do Brasil (Xavier et al., 1998). No entanto, nesse estudo, os autores encontraram relação entre pH do solo de origem dos isolados e tolerância aos antibióticos. No presente estudo, não foi possível estabelecer esse tipo de relação, uma vez que as estirpes isoladas de solos da Amazônia, com baixos valores de pH e outras do sul de MG com valores de pH significativamente mais elevados, foram tolerantes a todos os tipos de antibióticos testados.

Também em relação à tolerância a altas concentrações salinas, as estirpes apresentaram comportamentos variáveis, tendo as mais tolerantes às altas concentrações salinas sido isoladas de solos de Ribeirão Vermelho.

TABELA 3 Relação entre a origem e as principais características genótípicas, simbióticas e fenotípicas das estirpes

Características	Origem das estirpes									
	Ribeirão Vermelho				Nepomuceno			Amazônia		
	UFLA						INPA			
	03-38	03-33	03-29	03-37	03-28	03-34	03-30	03-31	03-84	03-11B
Similaridade genética (%)										
10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
40	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
50	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+
65	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Eficiência relativa (%) em fixar N <sub>2</sub> em simbiose com o caupi*										

...Continua...

TABELA 3, Cont.

	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
51 a 75	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-
76 a 100	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
101-150	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
Maior que 151	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Número de antibióticos para os quais as estirpes apresentaram tolerância										
15	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+
14	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
10	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tolerância à salinidade (mM/NaCl)										
Menor que 171	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+
172 a 256	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
257 a 342	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
343 a 427	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
428 a 513	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Tolerância a altas temperaturas (°C)										
28 e 36	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
Tolerância a valores extremos de pH										
4,0 – 9,0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

\*Valores comparados ao tratamento em que as plantas foram cultivadas em solução nutritiva contendo N mineral, <sup>2</sup>Solução de Hoagland & Arnon (1950) contendo 210 mg de N, sendo 14 mg na forma de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e 196 na forma de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Esta solução foi utilizada a ¼ de força, durante os 15 primeiros dias de cultivo e, posteriormente, a ½ força.

## **6 CONCLUSÕES**

Existe grande variabilidade genética, simbiótica e fenotípica entre estirpes isoladas do mesmo local e da mesma região.

Não há relação entre diversidade genética, simbiótica e fenotípica e o solo de origem.

Dentre as estirpes, UFLA 03-30 e UFLA 03-38 são indicadas para novas etapas no processo de seleção de estirpes inoculantes.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BERGENSEN, F. J.; BROCKWELL, J.; GIBSON, A. H.; SCHWINGHAMER, E. A. Studies of natural populations and mutants of *Rhizobium* in the improvement of legume inoculants. **Plant and Soil**, The Hague, v. 35, n. 1, p. 3-16, Dec. 1971.

CHUEIRE, L. M. O.; NISHI, C. Y. M.; LOUREIRO, M. F.; HUNGRIA, M. Identificação das estirpes de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* utilizadas em inoculantes comerciais para as culturas da soja e do feijoeiro pela técnica de PCR com “primers” aleatórios ou específicos. **Agricultura Tropical**, Cuiabá, v. 4, n. 1, p. 80-95, Jan. 2000.

DOWDLE, S. F.; BOHLOOL, B. B. Predominance of Fast-Growing *Rhizobium japonicum* in a Soybean Field in the People's Republic of China. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 50, n. 5, p. 1171-1176, Nov. 1985.

EAGLESHAM, A. R. J.; STOWERS, M. D.; MAINA, M. L.; GOLDMAN, B. J.; SINCLAIR, M. J.; AYANABA, A. Physiological and biochemical aspects of Diversity of *Bradyrhizobium* sp. (Vigna) from three West African Soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 19, n. 5, p. 575-581, 1987.

FLORENTINO, L. A. **Relações simbióticas e edáficas de *Azorhizobium doebereineriae* e de outras espécies nodulíferas em solos coletados próximos ao sistema radicular de *Sesbania virgata* (cav.) pers.** 2007. 62p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

FLORENTINO, L. A.; GUIMARÃES, A. P.; RUFINI, M.; SILVA, K.; MOREIRA, F. M. S. *Sesbania virgata* stimulates the occurrence of its microsymbiont in soils but does not inhibit microsymbionts of other species. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n. 5, p. 667-676, sep/out. 2009.

FRED E, B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology:** with special reference to the microorganisms of the soil. New York: McGraw-Hill, 1928. 145 p.

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

FREIRE-FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; BARRETO, P. D.; SANTOS, A. P. Melhoramento genético. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO V. Q. (Ed). **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p. 29-75.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. T. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: California Agriculture Experiment Station, 1950. 32 p. (University of California. Circular, 347).

LACERDA, A. M.; MOREIRA, F. M. S.; ANDRADE, M. J. B.; SOARES, A. L. L. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão-caupi. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 51, n. 293, p. 67-82, jan. 2004.

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

LAGUERRE, G.; BERKUM, P. VAN; AMARGER, N.; PREVOST, D. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 12, p. 4748-4758, Dec. 1997.

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

MAÂTALLAH, J.; BERRAHO, E.B.; MUÑOZ, S.; SANJUAN, J.; LLUCH, C. Phenotypic and molecular characterization of chickpea rhizobia isolated from different areas of Morocco. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 93, n. 3, p. 531-540, Mar. 2002.

MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; RANGEL, F. W.; RIBEIRO, J. R. A.; NEVES, M. C. P.; MORGADO, L. B.; RUMJANEK, N. G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the Semi-Arid Region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 38, n. 6, p. 333-339, Oct. 2003.

MATSUDA, A.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Tolerância de rizóbios de diferentes procedências ao zinco, cobre e cádmio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n. 3, p. 343-355, mar. 2002.

MEDEOT, D. B.; BUENO, M. A.; DARDANELLI, M. S.; LEMA, M. G. Adaptational Changes in Lipids of *Bradyrhizobium* SEMIA 6144 Nodulating Peanut as a Response to Growth Temperature and Salinity. **Current Microbiology**, New York, v. 54, n. 1, p. 31-35, Jan. 2007.

MELO, F. B.; CARDOSO, M. J.; SALVIANO, A. A. C. Fertilidade do solo e adubação. In: FREIRE FILHO, F.R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO V. Q. (Eds). **Feijão-Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa, 2005. 519 p.

MOREIRA, F. M. S. Bactérias fixadoras de nitrogênio. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; BRUSSARD, L. (Ed.). **Biodiversidade do solo em ecossistemas brasileiros**. Lavras: UFLA, 2008. p. 631-680.

MOREIRA, F. M. S. Estirpes de bactérias altamente eficientes que fornecem nitrogênio para o caupi foram selecionadas na UFLA e já são recomendadas para a produção de inoculantes comerciais. **Boletim de Extensão da UFLA**, Lavras, n. 102, 2005. Disponível em: <[www.ufla.br/editora/publicações/boletim de extensão](http://www.ufla.br/editora/publicações/boletim_de_extensao)>. Acesso em: 19 abr. 2009.

NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; LIMA, A. S. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, n. 28, n. 2, p. 269-279, 2004.

ODEE, D. W.; SUTHERLAND, J. M.; MAKATIANI, E. T.; MCINROY, S. G.; SPRENT, J. I. Phenotypic characteristics and composition of rhizobia associated with woody legumes growing in diverse Kenyan conditions. **Plant and Soil**, The Hague, v. 188, n. 1, p. 65-75, Jan. 1997.

OSA-AFIANA, L. O.; ALEXANDER, M. Differences among cowpea rhizobia in tolerance to high temperature and desiccation in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 43, n. 2, p. 435-439, Feb. 1982.

PEREIRA, J. C.; NEVES, M. C. P. ; DROZDOWICZ, A. Influência da antibiose exercida por actinomicetos às estirpes de *Bradyrhizobium* spp., na nodulação da soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 1, p. 99-108, jan. 1999.

RUIZ-DÍEZ, B.; FAJARDO, S.; PUERTAS-MEJÍA, M. A.; FELIPE, M. D. R.; FERNÁNDEZ-PASCUAL, M. Stress tolerance, genetic analysis and symbiotic properties of root-nodulating bacteria isolated from Mediterranean leguminous shrubs in Central Spain. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 191, n. 1, p. 35-46, Jan. 2009.

SARRUGE, J. R.; HAAG, H. P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba : ESALQ, 1979. 27p.

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

STREETER, J. G. Effect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, n. 3, p. 484-491, Aug. 2003.

TRANNIN, I. C. B.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; LIMA, A. Tolerância de estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* a zinco, cádmio e cobre *in vitro*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 25, n. 25, p. 305-316, 2001.

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

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

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea, rhizobia population. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 27, n. 4, p. 386-392. Sept. 1998.

XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M.; RUMJANEK, N. G.; NEVES, M. C. P.  
Tolerância de rizóbio de feijão-caupi à salinidade e à temperatura em condição  
in vitro. **Caatinga**, Mossoró, v. 20, n. 4, p. 1-9, out./dez. 2007.

## **CAPÍTULO 4**

### **DIVERSIDADE GENÉTICA E TOLERÂNCIA A ESTRESSES DE ESTIRPES ISOLADAS DE *Sesbania virgata* (CAV.) PERS**

## 1 RESUMO

Estudos fenotípicos baseados em dados morfológicos e em análise dos perfis de proteínas totais têm mostrado que os isolados de nódulos da leguminosa *Sesbania virgata* apresentam alta similaridade fenotípica entre si. Além disso, a simbiose entre esses organismos é sempre altamente eficiente. Na procura de testes mais discriminatórios dessas estirpes, este trabalho foi realizado com o objetivo de estudar a diversidade genética, utilizando a técnica do Rep-PCR com o *primer* BOX, de 72 isolados de nódulos de *S. virgata*. Foram utilizados também testes fenotípicos, como tolerância a altas temperaturas e concentrações salinas, valores extremos de pH e diferentes tipos de antibióticos. Estirpes representantes dos principais gêneros de bactérias nodulíferas foram incluídas nestes testes. Observou-se que a maioria dos isolados de nódulos de *S. virgata* cresceu até a concentração de  $15\text{g L}^{-1}$  (255 mM) de NaCl. A temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$  inibiu o crescimento de seis desses isolados e, em relação aos antibióticos, todos os isolados foram sensíveis aos antibióticos rifamicina, ácido nalidíxico, gentamicina e sulfonamidas e resistentes a vancomicina, amoxicilina e ampicilina. Em relação aos outros antibióticos, os isolados apresentaram comportamento variável. Dessa forma, verifica-se que o método utilizado para avaliar a diversidade genética, juntamente com os testes fenotípicos, proporcionam a distinção entre os isolados de nódulos de *S. virgata*.

## 2 ABSTRACT

Phenotypic studies based in cultural data and analyses of total protein profiles have demonstrated that strain isolated from nodules of leguminous *Sesbania virgata* had high phenotypic similarity among themselves. Besides that, symbiosis among these organisms is always highly efficient. Based in these characteristics, this work aimed to study the genetic diversity of 72 *S. virgata* isolate nodules (by using repetitive-sequence of DNA technique with primer BOX). Phenotypic tests for tolerance to temperature and saline concentrations, extreme pH values and different antibiotic were also carried out. Strains representing the main noduliferous bacteria genera were included in the tests. It was observed that most *S. virgata* isolates grew until NaCl concentration of 15g L<sup>-1</sup> (255 mM). The temperature of 40°C inhibited the growth of six isolates. In relation to antibiotics, all of the isolates were sensitive to the antibiotics rifamicine, nalidixic acid, gentamicin, kanamycin and sulfonamide however they were resistant to vancomycin, amoxicillin and ampicillin. In relation to other antibiotics the isolates have shown a variable behavior. Therefore, it is verified the method used to evaluate genetic diversity, together with phenotypic tests, allow a discrimination of *S. virgata* isolates.

### 3 INTRODUÇÃO

A leguminosa *Sesbania virgata* é nativa da América do Sul e, no Brasil, é encontrada principalmente nas regiões centro-oeste, sul e sudeste. Esta espécie se desenvolve bem em solos inundados e de baixa fertilidade e pode obter a quantidade de nitrogênio (N) necessário ao seu desenvolvimento por meio do estabelecimento de simbiose com as bactérias fixadoras de N<sub>2</sub>, nodulíferas em leguminosas (BNL). Portanto, *S. virgata* apresenta grande potencial de uso em áreas de reflorestamento de mata ciliar e na recuperação de solos degradados (Allen & Allen, 1981; Pott & Pott, 1994).

Os estudos das bactérias que nodulam esta planta permitiram a descrição de uma nova espécie de BNL, *Azorhizobium doebereinae* (Moreira et al., 2006) e demonstram que a maioria dos isolados de nódulos desta leguminosa apresenta características fenotípicas e simbióticas altamente similares a *A. doebereinae* (Moreira et al., 2006; Florentino & Moreira, 2009). Nestes estudos, a diversidade fenotípica foi avaliada pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida, SDS-PAGE, a qual tem sido utilizada em vários trabalhos para avaliar a diversidade de BNL (Moreira et al., 1993; Lima et al., 2005; Soares et al., 2006). No entanto, para os isolados de nódulos de *S. virgata*, os perfis de proteínas apresentaram alta similaridade entre si, não permitindo a distinção entre os isolados.

Em relação à eficiência simbiótica, também não foi possível obter distinção entre estes isolados, os quais apresentam alta eficiência simbiótica quando inoculados em *S. virgata* e, quando infectam outros hospedeiros, a simbiose é sempre inefectiva. Por outro lado, esta leguminosa somente estabelece simbiose eficiente quando inoculada com isolados homólogos (Gonçalvez & Moreira, 2004; Florentino & Moreira, 2009).

Normalmente, uma única espécie leguminosa pode ser hospedeira de BNLs que apresentam grande diversidade fenotípica, podendo indicar a presença de vários gêneros de BNL (Barnet & Catt, 1991; Sylla et al., 2002). Em um estudo realizado com os isolados de nódulos de *Acaciella angustissima*, foi verificada a presença das bactérias *Sinorhizobium mexicanum*, *Rhizobium tropici*, *Mesorhizobium plurifarium* e *Agrobacterium tumefaciens* e que a eficiência simbiótica destas bactérias com seu hospedeiro de origem foi altamente variável (Rincón-Rosales et al., 2009).

Mesmo para outras espécies de *Sesbania*, como *S. sesban*, os estudos mostram que esta pode ser planta hospedeira de BNL dos gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium* (Bala et al., 2002). Em um outro estudo, foram isoladas espécies de *S. saheli*, *S. meliloti* e *R. huautlense*, de nódulos das espécies *S. sesban*, *S. aegyptica* e *S. rostrata* (Sharma et al., 2005). No caso de *S. virgata*, em um estudo realizado recentemente no Uruguai, foram identificadas as espécies *Rhizobium etli* e *Azorhizobium doebereineriae* em nódulos desta leguminosa (Blanco et al., 2008).

Considerando as características de alta similaridade simbiótica e fenotípica por SDS-PAGE de proteínas totais apresentada pelos isolados de nódulos de *S. virgata* oriundos do Sul do estado de Minas Gerais, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a diversidade genética pela técnica do Rep-PCR empregando o *primer* BOX e utilizar testes fenotípicos, como tolerância a altas temperaturas e concentrações salinas, a valores extremos de pH e a diferentes tipos de antibióticos, para tentar discriminar esses isolados. Estirpes referência representantes dos principais gêneros de BNL, também foram incluídas neste estudo.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Origem das estirpes

Foram utilizadas 72 estirpes que apresentaram características culturais em meio 79 (Fred & Waksman, 1928), também denominado YMA (Vincent, 1970) contendo azul de bromotimol e pH 6,8, similares a *A. doebereinae*, como crescimento rápido, alcalinização do meio e escassa produção de exopolissacarídeos. Essas estirpes foram isoladas de amostras de solos coletadas próximas do sistema radicular de plantas de *S. virgata*, no sul de MG, utilizando a mesma espécie vegetal como planta-isca (Florentino & Moreira, 2009). No presente estudo, foram incluídas, ainda, estirpes representantes dos principais gêneros de bactérias nodulíferas em leguminosas, conforme descrito na Tabela 1.

TABELA 1 Identificação das estirpes de BNL utilizadas nesse estudo

Estirpes	Identificação	Hospedeiro de origem	Características culturais em meio 79			Referência
			ACI <sup>1</sup>	pH <sup>2</sup>	EPS <sup>3</sup>	
72 estirpes isoladas de nódulos de <i>S. virgata</i>		<i>Sesbania virgata</i>	3	Al	Escassa	Florentino & Moreira (2009)
ORS 571 <sup>T</sup>	<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>S. rostrata</i>	3	Al	Escassa	Dreyfus et al. (1988)
BR 5401 <sup>T</sup>	<i>A. doebereineriae</i>	<i>S. virgata</i>	3	Al	Escassa	Moreira et al. (2006)
CIAT 899 <sup>T</sup>	<i>Rhizobium tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	3	Ac	Alta	Martinez-Romero et al. (1991)
UFLA 03-84	<i>Bradyrhizobium sp.</i>	<i>Vigna unguiculata</i>	7	Al	Média	Lacerda et al. (2004); Moreira (2005)
BR 3804	<i>Mesorhizobium plurifarium</i>	<i>Chamaecrista ensiformis</i>	4	Ac	Alta	Moreira et al. (1993)
BR 6806	<i>Sinorhizobium sp.</i>	<i>Pithecellobium dulce</i>	4	Ac	Alta	Moreira et al. (1993)
BR 3405	<i>Burkholderia caribensis</i>	<i>Mimosa caesalpiniiifolia</i>	4	Ac	Média	Faria (1997)
LMG 19424 <sup>T</sup>	<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	<i>M. pudica</i>	3	Al	Baixa	Chen et al. (2001)

<sup>1</sup>Tempo, em dias, para o aparecimento de colônia isolada, <sup>2</sup> reação do meio de cultivo após crescimento de colônias, <sup>3</sup> produção de exopolissacarídeos

#### 4.2 Diversidade genética das estirpes (BOX-PCR)

A diversidade genética das estirpes foi analisada pela técnica do Rep-PCR, utilizando o *primer* BOX (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3')

(Versalovic et al., 1994). Para a extração do DNA bacteriano, colônias isoladas das bactérias foram introduzidas em microtubos de 1,5 mL contendo 1 mL de água ultrapura estéril e aquecidas, por 10 minutos, a 95°C.

A reação de amplificação (20 µL) foi realizada com os seguintes volumes (µL): água milli-Q estéril, (9,45), dNTPs, (1,25), tampão Gitschier 5X (5,0), BSA (0,4), DMSO (2,5), *primer* (1,0), Taq (0,4) e DNA (5,0). Os ciclos de amplificação consistiram de: um ciclo de desnaturação inicial a 95°C, por 7 minutos; 35 ciclos de desnaturação (1 minuto a 94°C), anelamento (1 minuto a 53°C) e extensão (8 minutos a 65°C); um ciclo de extensão final a 65°C, por 16 minutos; manutenção a 4°C. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese a 70 V em gel de agarose a 1,5%, de 20 x 20 cm, em tampão TAE, 0,5 X por 16 horas, à temperatura ambiente. Utilizou-se como peso molecular o marcador 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen™). Em seguida, o gel foi corado com brometo de etídio e fotografado.

A diversidade genética das estirpes foi analisada pela observação da presença ou da ausência de bandas polimórficas no gel. Para a presença ou a ausência das bandas, atribuíram-se respectivamente, os valores 1 e 0, para a construção de uma matriz. Os dados da matriz foram agrupados utilizando-se o algoritmo *unweighted pairgroup mean arithmetic method* (UPGMA) e o coeficiente de Jaccard do programa NTSYS-pc versão 2.10.

### **4.3 Ensaios fenotípicos**

Antes da exposição das estirpes às condições de altas temperaturas e concentrações salinas e a valores extremos de pH, estas foram cultivadas em meio líquido. O meio 79 foi utilizado para o cultivo das estirpes referências representantes dos principais gêneros de BNL e o meio LO, para o cultivo das estirpes do gênero *Azorhizobium* e para os demais isolados de nódulos de *S. virgata*. O cultivo das bactérias foi realizado sob agitação, a 120 rpm, por 72

horas, tempo suficiente para que as células atingissem a fase logarítmica de crescimento. Após esse período, procedeu-se a lavagem das células com solução salina (0,85%), objetivando a remoção de resíduos do meio de cultura do inóculo, que poderiam resultar num falso crescimento positivo (Trannin et al., 2001; Nóbrega et al., 2004). Alíquotas de um 1,0 mL de cada cultura bacteriana contendo  $10^9$  células foram transferidas para microtubos esterilizados, com capacidade de 1,5 mL, para centrifugação a 10.000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1,0 mL de solução salina (0,85%) estéril e recentrifugadas. O processo de descarte do sobrenadante, ressuspensão das células e centrifugação foi repetido por três vezes.

#### **4.3.1 Tolerância à salinidade**

Para o teste de tolerância às diferentes concentrações salinas, alíquotas de 0,1 mL dessas suspensões de bactérias foram inoculadas e espalhadas, com alça de Drigalsky, em placas de Petri com os meios de cultura 79 (utilizado para o cultivo das estirpes representantes dos principais gêneros de BNL) e LO (utilizado para o cultivo das demais estirpes), contendo NaCl nas seguintes concentrações: 0; 1; 3; 5; 10; 12,5; 15; 17,5 e 20 g.L<sup>-1</sup>. O experimento foi feito em triplicata. Para avaliar a tolerância das bactérias nas diferentes concentrações de NaCl, foi observada a presença (+) ou a ausência (-) de crescimento no meio de cultura, após 72 horas de incubação a 28°C.

#### **4.3.2 Tolerância a valores extremos de pH**

As estirpes foram avaliadas quanto à capacidade de tolerar valores extremos de pH (4,0; 5,0; 6,0; 8,0 e 9,0) nos meios de cultura 79 (utilizado para o cultivo das estirpes representantes dos principais gêneros de BNL) e LO

(utilizado para o cultivo das demais estirpes). Como tratamento-controle, foi utilizado o meio de cultura a pH 6,8. Para as etapas de inoculação, tempo de incubação e avaliação do crescimento das bactérias nos meios contendo os diferentes valores de pH, seguiu-se o mesmo procedimento adotado no teste de tolerância à salinidade.

#### **4.3.3 Tolerância a diferentes temperaturas**

As estirpes foram avaliadas quanto à capacidade de tolerar diferentes valores de temperatura: 27°, 35°, 40°, 45° e 50°C, nos meios de cultura 79 (utilizado para o cultivo das estirpes representantes dos principais gêneros de BNL) e LO (para o cultivo das demais estirpes). O valor de pH desses meios foi ajustado para pH 6,8. Como tratamento-controle, foi utilizado o crescimento das estirpes à temperatura de 28°C. Para as etapas de inoculação e avaliação do crescimento das bactérias nos meios, seguiu-se o mesmo procedimento adotado no teste de tolerância a diferentes concentrações salinas e valores de pH.

#### **4.3.4 Tolerância a antibióticos**

Para o teste de tolerância aos antibióticos, foi utilizado o método de difusão dos discos impregnados e testados os 13 tipos de antibióticos em discos nas seguintes concentrações: ( $\mu\text{gL}^{-1}$ ): amoxicilina - AMO (10), ampicilina - AMP (10), estreptomicina - EST (10), gentamicina - GEN (10), azitromicina - AZI (15), claritromicina - CLA (15), eritromicina - ERI (15), ácido nalidíxico - NAL (30), cloranfenicol - CLO (30), kanamicina - KAN (30), rifamicina - RFM (30), vancomicina - VAN (30) e sulfonamidas - SUL (300).

Para esse teste, todas as bactérias foram cultivadas em placas de ágar nutriente. O inóculo foi diluído em solução salina NaCl (0,85%), até obter uma turbidez equivalente ao tubo 0,5 da Escala Mac Farland. Essas suspensões foram

transferidas para placas contendo os meios de cultura 79 (para o cultivo das estirpes representantes dos principais gêneros de BNL) e LO (para o cultivo das demais estirpes) com o auxílio de swabs de algodão. Posteriormente, foram inseridos quatro discos de antibióticos por placa. Estas foram incubadas a 28°C, por 72 horas. O experimento foi desenvolvido em duplicata e avaliou-se a presença ou a ausência de halo de inibição.

Foram avaliadas, no total, 35 características fenotípicas, constituídas pela tolerância das bactérias a altas temperaturas e a concentrações salinas, a valores extremos de pH e a diferentes antibióticos. Todos esses testes foram avaliados quanto à presença ou à ausência de crescimento bacteriano. Para esses parâmetros, foram atribuídos, respectivamente, os valores 1 (presença) e 0 (ausência de crescimento), para a construção de uma matriz. Os dados da matriz foram agrupados utilizando-se o algoritmo *unweighted pairgroup mean arithmetic method* (UPGMA) e o coeficiente de Jaccard do programa NTSYS-pc versão 2.10.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Diversidade genética

Por meio da utilização da técnica do Rep-PCR utilizando o *primer* BOX-PCR, foi estudada a diversidade genética de 72 isolados de nódulos de *S. virgata* e de oito estirpes referência representantes dos principais gêneros de BNL. Na Figura 1 observam-se os padrões de bandas de DNA amplificados e, na Figura 2, o dendrograma formado a partir da análise desses padrões de bandas de DNA amplificados com essa técnica, que proporcionou a formação de 33 grupos a 80% de similaridade. Destes, as estirpes utilizadas como referência, ORS 571<sup>T</sup> (*A. caulinodans*), LMG 19424<sup>T</sup> (*C. taiwanensis*), UFLA 03-84 (*Bradyrhizobium* sp.), CIAT 899<sup>T</sup> (*R. tropici*), BR 3405 (*B. caribensis*), BR 3804 (*M. plurifarium*) e BR 6806 (*Sinorhizobium* sp.), formaram seis grupos distintos.

As 72 estirpes isoladas de nódulos de *S. virgata* foram agrupadas em 26 grupos de diversidade genética, cuja similaridade variou de 38% a 100%. A estirpe BR 5401<sup>T</sup> (*A. doebereineriae*) foi incluída em um desses grupos. Este resultado sugere que os isolados de nódulos de *S. virgata* apresentaram alta diversidade genética, indicando que esta técnica, Rep-PCR com o *primer* BOX, permite uma boa distinção entre isolados de nódulos de *S. virgata*.

Resultados similares foram encontrados por outros autores que, utilizando essa mesma técnica, porém, com outro *primer*, REP, conseguiram boa distinção entre isolados de nódulos dessa leguminosa (Moreira et al., 2006).

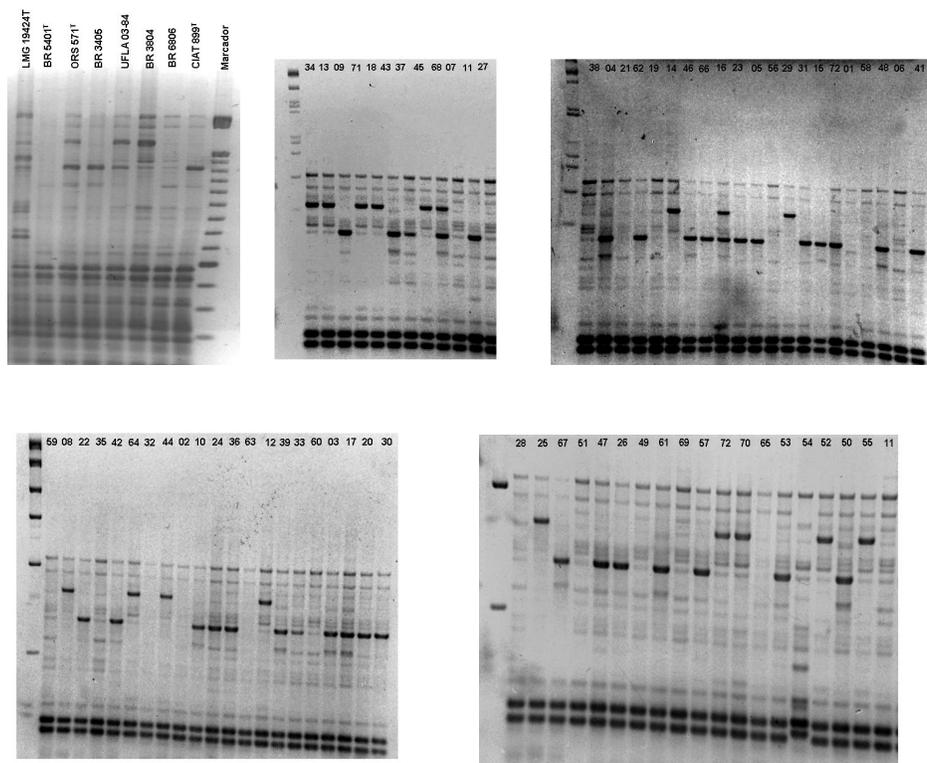


FIGURA 1 Padrões de bandas de DNA amplificados com o *primer* BOX das estirpes de bactérias nodulíferas representantes dos principais gêneros, LMG 19424<sup>T</sup> (*Cupriavidus taiwanensis*); BR 5401<sup>T</sup> (*Azorhizobium doebereineriae*); ORS 571<sup>T</sup> (*A. caulinodans*); BR 3405 (*Burkholderia caribensis*); UFLA 03-84 (*Bradyrhizobium* sp.); BR 3804 (*Mesorhizobium plurifarum*); BR 6806 (*Sinorhizobium* sp.); CIAT 899<sup>T</sup> (*Rhizobium tropici*) e dos 72 isolados de nódulos de *Sesbania virgata*.

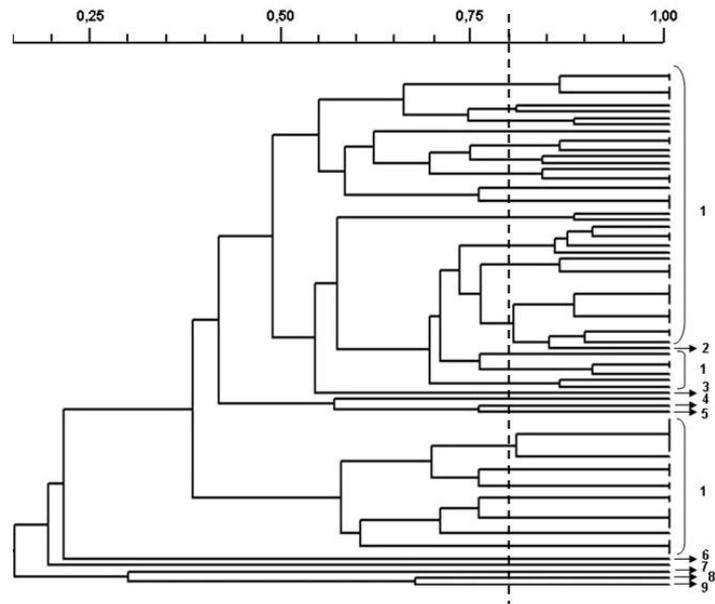


FIGURA 2 Dendrograma de diversidade genética das estirpes isoladas de *Sesbania virgata* e estirpes representantes dos principais gêneros de bactérias nodulíferas em leguminosas, após a análise de agrupamento dos fragmentos obtidos pela amplificação do DNA por PCR com o primer específico BOX (Versalovic et al., 1994). Análise realizada com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jacard. 1 – estirpes isoladas de *S. virgata*; 2 – BR 5401<sup>T</sup>, *Azorhizobium doebereineriae*; 3 – ORS 571<sup>T</sup>, *A. caulinodans*; 4 – LMG 19424<sup>T</sup>, *Cupriavidus taiwanensis*; 5 – UFLA 03-84, *Bradyrhizobium* sp.; 6 – CIAT 899<sup>T</sup>, *Rhizobium tropici*; - 7 – BR 3405, *Burkholderia caribensis*; 8 - BR 3804 – *Mesorhizobium plurifarum*; 9 – BR 6806 – *Sinorhizobium* sp.

## 5.2 Testes fenotípicos

Na Tabela 2 são mostrados os resultados dos 35 testes fenotípicos de 11 isolados de nódulos de *S. virgata* e das 8 estirpe referência representantes de 7 gêneros de BNL: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*,

*Azorhizobium*, *Burkholderia* e *Cupriavidus*. Esses resultados foram agrupados em um dendrograma (Figura 3).

Analisando-se o dendrograma, observa-se que os onze isolados de nódulos de *S. virgata*, UFLA 01-65, UFLA 01-659, UFLA 01-661, UFLA 01-623, UFLA 01-660, UFLA 01-663, UFLA 01-622, UFLA 01-662, UFLA 01-664, UFLA 01-657 e UFLA 01-658, formaram nove grupos, a 81% de similaridade.

Dentre as estirpes utilizadas como referência, a BR 5401<sup>T</sup> foi a que apresentou comportamento com maior similaridade com os isolados de nódulos de *S. virgata*, se agrupando com estes a 73%. As estirpes ORS 571<sup>T</sup> e LMG 19424<sup>T</sup> se agruparam com os isolados de nódulos de *S. virgata* e com a estirpe BR 5401<sup>T</sup>, a 69% de similaridade. As estirpes representantes dos outros gêneros de BNL formaram grupos distantes.

Em relação à tolerância à temperatura, não foi observado crescimento bacteriano nas temperaturas de 45° e 50°C. Já na temperatura de 40°C, das estirpes utilizadas como referência, somente a UFLA 03-84, representante do gênero *Bradyrhizobium*, não apresentou crescimento, quando submetida nesta condição. Para os isolados de nódulos de *S. virgata*, seis dos onze testados, UFLA 01-623, UFLA 01-660, UFLA 01-622, UFLA 01-662, UFLA 01-663 e UFLA 01-664, também não apresentaram crescimento nesta temperatura.

A máxima concentração salina tolerada pelos isolados de *S. virgata* foi de 17,5g L<sup>-1</sup> em meio L.O. Dos onze isolados testados, dez toleraram as mesmas concentrações salinas que a estirpe *A. doebereinae* (BR 5401<sup>T</sup>), 15 g.L<sup>-1</sup>. O isolado UFLA 01-657 foi o único que tolerou maior concentração de NaCl que os demais, 17,5g L<sup>-1</sup>, sendo semelhante ao comportamento da estirpe *A. caulinodans* (ORS 571<sup>T</sup>). No presente estudo, os isolados de *S. virgata* apresentaram menor tolerância à salinidade quando comparados aos resultados

de um estudo em que cerca de 40% de isolados desta leguminosa toleraram até 20 g.L<sup>-1</sup> (Frioni et al., 2001).

TABELA 2 Resultados dos testes fenotípicos

Estirpes	Temp. (°C)			pH		NaCl (g.L <sup>-1</sup> )				Antibióticos (µg)										
	27-35	40	45-50	4-5	6-9	0-5	10-15	17	20-40	1	2	3, 4	5	6	7	8	9, 10	11)	12	13
ORS 571 <sup>T</sup>	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
LMG 19424 <sup>T</sup>	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
CIAT 899 <sup>T</sup>	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+
BR	3804	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	6806	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
	3405	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	5401 <sup>T</sup>	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
UFLA	0384	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	01656	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
	01657	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
	01659	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
	01623	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
	01660	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
	01661	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
	01622	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+
	01662	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	01663	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+
	01664	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
01658	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	

Antibióticos concentrações (µg): 1- vancomicina – VAN (30); 2- eritromicina–ERI (15); 3- kanamicina – KAN (30); 4- rifamicina – RFM (30); 5- estreptomicina – EST (10); 6- azitromicina–AZI (15); 7- claritromicina – CLA (15); 8- ácido nalidíxico – NAL (30); 9- amoxicilina – AMO (10); 10- ampicilina – AMP (10); 11- sulfonamidas – SUL (300); 12- gentamicina – GEN (10); 13- cloranfenicol – CLO (30)

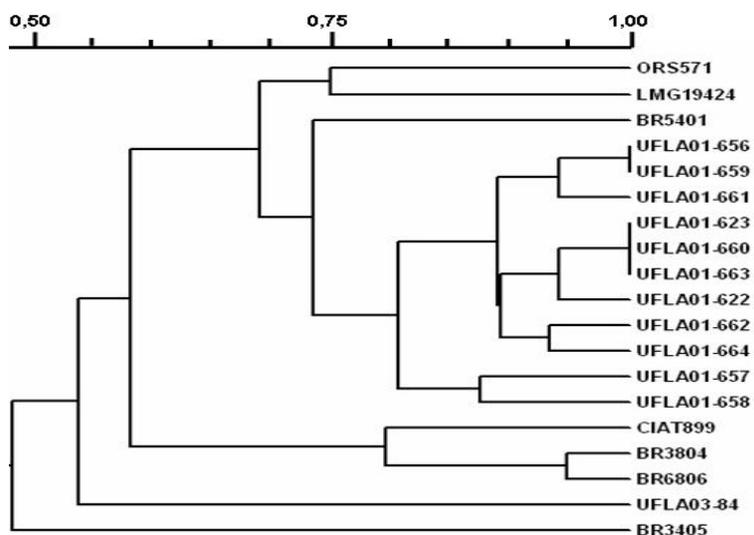


FIGURA 3 Dendrograma representando a tolerância de onze bactérias isoladas de nódulos de *S. virgata* e de oito estirpes de BNL representantes dos gêneros *Rhizobium* (CIAT 899<sup>T</sup>), *Bradyrhizobium* (UFLA 03-84), *Mesorhizobium* (BR 3804), *Sinorhizobium* (BR 6806), *Azorhizobium* (ORS 571<sup>T</sup> e BR 5401<sup>T</sup>), *Burkholderia* (BR 3405) e *Cupriavidus* (LMG 19424<sup>T</sup>), quando submetidas aos testes de tolerância às altas temperaturas e concentrações salinas, valores extremos de pH e a 13 tipos de antibióticos. Análise realizada com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jacard.

A maioria das estirpes referência cultivadas em meio 79, CIAT 899<sup>T</sup>, LMG 19424<sup>T</sup>, BR 3804 e BR 6806 tolerou a concentração máxima de 17,5 g.L<sup>-1</sup> de NaCl em meio 79. As outras duas, UFLA 03-84 e BR 3405, apresentaram crescimento apenas nas concentrações de 5 g.L<sup>-1</sup>.

Neste trabalho, o nível tolerado pelas estirpes foi menor que o descrito para algumas espécies de BNL, como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium* e *Burkholderia*, que toleraram até 45g L<sup>-1</sup> de NaCl (Hung et al., 2005).

Em relação ao teste de tolerância a valores extremos de pH, observa-se que os onze isolados de nódulos de *S. virgata*, juntamente com as duas espécies de *A. caulinodans* e *A. doebereineriae*, apresentaram crescimento nos valores de pH de 6,0 a 9,0, não apresentando crescimento em valores de pH 4,0 e 5,0. A sensibilidade à acidez por essas duas espécies do gênero *Azorhizobium* foi também observada em outros trabalhos (Silva, 2008; Guimarães et al., 2009), indicando que o gênero *Azorhizobium* é sensível à acidez, o que pode limitar a sua sobrevivência em solos com estas características.

A ausência de crescimento dos onze isolados de nódulos de *S. virgata* nos valores de pH de 4,0 e 5,0 pode ser explicada pelo fato de essas bactérias terem sido isoladas de amostras de solos que apresentavam valores médios de pH igual a 8,0 (Florentino, 2005; Florentino & Moreira, 2009).

No teste de tolerância aos 13 tipos de antibióticos, todos os isolados de nódulos de *S. virgata* foram sensíveis a RFM, NAL, GEN, KAN, SUL e AZI e tolerantes a VAN, AMO e AMP. Em relação aos outros antibióticos, as estirpes apresentaram comportamento variável. Nesse teste, foram formados cinco grupos de tolerância a estes compostos, constituídos por representantes que apresentaram tolerância a três, quatro, cinco, seis e sete tipos de antibióticos. O grupo que apresentou tolerância a três tipos de antibióticos, grupo mais sensível, foi constituído pelo isolado UFLA 01-658. Já o grupo que apresentou tolerância a sete tipos também foi constituído por um isolado, UFLA 01-622.

Neste estudo, a variabilidade em relação à tolerância aos antibióticos também foi observado para as estirpes utilizadas como referência. Na literatura, tem sido relatado que estirpes de crescimento lento apresentam maior tolerância a diferentes tipos de antibióticos, quando comparadas às estirpes de crescimento rápido (Dowdle & Bohlool, 1985). No presente estudo, foram encontrados resultados semelhantes, em que a estirpe UFLA 03-84, de crescimento lento e identificada como pertencente ao gênero *Bradyrhizobium*, foi tolerante a todos

os antibióticos testados. As outras estirpes apresentaram comportamento variável.

A estirpe BR 5401<sup>T</sup> foi tolerante a cinco tipos de antibióticos, VAN, AMO, NAL, AMP e SUL. Já a estirpe ORS 571<sup>T</sup> foi tolerante a oito tipos de antibióticos, VAN, ERI, AZI, CLA, AMO, AMP, GEN e CLO.

Os estudos fenotípicos visando avaliar a tolerância de bactérias isoladas de nódulos de diversas leguminosas a condições ambientais têm sido desenvolvidos em vários trabalhos científicos (Odee et al., 1997; Sylla et al., 2002; Freitas et al., 2007; Fall et al., 2008). Esses testes, além de permitirem caracterização fenotípica dos isolados, apresentam também grande importância no processo de seleção de estirpes inoculantes adaptadas a diversas condições.

Neste estudo, dentre os onze isolados estudados, observou-se a presença de alguns que se destacaram na presença de altas temperaturas, concentrações salinas e diferentes tipos de antibióticos.

## 6 CONCLUSÕES

A análise de diversidade genética, juntamente com os testes fenotípicos, proporcionou boa distinção entre os isolados de nódulos de *S. virgata*.

Dentre esses isolados, alguns se destacaram por apresentar maior tolerância a altas temperaturas, concentrações salinas e diferentes tipos de antibióticos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BALA, A.; MURPHY, P.; GILLER, K. E. Occurrence and genetic diversity of rhizobia nodulating *Sesbania sesban* in African soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 34, n. 11, p.1759-1768, Nov. 2002.

BARNET, Y. M.; CATT, P. C. Distribution and characteristics of root-nodule bacteria isolated from Australian *Acacia* spp. **Plant and Soil**, The Hague, v. 135, p. 109-120, Aug. 1991.

CHEN, W. X.; LAEVENS, S.; LEE, T.; COENYE, T.; VOS, P.; MERGEAY, M.; VANDAMME, P. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov. isolated from nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Spencers Wood, v. 51, n. 5, p. 1729-1735, Sept. 2001.

DOWDLE, S. F.; BOHLOOL, B. B. Predominance of Fast-Growing *Rhizobium japonicum* in a Soybean Field in the People's Republic of China. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 50, n. 5, p. 1171-1176, Nov. 1985.

DREYFUS, B.; EMERICH, C.; DOMMERGUES, Y. R. Free-living *Rhizobium* strain able to growth on N<sub>2</sub> as the solo nitrogen source. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 45, n.1, p. 711-713, Jan. 1983.

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**, Washington, v. 38, n. 1, p. 89-98, Jan. 1988.

FALL, D.; DIOUF, D.; OURARHI, M.; FAYE, A.; ABDELMOUNEN, H.; NEYRA, M.; SYLLA, S. N.; EL IDRISSE, M. M. Phenotypic and genotypic characteristics of *Acacia Senegal* (L.) Willd. root-nodulating bacteria isolated from soils in the dryland part of Senegal. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 47, n. 2, p. 85-97, Aug. 2008.

FARIA, S. M. **Obtenção de Estirpes de Rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies florestais.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1997. (Recomendação técnica, 1).

FLORENTINO, L. A. **Características da simbiose entre *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. e *Azorhizobium* sp. nov. e dos solos onde estes ocorrem.** 2005. 54 p. Monografia (Graduação em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

FLORENTINO, L. A.; MOREIRA, F. M. S. Características simbióticas e fenotípias de *Azorhizobium doebereinae*, microssimbionte de *Sesbania virgata*. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 33, n. 2, p. 215-226, abr. 2009.

FRED, E. B.; WAKSMAN, S. A. **Laboratory manual of general microbiology:** with special reference to the microorganisms of the soil. New York: McGraw-Hill Book Company, 1928. 145 p.

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

FRIONI, L.; MALATÉS, D.; IRIGOYEN, I.; DODERA, R. Promiscuity for nodulation and effectivity in the N<sub>2</sub>-fixing legume tree *Acacia caven* in Uruguay. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 7, n. 3, p. 239-244, May, 1998.

GONÇALVES, M.; MOREIRA, F. M. S. Specificity of the Legume *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. and its Nodule Isolates *Azorhizobium johannae* with other Legume Hostes and Rhizobia. I. **Symbiosis**, Phyladelphia, v. 36, n. 1, p. 57-68, Jan. 2004.

GUIMARÃES, A. A.; JARAMILLO, P. M. D.; RANGEL, W. M.; FLORENTINO, L. A.; MOREIRA, F. M. S. Tolerância de estirpes isoladas de nódulos de *Sesbania virgata* à salinidade e a diferentes valores de pH. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 32., 2009, Fortaleza. Anais...Fortaleza: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 2009. CD ROM

HUNG, M. H.; BHAGWATH, A. A.; SHEN, F.T.; DEVASYA, R. P.; YOUNG, C.C. Indigenous rhizobia associated with native shrubby legumes in Taiwan. **Pedobiologia**, Jena, v. 49, n. 6, p. 577-584, Dec. 2005.

LACERDA, A. M.; MOREIRA, F. M. S.; ANDRADE, M. J. B.; SOARES, A. L. L. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão-caupi. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 51, n. 293, p. 67-82, jan. 2004.

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

MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F. M.; FRANCO, A. A.; GRAHAM, P.; PARDO, M. A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 41, n. 3, p. 417-426, July, 1991.

MOREIRA, F. M. S. Estirpes de bactérias altamente eficientes que fornecem nitrogênio para o caupi foram selecionadas na UFLA e já são recomendadas para a produção de inoculantes comerciais. **Boletim de Extensão da UFLA**, Lavras, n. 102, 2005. Disponível em: <[www.ufla.br/editora/publicações/boletim de extensão](http://www.ufla.br/editora/publicações/boletim_de_extensao)>. Acesso em: 19 abr. 2009.

MOREIRA, F. M. S.; CRUZ, L.; FARIA, S. M.; MARSH, T.; MARTINEZ-ROMERO, E.; PEDROSA, F. O.; YOUNG, P. P. W. *Azorhizobium doebereineriae* sp. nov. Microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, v. 29, n. 3, p. 197-206, Oct. 2006.

MOREIRA, F. M. S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERS, K.; FRANCO, A. A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, Amsterdam, n. 1, v. 16, p. 135-146, Feb. 1993.

NÓBREGA, R. S. A.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; LIMA, A. S. Caracterização fenotípica e diversidade de bactérias diazotróficas associativas isoladas de solos em reabilitação após a mineração de bauxita. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, n. 28, n. 2, p. 269-279, 2004.

ODEE, D. W.; SUTHERLAND, J. M.; MAKATIANI, E. T.; MCINROY, S. G.; SPRENT, J. I. Phenotypic characteristics and composition of rhizobia associated with woody legumes growing in diverse Kenyan conditions. **Plant and Soil**, The Hague, v. 188, n. 1, p. 65-75, Jan. 1997.

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do Pantanal**. Corumbá: Embrapa, 1994. 320p.

RINCÓN-ROSALES, R.; LLORET, L.; PONCE, R.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Rhizobia with different symbiotic efficiencies nodulate *Acaciella angustissima* in Mexico, including *Sinorhizobium chiapanecum* sp. nov. which has common symbiotic genes with *Sinorhizobium mexicanum*. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 67, n. 1, p. 103-117, Jan. 2009.

SHARMA, R. S.; MOHMMED, A.; VANDANA MISHRA, V.; BABU, C. R. Diversity in a promiscuous group of rhizobia from three *Sesbania* spp. colonizing ecologically distinct habitats of the semi-arid Delhi region. **Research in Microbiology**, Paris, v. 156, n. 1, p. 57-67, Jan. 2005.

SILVA, M. A. P. **Efeito da calagem no crescimento e nodulação de *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. em solos da Amazônia e de Itutinga e a influência dos diferentes meios de cultivo e valores de pH no crescimento de *Azorhizobium doebereineriae* sp.** 2008, 70 p. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

SYLLA, S. N.; SAMBA, R. T.; NEYRA, M.; NDOYE, I.; GIRAUD, R.; WILLEMS, A.; DE LAJUDIE, P.; DREYFUS, B. Phenotypic and Genotypic Diversity of Rhizobia Nodulating *Pterocarpus erinaceus* and *P. lucens* in Senegal. **Systematic Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 25, n. 4, p. 572-583, 2002.

TRANNIN, I. C. B.; MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O.; LIMA, A. Tolerância de estirpes e isolados de *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* a zinco, cádmio e cobre *in vitro*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 25, n. 25, p. 305-316, 2001.

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

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

# 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](#)