

FERNANDA BUENO SAMPAIO

**ISOLADOS DE RIZÓBIOS CAPTURADOS POR GENÓTIPOS SILVESTRES DE
FEIJOEIRO: OBTENÇÃO, MORFOLOGIA E USO DE FONTES DE CARBONO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia, área de concentração: Solo e Água.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Eliana Paula Fernandes Brasil

Co-orientador:

Dr. Enderson Petrônio de Brito Ferreira

Goiânia, GO – Brasil
2013

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG/ mr**

Sampaio, Fernanda Bueno.

Isolados de rizóbios capturados por genótipos silvestres de feijoeiro: obtenção, morfologia e uso de fontes de carbono [manuscrito] / Fernanda Bueno Sampaio. – 2013.

xv, 86f.: il., figs, tabs.

**Orientadora: Prof.^a Dr.^a Eliana Paula Fernandes Brasil;
Coorientador: Prof. Dr. Enderson Petrônio de Brito Ferreira.**

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás. Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, 2013.

Bibliografia.

Inclui glossário de abreviaturas e siglas.

DEDICO

*À minha mãe, Maria Angélica.
Aos meus irmãos, Alexandre e André.
À minha avó, Angélica.*

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Espiritualidade, pela proteção e ajuda nos momentos difíceis.

A toda a minha família, especialmente, a minha mãe Maria Angélica Bueno e aos meus irmãos Alexandre e André, pelo amor, carinho, dedicação, ajuda para vencer mais uma etapa e força para seguir em frente.

À professora Dr.^a Eliana Paula Fernandes Brasil, por ser minha orientadora na pós-graduação, pelos ensinamentos, dedicação e por ter me proporcionado a oportunidade de desenvolver este projeto.

Ao meu coorientador Dr. Enderson Petrônio de Brito Ferreira, pesquisador na Embrapa Arroz e Feijão, pela grande dedicação e suporte na execução do projeto.

À Embrapa Arroz e Feijão, especialmente aos colegas e estagiários Rafael, Marcílio, Gustavo e Juliana, pela brilhante ajuda na execução de todas as atividades do projeto, e a todos que contribuíram de alguma forma.

À Universidade Federal de Goiás, aos professores da Escola de Agronomia, aos colegas e amigos conquistados no decorrer do curso e a todos aqueles que auxiliaram para a conclusão do trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado.

Meus sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE SIGLAS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 CULTURA DO FEIJOEIRO COMUM: ASPECTOS HISTÓRICOS	15
2.2 CULTIVO DO FEIJOEIRO COMUM	16
2.3 DISPONIBILIDADE DE NUTRIENTES MINERAIS PARA A CULTURA DO FEIJOEIRO COMUM	17
2.4 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN) E A SIMBIOSE RIZÓBIO-LEGUMINOSA	19
2.5 FATORES ENVOLVIDOS NA EFICIÊNCIA DA FBN PELO FEIJOEIRO	29
2.6 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ISOLADOS DE RIZÓBIOS	31
2.6.1 Tempo de crescimento	31
2.6.2 Alteração no pH do meio de cultura	33
2.6.3 Morfologia das colônias	34
2.6.4 Transparência e forma das colônias	35
2.6.5 Superfície das colônias	36
2.6.6 Produção, consistência e aparência do muco	37
2.7 CARACTERIZAÇÃO QUANTO A UTILIZAÇÃO DE FONTES DE CARBONO DOS ISOLADOS DE RIZÓBIOS	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SOLO	41
3.2 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE RIZÓBIO	42
3.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS DE RIZÓBIO	44
3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS DE RIZÓBIO QUANTO À UTILIZAÇÃO DE FONTES DE CARBONO	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ISOLADOS DE RIZÓBIO OBTIDOS EM GENÓTIPOS SILVESTRES DE FEIJOEIRO	47
4.2 DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E USO DE FONTES DE CARBONO DE ISOLADOS DE RIZÓBIOS SELECIONADOS	56
4.2.1 Estado de Goiás (solos provenientes dos municípios de Jussara e Nova Veneza)	56
4.2.2 Estado de Minas Gerais (solos provenientes dos municípios de Uberlândia e Unai)	64
4.2.3 Estado do Paraná (solos provenientes dos municípios de Araucária e Prudentópolis)	72
5 CONCLUSÕES	80
6 REFERÊNCIAS	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Características químicas dos solos coletados para a instalação do ensaio de obtenção de isolados de rizóbio em nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro, na camada de 0-20 cm de profundidade (Goiânia, 2013).	41
Tabela 2.	Características granulométricas dos solos coletados para a instalação do ensaio de obtenção de isolados de rizóbio em nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro, na camada de 0-20 cm de profundidade (Goiânia, 2013).	42
Tabela 3.	Características morfológicas dos isolados de rizóbios obtidos de nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro em solos de Jussara e Nova Veneza (Goiás) e das estirpes padrão	57
Tabela 4.	Crescimento em diferentes fontes de carbono dos isolados de rizóbios obtidos de nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro em solos de Jussara e Nova Veneza (Goiás) e das estirpes padrão	61
Tabela 5.	Características morfológicas dos isolados de rizóbios obtidos de nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro em solos de Uberlândia e Unaí (Minas Gerais) e das estirpes padrão	65
Tabela 6.	Crescimento em diferentes fontes de carbono dos isolados de rizóbios obtidos de nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro em solos de Uberlândia e Unaí (Minas Gerais) e das estirpes padrão.....	70
Tabela 7.	Características morfológicas dos isolados de rizóbios obtidos de nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro em solos de Araucária e Prudentópolis (Paraná) e das estirpes padrão.....	73
Tabela 8.	Crescimento em diferentes fontes de carbono dos isolados de rizóbios obtidos de nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro em solos de Araucária e Prudentópolis (Paraná) e das estirpes padrão.....	76

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Sementes dos genótipos silvestres de feijoeiro utilizados como planta-isca em ensaio para obtenção de isolados de rizóbios. 42
- Figura 2.** Ensaio em casa-de-vegetação da Embrapa Arroz e Feijão com genótipos silvestres de feijoeiro em solo coletado de seis localidades dos Estados de Goiás, Minas Gerais e Paraná..... 43
- Figura 3.** Placas de Petri exemplificando a habilidade de isolados de rizóbios quanto à utilização de diferentes fontes de carbono, obtidos de nódulos em genótipos silvestres de feijoeiro. 46
- Figura 4.** Porcentagem dos isolados de rizóbios obtidos de nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro em solos do município de Jussara, quanto às características morfológicas avaliadas de alteração de pH; tamanho das colônias; velocidade de crescimento (rápido-1 dia, normal-2 dias e lento-3 dias); cor das colônias; quantidade de muco produzida; aparência das colônias; elasticidade do muco; tipo de borda; forma e transparência das colônias..... 48
- Figura 5.** Porcentagem dos isolados de rizóbios obtidos de nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro em solos do município de Nova Veneza, quanto às características morfológicas avaliadas de alteração de pH; tamanho das colônias; velocidade de crescimento (rápido-1 dia, normal-2 dias e lento-3 dias); cor das colônias; quantidade de muco produzida; aparência das colônias; elasticidade do muco; tipo de borda; forma e transparência das colônias..... 48
- Figura 6.** Porcentagem dos isolados de rizóbios obtidos de nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro em solos do município de Uberlândia, quanto às características morfológicas avaliadas de alteração de pH; tamanho das colônias; velocidade de crescimento (rápido-1 dia, normal-2 dias e lento-3 dias); cor das colônias; quantidade de muco produzida; aparência das colônias; elasticidade do muco; tipo de borda; forma e transparência das colônias..... 49
- Figura 7.** Porcentagem dos isolados de rizóbios obtidos de nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro em solos do município de Unaí, quanto às características morfológicas avaliadas de alteração de pH; tamanho das colônias; velocidade de crescimento (rápido-1 dia, normal-2 dias e lento-3 dias); cor das colônias; quantidade de muco produzida; aparência das colônias; elasticidade do muco; tipo de borda; forma e transparência das colônias..... 50
- Figura 8.** Porcentagem dos isolados de rizóbios obtidos de nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro em solos do município de Araucária, quanto às características morfológicas avaliadas de alteração de pH; tamanho das colônias; velocidade de crescimento (rápido-1 dia, normal-2 dias e lento-3 dias); cor das colônias; quantidade de muco produzida; aparência das colônias; elasticidade do muco; tipo de borda; forma e transparência das colônias..... 50
- Figura 9.** Porcentagem dos isolados de rizóbios obtidos de nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro em solos do município de Prudentópolis, quanto às características morfológicas avaliadas de alteração de pH; tamanho das colônias; velocidade de crescimento (rápido-1 dia, normal-2 dias e lento-3 dias); cor das colônias; quantidade de muco produzida; aparência das

	colônias; elasticidade do muco; tipo de borda; forma e transparência das colônias.....	51
Figura 10.	Porcentagem dos isolados obtidos de nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro, quanto às características morfológicas de velocidade de crescimento (rápido-1 dia, normal-2 dias e lento-3 dias); alteração de pH e quantidade de muco produzida, considerando a distribuição por local de coleta do solo dos Estados de Goiás, Minas Gerais e Paraná.....	53
Figura 11.	Porcentagem de isolados de nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro obtidos de (A) solos do Estado de Goiás, (B) solos do Estado de Minas Gerais e (C) solos do Estado do Paraná, de acordo com o tamanho das colônias e a quantidade de muco produzida.....	54
Figura 12.	Porcentagem dos isolados obtidos de nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro, quanto à transparência e consistência da massa de células, em solos do Estado de Goiás (A), de Minas Gerais (B) e do Paraná (C).....	55
Figura 13.	Porcentagem de isolados de nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro obtidos de (A) solos do Estado de Goiás, (B) solos do Estado de Minas Gerais e (C) solos do Estado do Paraná, de acordo com a velocidade de crescimento (1 dia - rápido, 2 dias - normal e 3 dias - lento) e a quantidade de muco produzida.....	56
Figura 14.	Dendrograma de similaridade construído com base nas características morfológicas de isolados de rizóbios obtidos de solos de Goiás, usando Jaccard como coeficiente de similaridade e UPGMA como método de agrupamento.....	60
Figura 15.	Dendrograma de similaridade construído com base no uso de diferentes fontes de carbono por isolados de rizóbios obtidos de solos de Goiás, usando Jaccard como coeficiente de similaridade e UPGMA como método de agrupamento.....	63
Figura 16.	Dendrograma de similaridade construído com base nas características morfológicas de isolados de rizóbios obtidos de solos de Minas Gerais, usando Jaccard como coeficiente de similaridade e UPGMA como método de agrupamento.....	68
Figura 17.	Dendrograma de similaridade construído com base no uso de diferentes fontes de carbono por isolados de rizóbios obtidos de solos de Minas Gerais, usando Jaccard como coeficiente de similaridade e UPGMA como método de agrupamento.....	72
Figura 18.	Dendrograma de similaridade construído com base nas características morfológicas de isolados de rizóbios obtidos de solos do Paraná, usando Jaccard como coeficiente de similaridade e UPGMA como método de agrupamento.....	75
Figura 19.	Dendrograma de similaridade construído com base no uso de diferentes fontes de carbono por isolados de rizóbio obtidos de solos do Paraná, usando Jaccard como coeficiente de similaridade e UPGMA como método de agrupamento.....	78

LISTA DE SIGLAS

B	Boro
Ca	Cálcio
Cu	Cobre
FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio
GO	Goiás
K	Potássio
Mg	Magnésio
MG	Minas Gerais
Mo	Molibdênio
N	Nitrogênio
N ₂	Nitrogênio atmosférico
NH ₄ ⁺	Íon amônio
NH ₃	Amônia
NO ₃ ⁻	Nitrato
NO ₂ ⁻	Nitrito
P	Fósforo
PR	Paraná

RESUMO

SAMPAIO, F. B. **Isolados de rizóbios capturados por genótipos silvestres de feijoeiro: obtenção, morfologia e uso de fontes de carbono.** 2013. 86 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Solo e Água)–Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.¹

O feijoeiro é uma leguminosa bastante difundida em todo o território nacional e importante fonte de proteína na alimentação humana. A inoculação de plantas leguminosas com rizóbios, capazes de realizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN), tem sido amplamente discutida, com base em estudos que indicam a sua viabilidade de utilização na agricultura, visto que a FBN diminui em parte o passivo ambiental gerado pelo elevado consumo de fertilizante nitrogenado. A utilização de genótipos silvestres de feijoeiro visa obter uma maior diversidade de rizóbios para isolamento e estudo da capacidade de FBN, o que poderá resultar em maior especificidade simbiótica para a cultura do feijoeiro. Objetivou-se obter e caracterizar morfologicamente e quanto ao uso de fontes de carbono isolados de rizóbios capturados em genótipos silvestres de feijoeiro, de solos oriundos dos Estados de Goiás, Minas Gerais e Paraná. As amostras de solo das seis áreas foram coletadas na profundidade de 0-20 cm para realização de análises químicas e físicas e foi realizado um ensaio em casa-de-vegetação, em vasos de 3 litros esterilizados, com 11 genótipos silvestres de feijoeiro para obtenção dos isolados. Foram obtidos 523 isolados de rizóbios, e selecionados 231 isolados, sendo 76 de Goiás, 99 de Minas Gerais e 56 do Paraná. Foram utilizadas sete espécies de bactérias como estirpes de referência, sendo três do gênero *Rhizobium tropici* (SEMIA 4077, SEMIA 4080 e SEMIA 4088), três do gênero *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (BR266, BR351 e BR281) e uma do gênero *Rhizobium multihospitium* (R82), para fins de comparação com os dados obtidos. Os isolados foram caracterizados morfologicamente e quanto ao uso de fontes de carbono. A partir das informações foram geradas matrizes de similaridade usando coeficiente de Jaccard, sendo gerados para os estados de Goiás, Minas Gerais e Paraná, dendrogramas de similaridade pelo método de agrupamento UPGMA, usando o software NTSYS-pc, versão 1.8. Obteve-se 523 isolados de nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro com predominância de isolados que acidificam o meio de cultivo e de crescimento rápido, sendo que os provenientes de solos de Araucária e Prudentópolis produzem maior quantidade de muco que os de Jussara, Nova Veneza, Uberlândia e Unaí. Os isolados de rizóbios obtidos de solos do estado de Goiás e Minas Gerais apresentam maior diversidade fenotípica do que aqueles oriundos de solos do Paraná. A análise de uso de fontes de carbono revela que os isolados de rizóbios obtidos de solos do estado de Goiás apresentam maior diversidade metabólica. De forma geral, o maior número de isolados agrupa com as estirpes referência, especialmente com as estirpes usadas como inoculante do feijoeiro comum (SEMIA 4080, SEMIA 4088 e SEMIA 4077), indicando que estes isolados apresentam características metabólicas semelhantes a estas estirpes.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*, fixação biológica de nitrogênio, características morfológicas, solos do cerrado, fontes de carbono.

¹ Orientadora: Prof.^a Dr.^a Eliana Paula Fernandes Brasil. EA-UFG.

ABSTRACT

SAMPAIO, F. B. **Rhizobia isolates captured by wild bean genotypes: obtaining, morphology and use of carbon sources.** 2013. 86 f. Dissertation (Master in Agronomy: Soil and Water)–Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.¹

The bean is a legume widespread throughout the country and an important source of protein in human food. Inoculation of legumes with rhizobia able to perform biological nitrogen fixation (BNF), has been widely discussed, based on studies indicating its feasibility for use in agriculture, since the BNF decreases partly environmental liabilities generated by high consumption of nitrogen fertilizer. The use of wild bean genotypes seeks greater diversity of rhizobia for isolation and study of the ability of BNF, which may result in greater specificity for symbiotic bean crop. The objective was to obtain and characterize the morphology and on the use of carbon sources captured populations of rhizobia in wild bean genotypes, soil from the states of Goiás, Minas Gerais and Paraná. Soil samples were collected from six areas in the depth of 0-20 cm for conducting chemical and physical analyzes and an test was conducted in a greenhouse in pots of 3 liters sterilized with 11 wild bean genotypes to obtain the isolates. Were obtained 523 isolates of rhizobia and selected 231 isolates, 76 of Goiás, Minas Gerais 99, and 56 of Paraná. A total of seven species of bacteria as reference strains, three of the genus *Rhizobium tropici* (SEMIA 4077, SEMIA 4080 and SEMIA 4088), three of the genus *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (BR266, BR351 and BR281) and one of the genus *Rhizobium multihospitium* (R82), for comparison with the data obtained. The isolates were characterized morphologically and on the use of carbon sources. From the information similarity matrices were generated using Jaccard coefficient being generated for the states of Goiás, Minas Gerais and Paraná, similarity dendrograms by UPGMA clustering method, using the software NTSYS-pc, version 1.8. The 523 isolates were obtained from nodules of wild bean genotypes with the predominance of isolates that acidify the culture medium and fast growth, and the solos from Araucária and Prudentópolis produce greater amount of mucus that of Jussara, Nova Veneza, Uberlândia and Unaí. The rhizobia isolates obtained from soils of Goiás and Minas Gerais exhibit greater phenotypic diversity than those from soils of Paraná. Usage analysis of carbon sources revealed that rhizobia isolates obtained from soils of Goiás have higher metabolic diversity. Overall, the largest number of isolates grouped with the reference strains, especially with the inoculant strains used as the common bean (SEMIA 4080, SEMIA SEMIA 4088 and SEMIA 4077), indicating that these isolates have metabolic characteristics similar to these strains.

Key words: *Phaseolus vulgaris*, biological nitrogen fixation, morphological, cerrado soils, carbon sources.

¹ Adviser: Prof.^a Dr.^a Eliana Paula Fernandes Brasil. EA-UFG.

1 INTRODUÇÃO

O feijão é um dos produtos agrícolas de maior importância econômica e social (Vieira et al., 1998) e, importante fonte de proteína na alimentação humana. A área cultivada com feijão na safra 2011/12 foi estimada em 3,26 milhões de hectares, 18,4% menor que na safra 2010/11 e, a produtividade média da safra nacional de feijão foi projetada em 890 kg ha⁻¹, 4,8% menor que na última temporada (Conab, 2012). O Brasil é o maior produtor mundial de feijão, de acordo com dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2012), e os maiores estados produtores são Paraná, Minas Gerais, São Paulo e Goiás.

Os solos sob vegetação de Cerrado são conhecidos pela sua baixa fertilidade natural, elevada saturação por alumínio e elevada acidez, exigindo a suplementação de nutrientes pela adubação, e correção da acidez para obtenção de altas produtividades. O uso de fertilizantes nitrogenados na agricultura é elevado, desde a Revolução Verde que, com o aumento da população, houve também aumento da produção de cereais associada a utilização, em doses elevadas, deste tipo de fertilizante (Marin et al., 1999).

A inoculação de plantas leguminosas com rizóbios, capazes de realizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN), tem sido amplamente discutida, com base em estudos que indicam a viabilidade de utilização na agricultura. Com a FBN ocorre uma relação benéfica tanto para a planta, que obtém o nitrogênio atmosférico (N₂) na sua forma prontamente absorvida (amônia – NH₃), quanto para a bactéria (rizóbio) que recebe os fotoassimilados para o seu metabolismo.

Com a descoberta da espécie *Rhizobium tropici*, associada ao feijoeiro, e com a seleção de estirpes mais eficientes, atualmente recomendadas, vem-se acumulando resultados experimentais positivos com a inoculação. Porém, apesar da inoculação de sementes de feijão não atender totalmente a exigência da planta por todo o nitrogênio (N) necessário ao seu desenvolvimento, deverá sempre ser adotada, devido ao processo de FBN. Este processo, além de seu fim específico, poderá favorecer a produção de substâncias estimulantes e protetoras do sistema radicular, além de promover a acidificação da rizosfera, favorecendo o aumento da absorção de micronutrientes catiônicos em ambiente ácido (Yamada et al., 2007).

A FBN torna-se de grande importância na agricultura, diminuindo em parte o passivo ambiental, gerado pelo elevado consumo de fertilizante nitrogenado, que além de consumir muito combustível para sua produção industrial, existem outros problemas como a contaminação da água e alimentos por NO_3^- e NO_2^- , toxicidade das plantas pela presença de altos níveis de NO_2^- nos solos, alteração no desenvolvimento das plantas pelo excesso de N e emissão de CO_2 contribuindo para o aquecimento global (Marin et al., 1999).

A adubação com N e outros nutrientes ou a utilização de solos de alta fertilidade nos programas de melhoramento genético do feijoeiro é prática comum. Isto pode ter direcionado a seleção de linhagens de feijoeiro mais responsivas e exigentes quanto à fertilidade do solo e, em contrapartida, com baixa capacidade de FBN. No entanto, a utilização de genótipos silvestres de feijoeiro pode minimizar este problema, pois estes não passaram por programas de melhoramento genético e cresceram em solos de origem. Com isso, pressupõe-se que há possibilidade de obter uma maior diversidade de rizóbios para isolamento e estudo da capacidade de FBN, o que poderá resultar em maior especificidade simbiótica para a cultura e eficiência em fixar N.

Segundo Vargas & Hungria (1997), estudos sobre a especificidade hospedeira de estirpes isoladas do feijoeiro e de leguminosas nativas da região dos Cerrados, forneceriam resultados interessantes sobre a amplitude de adaptação a diversos hospedeiros do rizóbio nativo da região. Diante da necessidade de aumentar a sustentabilidade da cultura do feijoeiro comum, foram fixadas três condições básicas no presente trabalho. A primeira foi o estudo da FBN no feijoeiro, com a caracterização morfológica e também quanto ao uso de fontes de carbono dos rizóbios obtidos; a segunda foi a seleção dos solos de diferentes locais, principalmente da região do cerrado, onde há grande produção dessa cultura; e a terceira, em uma leguminosa importante, o feijão, mas que não apresenta especificidade com uma determinada bactéria, estudando genótipos silvestres de feijoeiro.

O objetivo deste trabalho foi obter e caracterizar morfológicamente e quanto ao uso de fontes de carbono isolados de rizóbios capturados por genótipos silvestres de feijoeiro em casa-de-vegetação, de solos oriundos dos Estados de Goiás, Minas Gerais e Paraná.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CULTURA DO FEIJOEIRO COMUM: ASPECTOS HISTÓRICOS

O feijão está entre os alimentos mais antigos, remontando aos primeiros registros da história da humanidade. As ruínas da antiga Tróia revelam evidências de que os feijões eram o prato favorito dos guerreiros troianos. A maioria dos historiadores atribui a disseminação dos feijões no mundo em decorrência das guerras, uma vez que esse alimento fazia parte essencial da dieta dos guerreiros em marcha. Os grandes exploradores ajudaram a difundir o uso e o cultivo de feijão para as mais remotas regiões do planeta (Brasil, 2012).

Há várias hipóteses para explicar a origem das formas cultivadas e domesticadas do feijoeiro. Tipos selvagens, parecidos com variedades crioulas simpátricas, encontrados no México e tipos domesticados datados de cerca de 7.000 a.C. na Mesoamérica, suportam a hipótese de que o feijoeiro teria sido domesticado e transportado para a América do Sul. Outra hipótese é a de que o feijoeiro teria sido domesticado na América do Sul e transportado para a América do Norte, sendo que achados arqueológicos mais antigos (10.000 a.C.) de feijões domesticados na América do Sul (Peru) foram encontrados do que os da Mesoamérica. Dados mais recentes baseados em padrões eletroforéticos de faseolina (principal proteína de reserva do feijoeiro) sugerem a existência de dois centros primários de domesticação, Mesoamérica e Sul dos Andes (Araujo et al., 1996).

Diferentes tipos de feijões chegaram ao Brasil, possivelmente via três rotas distintas de introdução, uma, para os feijões pequenos, mesoamericanos, seria originária do México, seguindo para o Caribe, Colômbia, Venezuela e daí, ao Brasil. Uma segunda rota seria para os feijões grandes, como a cultivar Jalo, que deveria ser proveniente dos Andes (Peru); e uma terceira rota seria proveniente da Europa, com os feijões sendo trazidos por imigrantes que de lá vieram (introduções mais recentes), como o do feijão Carnaval, preferido por imigrantes italianos. Os tipos selvagens, sejam estes originários do México ou da Argentina, produzem híbridos viáveis com as formas cultivadas de *Phaseolus*

vulgaris, sendo, portanto, considerados como pertencentes à mesma espécie biológica (Araujo et al., 1996).

2.2 CULTIVO DO FEIJOEIRO COMUM

O gênero *Phaseolus* compreende muitas espécies, das quais apenas quatro são cultivadas: *Phaseolus vulgaris* L., *Phaseolus coccineus* L., *Phaseolus acutifolius* Gray var. *latifolius* Freem e *Phaseolus lunatus* var. *lunatus* (Araujo et al., 1996). Dentre as quatro espécies cultivadas, a mais importante é o feijoeiro comum, *Phaseolus vulgaris*, cuja área de distribuição e adaptação é a mais ampla. É a leguminosa de maior importância para consumo humano direto.

Conforme os dados registrados pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) (Salvador, 2012), a produção mundial de feijão em 2009 situou-se em torno de 20,6 milhões de toneladas. Os seis principais países produtores de feijão, que juntos são responsáveis por cerca de 61% da produção mundial, são: Brasil, Mianmar, Índia, China, Estados Unidos e México.

De acordo com a FAO (Salvador, 2012), a produção brasileira de feijão em 2009 foi de 3,5 milhões de toneladas. O Brasil é o maior produtor mundial de feijão (está incluída a produção de feijão caupi), e responde por 17% da produção mundial. Na segunda posição está Mianmar, 14%, e na terceira colocação, a Índia, 12%.

Como típico produto da alimentação brasileira, o feijão é cultivado por pequenos e grandes produtores em todas as regiões. Os estados com maiores produções são Paraná, que colheu 298 mil toneladas na safra 2009/2010, e Minas Gerais, com a produção de 214 mil toneladas no mesmo período (Mapa, 2012). A safra tem taxa anual de aumento projetada de 1,77%, de acordo com estudo da Assessoria de Gestão Estratégica do Ministério da Agricultura. Os dados também mostram crescimento no consumo, cerca de 1,22% ao ano, no período 2009/2010 a 2019/2020, passando de 3,7 milhões de toneladas para 4,31 milhões de toneladas (Mapa, 2012).

O feijão é um dos produtos agrícolas de maior importância econômica e social, além de sua relevância na dieta do brasileiro, em razão de ser cultivado em grandes áreas e pela mão-de-obra empregada durante o ciclo da cultura. Estima-se que a cultura do feijoeiro utiliza cerca de 7 milhões de homens dia⁻¹ em cada ciclo de produção (Vieira et al., 1998).

O feijoeiro é importante fonte de proteína na alimentação humana. Faz parte da maioria dos sistemas produtivos dos pequenos, médios e grandes produtores, devido a sua boa adaptação as mais variadas condições edafoclimáticas e a utilização de tecnologias mais avançadas, mais recentemente, sendo cultivado em todo o território nacional, em três safras (Araujo et al., 1996). Os pequenos produtores, que ainda usam baixa tecnologia e têm sua renda associada às condições climáticas, estão concentrados na produção das águas (primeira safra), e os médios e grandes produtores, que usam produção mais tecnificada, com alta produtividade, plantio irrigado por pivô-central, estão concentrados nas safras da seca e do inverno (segunda e terceira safra) (Embrapa, 2012).

A primeira safra, também conhecida como safra das águas, é plantada entre agosto e dezembro e concentra-se mais nos estados da região Sul (Araujo et al., 1996), Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, como também São Paulo e a região de Irecê na Bahia. A segunda safra ou, da seca, abrange todos os estados brasileiros, e seu plantio ocorre entre janeiro e abril (Araujo et al., 1996), sendo a maior parte produtores do Sul-Sudeste e é usada como rotação para as áreas de cultivo de soja e milho. Para os produtores do Norte, Centro-Oeste e Nordeste é a primeira e única safra do ano. Essa safra representa hoje 50% do total anual de feijão. A terceira safra, ou de inverno, concentra-se na região tropical, nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Bahia (Barreiras), plantada principalmente em junho-julho, sob sistema irrigado com pivô-central, atingindo alta produtividade e abastecendo o mercado entre o final da comercialização da segunda safra e início da primeira (Embrapa, 2012). Assim, durante todo o ano sempre haverá produção de feijão, em alguma região do país, contribuindo para a melhoria do abastecimento interno e consequente estabilidade nos preços (Araujo et al., 1996).

2.3 DISPONIBILIDADE DE NUTRIENTES MINERAIS PARA A CULTURA DO FEIJOEIRO COMUM

A correção da acidez do solo e a adubação das culturas são tidas como práticas comprovadamente indispensáveis ao manejo dos solos. Entre as tecnologias indicadas na produção de feijão, a calagem e a adubação nitrogenada são as que têm gerado maior número de questionamentos, sendo, quanto à calagem, em relação à eficiência de sua aplicação em superfície, e em relação ao nitrogênio, vão desde reações e mecanismos controladores da disponibilidade do N no solo, características e reações no solo das diferentes fontes de nitrogênio, até à prática da adubação (Embrapa, 2012).

O nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg) são elementos mais necessários para a garantia de boas produções para o feijoeiro (Roston, 1990). Um adequado fornecimento de N está associado à alta atividade fotossintética, ao crescimento vigoroso e às folhas de cor verde-escuras. Sua deficiência provoca pequeno desenvolvimento das plantas, as folhas tornam-se verde pálidas ou mesmo amareladas e poucas folhas desenvolvem-se (Vieira et al., 1998). Em virtude da possibilidade de lixiviação, tem-se evitado o emprego de altas doses de nitrogênio por ocasião da semeadura, recomendando-se o seu parcelamento, sendo aplicados em cobertura (Vieira et al., 1998).

A adubação nitrogenada deve ser realizada de modo a propiciar uma boa nutrição da planta na época em que ainda é possível aumentar o número de vagens/planta, isto é, até o início do florescimento (Carvalho et al., 2001). Estes autores, avaliando o efeito de fontes e do parcelamento de nitrogênio na produtividade de feijão de inverno, concluíram que o nitrogênio na semeadura e, ou, em cobertura não interferiu na produtividade do feijoeiro; e que a aplicação de 75 kg ha⁻¹ de nitrogênio propiciou, em média, incrementos de 38% na produtividade da cultura.

A baixa disponibilidade de fósforo, predominante na maioria dos solos, faz com que se analise mais atentamente as condições de meio mais adequadas para sua absorção e os diversos mecanismos reguladores do suprimento desse nutriente nos vegetais (Ruiz, 1986). Deficiências de P são frequentemente relatadas nas áreas produtoras de feijão na América Latina, e nos cerrados, a maioria dos solos apresenta baixo teor de P total e muito baixo de P disponível para as plantas. Existem várias recomendações para suprir as plantas com o P necessário, mas a simbiose com o feijoeiro é muito sensível a deficiência desse nutriente, que afeta: a sobrevivência do rizóbio, todos os estágios de formação dos nódulos e a atividade das enzimas relacionadas com a fixação biológica de nitrogênio (FBN) e assimilação do N₂ fixado. Uma das estratégias empregadas é a da busca de genótipos tolerantes a baixos níveis de P (Vargas & Hungria, 1997).

Os micronutrientes, ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu), manganês (Mn), boro (B), molibdênio (Mo) e cloro (Cl), são necessários em quantidades muito pequenas. Para algumas espécies, como o feijoeiro, o cobalto (Co) também é necessário (Embrapa, 2012).

A quantidade de fertilizantes na cultura do feijoeiro varia de acordo com a época de plantio, quantidade e tipo de resíduo deixado na superfície do solo pela cultura anterior, e com a expectativa de rendimento. Geralmente, varia de 60-150 kg ha⁻¹ de nitrogênio, sendo recomendado à aplicação em duas vezes; de 60-120 kg ha⁻¹ de P₂O₅,

dependendo, evidentemente, do teor disponível de fósforo no solo e da expectativa de rendimento de grãos e de 30-90 kg ha⁻¹ de K₂O, sendo a fonte de potássio, na maioria das vezes, o cloreto de potássio (60% de K₂O) (Embrapa, 2012).

2.4 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO (FBN) E A SIMBIOSE RIZÓBIO-LEGUMINOSA

O nitrogênio é geralmente considerado o fator mais limitante para o crescimento das plantas no ambiente natural, com exceção da água (Franco & Döbereiner, 1994). Além do carbono, oxigênio e hidrogênio, o nitrogênio é o nutriente mais abundante na matéria viva, participando na composição de moléculas de ácidos nucleicos, proteínas e polissacarídeos entre outras. Entretanto, apesar de ser requerido em quantidades significativas pelos seres vivos, na natureza este elemento é encontrado em abundância em uma forma quimicamente muito estável e, portanto, sua pronta assimilação pela maioria dos seres vivos é limitada, requerendo sua transformação para uma forma combinada que facilite sua assimilação (Marin et al., 1999).

Considerando que a atmosfera terrestre é composta por 78% de gás dinitrogênio (N₂), a introdução do N₂ nos ciclos biogeoquímicos deste elemento via fixação biológica de nitrogênio (FBN) tem efeitos positivos para o ambiente. Entretanto, a presença da tripla ligação N≡N é um problema básico para a sua fixação, pois os organismos que pertencem ao grupo dos eucariotos (plantas e animais), não conseguem utilizar o N₂ diretamente. Apenas uma porção dos organismos do grupo dos procariotos consegue converter ou reduzir enzimaticamente o nitrogênio da atmosfera (N₂) em amônia (NH₃), a qual pode ser incorporada para o crescimento e manutenção das células. Estes organismos são denominados diazotróficos e o mecanismo responsável pela fixação de nitrogênio à biomassa é chamado de fixação biológica de nitrogênio (FBN) (Marin et al., 1999).

O aumento da população mundial no último século foi suportada, primeiro, pelo processo de Haber-Bosch (que combina nitrogênio e hidrogênio, formando amônia ou produzindo outros compostos como ureia), sendo necessário cerca de 1,3 t de combustível fóssil para fixar 1,0 t de nitrogênio em alta pressão (35 a 100 Mpa) associada a alta temperatura (300°C a 400°C) (Marin et al., 1999).

Dentre os organismos que fixam nitrogênio (ou diazotrofos) muitos são heterótrofos, necessitando de um suplemento de carbono reduzido, o que depende

indiretamente da energia da luz e em geral requer uma simbiose com um hospedeiro eucarioto; ou são de vida livre, competindo com outros microrganismos pela matéria orgânica disponível no ambiente. Outros são autótrofos, os quais podem reduzir o CO₂ em presença da luz (Marin et al., 1999).

Evans & Burris (1992) caracterizam em três grupos de bactérias fixadoras de nitrogênio ou diazotrofos: diazotrofos de vida livre, que fixam o nitrogênio para seu próprio uso; diazotrofos associativos, que contribuem para o crescimento da planta sem a formação de estruturas diferenciadas, não estabelecendo uma simbiose e os diazotrofos simbióticos, que estabelecem uma interação muito estreita entre o macro e microsimbionte, e em alguns casos, são formadas estruturas diferenciadas denominadas nódulos.

Os diazotrofos de vida livre foram os primeiros a serem reconhecidos, como é o caso de *Beijerinckia fluminensis* e *B. indica*, isolada da rizosfera de plantas de cana-de-açúcar em solos tropicais, sendo demonstrado o seu potencial na associação com gramíneas. Microrganismos deste gênero são aeróbicos, quimioheterotróficos, podendo crescer em solos ácidos (pH entre 3 e 4). No entanto, bactérias de outras famílias e gêneros também são conhecidas na literatura como diazotrofos de vida livre. Segundo Baldani et al. (1997), a atual função das bactérias de vida livre na associação com as gramíneas é uma questão que ainda requer esclarecimentos. Entretanto, há um caso em que há uma forte evidência de que um diazotrofo de vida livre, *Azotobacter paspali*, contribua para a acumulação de nitrogênio na planta (Marin et al., 1999). Os resultados de Boddey et al. (1983), revelaram através da técnica de diluição isotópica do ¹⁵N que, em *Paspalum notatum* cv. *batatais* cerca de 20 kg de N/ha/ano foi derivado da FBN, devido a associação muito específica desta gramínea com o diazotrofo rizosférico *Azotobacter paspali*.

Dentro do grupo dos diazotrofos associativos existem os endofíticos facultativos e os endofíticos obrigatórios. Os endofíticos facultativos tem como grupo predominante o gênero *Azospirillum* e os microrganismos desse gênero colonizam tanto o interior quanto a superfície das raízes de várias gramíneas forrageiras e cereais. Segundo Baldani et al. (1997), embora várias características ecológicas e fisiológicas estejam sendo desvendadas, ainda falta conhecimento sobre o mecanismo envolvido na interação bactéria-planta e como ele contribui para o N acumulado nas plantas. Apesar das diferentes formas de interação estes diazotrofos quando estão em associação com gramíneas, garantem aumentos de 5% a 30% na produção.

Os endofíticos obrigatórios colonizam o interior das raízes. Essa característica, descoberta recentemente, parece ser a chave para explicar a contribuição da fixação de N₂

muito mais eficiente das associações endofíticas do que das rizosféricas, principalmente nos trópicos. Entre os diazotrofos endofíticos obrigatórios estão: *Acetobacter diazotrophicus*, *Azoarcus spp.*, *Herbaspirillum seropedicae*, *H. rubrisubalbicans*; e *Burkholderia spp.*. Além destes, outros diazotrofos são capazes de colonizar a endorizosfera e vasos do xilema. *Acetobacter diazotrophicus* é uma bactéria microaeróbia, capaz de crescer em baixo pH (5 ou menos), produzir ácido acético a partir do etanol, tolerar altas concentrações de sacarose (10%) e inibir parcialmente a fixação do íon amônio (NH_4^+), principalmente em altas concentrações de sacarose. É encontrada principalmente associada com plantas que contém alta concentração de açúcares, como cana-de-açúcar, batata-doce e capim cameroon, ocorrendo em grande número no interior do colmo da cana-de-açúcar. Outra característica única desta bactéria é a habilidade para excretar parte do nitrogênio fixado para o meio de cultura, e, resultados de Cruz et al. (1995) sugerem que a amônia (NH_3) é o produto excretado por *A. diazotrophicus* sob condições de fixação de nitrogênio.

Dentre os diazotrofos simbióticos, existem vários grupos de microrganismos capazes de fixar nitrogênio simbioticamente e, em alguns casos, observa-se a formação de estruturas diferenciadas. Em relação ao rizóbio, durante a sua associação com leguminosas de zonas temperadas e tropicais, são observadas estruturas chamadas nódulos. Atualmente, são conhecidos seis gêneros de diazotrofos da família *Rhizobiaceae*: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Allorhizobium* (Marin et al., 1999).

As bactérias pertencentes ao gênero *Rhizobium* são aeróbicas, gram-negativas, usualmente produzem poli- β -hidroxibutirato, são móveis e crescem em temperatura ótima de 25-30°C e pH 6-7. Algumas estirpes, porém, podem crescer em extremos de temperatura (4,0-42,5°C) e pH (4,5-9,5). São quimiorganotróficas, utilizando uma série de carboidratos e sais de ácidos orgânicos como fontes de carbono, sem a formação de gás; e não utilizam celulose e amido. Produzem uma reação ácida em meio contendo sais minerais e manitol ou outros carboidratos e reação alcalina oriunda de uma reação proteolítica. Sais de amônio, nitrato, nitrito e muitos aminoácidos podem servir como fontes de nitrogênio. Peptona é pobremente utilizada. Caseína e ágar não são hidrolizados (Jordan, 1984). As espécies pertencentes a este gênero são *R. leguminosarum*, *R. galegae*, *R. tropici*, *R. etli*, *R. gallicum* e *R. giardinii* e *R. hainanense* (Marin et al., 1999).

As bactérias fixadoras de nitrogênio que nodulam leguminosas cuja espécie hospedeira é *Phaseolus vulgaris* (feijão) pertencem ao Filo alfa-Proteobacteria, Ordem

Rhizobiales e Família Rhizobiaceae (Moreira & Siqueira, 2006). O Gênero *Rhizobium* compreende 8 espécies diferentes para esta leguminosa: *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*, *R. tropici*, *R. etli*, *R. giardinii*, *R. gallicum*, *R. mongolense*, *R. etli* bv. *mimosae* e *R. yanglingense* e o gênero *Sinorhizobium*, as espécies *S. fredii* e *S. americanum*. Também foram identificadas para esta espécie hospedeira (feijão), bactérias da Família *Xanthobacteraceae*, gênero *Azorhizobium*, espécie *A. doebereineriae*; e da Família *Phyllobacteriaceae*, gênero *Mesorhizobium*, espécies *M. loti* e *M. huakuii* (Moreira & Siqueira, 2006).

O gênero *Bradyrhizobium* possui características semelhantes ao gênero *Rhizobium* diferindo quanto à reação que ocorre em meio contendo sais minerais e manitol, a qual é alcalina e, que algumas estirpes podem crescer quimiolitotrophicamente na presença de H₂, CO₂ e baixos níveis de O₂ (Jordan, 1984), além do tempo de crescimento o qual é lento. A fonte de carbono preferida para muitas estirpes tem sido arabinose e este gênero possui três espécies: *B. japonicum*, *B. elkanii* e *B. lianingsense*, todos nodulando soja (*Glycine max*). Há ocorrência de nodulação em uma planta não-leguminosa denominada *Parasponia*, membro da família *Ulmanaceae*, com o gênero *Bradyrhizobium* (Marin et al., 1999).

O gênero *Azorhizobium* compreende apenas a espécie *A. caulinodans*, que é capaz de nodular raiz e caule de *Sesbania rostrata*. Este gênero difere de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* por não assimilar açúcares (exceto glicose). As células são gram-negativas, móveis e fixam nitrogênio atmosférico em condições de baixa quantidade de oxigênio, requerendo ácido nicotínico para esta fixação. Ácidos orgânicos como lactato ou succinato são os substratos favoritos como fonte de carbono para crescimento dependente de NH₄⁺ e N₂, sendo que malonato também é utilizado. Amido não é hidrolizado, não oxida manitol e nem desnitrifica. O crescimento ocorre de 12°C a 43°C e pH de 5,5 a 7,8, sendo que o crescimento pode ocorrer na presença de prolina (Dreyfus et al., 1988).

O gênero *Mesorhizobium* possui estirpes com células gram-negativas, aeróbicas, móveis (apresentam flagelo) podendo conter poli-β-hidroxibutirato. Todas as espécies assimilam glicose, raminose e sacarose metabolizando-os em produtos ácidos. O pH ideal para crescimento está entre 4,0 e 10,0 e temperatura entre 37°C a 40°C. Até o presente momento foram descritas as espécies *M. loti*, *M. huakuii*, *M. ciceri* e *M. mediterraneum*, *M. tianshanense*, *M. amorphi* e *M. plurifarum* (Marin et al., 1999).

No gênero *Sinorhizobium* as células usualmente contém grânulos de poli-β-hidroxibutirato, são gram-negativas, aeróbicas e móveis. A temperatura ótima de

crescimento varia entre 25°C e 30°C, mas muitas estirpes crescem a 35°C e outras a 10°C, o pH ótimo está entre 6 e 8, porém algumas estirpes crescem em pH=5 e outras em pH=10,5. As bactérias são quimiorganotróficas, utilizando uma série de carboidratos (mas não celulose e amido) e sais de ácidos orgânicos como fonte de carbono. Cloreto de amônio e nitrato ao invés de aminoácidos são preferidos como fonte de nitrogênio, mas algumas estirpes utilizam certos aminoácidos. Peptona não é muito utilizada e não ocorre a produção de 3-cetolactose a partir de lactose. Todas as estirpes requerem pantotenato e ácido nicotínico, mas suas reações a outras vitaminas são variáveis e todas produzem citocromo oxidase e catalase. As células produzem uma reação ácida em meio contendo sais minerais com várias carboidratos. O gênero possui as seguintes espécies: *S. meliloti*, *S. fredii*, *S. saheli*, *S. teranga* e *S. medicae* (Marin et al., 1999).

O novo gênero *Allorhizobium* está representado pela espécie *A. undicola*, bactéria fixadora de nitrogênio capaz de formar nódulos no caule de *Neptunia natans*, uma leguminosa tropical de ocorrência no Senegal. Foi demonstrado que este grupo é fenotipicamente e filogeneticamente separado das espécies descritas anteriormente, sendo o seu vizinho mais próximo, o *Agrobacterium vitis*, com 96,2% de homologia, deduzido pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. As células são gram-negativas, aeróbicas e móveis, quimiorganotróficas e utilizam uma série de ácidos orgânicos e aminoácidos como fonte de carbono para crescimento. Várias características discriminativas podem ser usadas para diferenciar *A. undicola* dos outros gêneros que nodulam as leguminosas. Em particular, o crescimento em adonitol, N-acetil-glucosamina, D-melibiose, D-rafinose, L-fucose, gluconato, butirato, glutarato, DL-glicerato, L-tartarato, citrato e L-ornitina. Entretanto, 3-cetolactose não é produzido a partir de lactose. Crescimento em meio contendo carboidrato é usualmente acompanhado pela produção de polissacarídeos. Estirpes de *A. undicola* podem também nodular *Medicago sativa*, *Acacia senegal*, *Acacia seyal*, *Acacia tortilis subsp. raddiana*, *Lotus arabicus* e *Faidherbia albida*, mas os nódulos nem sempre fixam nitrogênio (Marin et al., 1999).

Além dos rizóbios, bactérias do gênero *Frankia* também fazem simbiose com diversas plantas. E, uma outra simbiose de grande importância é a que ocorre entre as cianobactérias e várias plantas (Marin et al., 1999).

Bactérias pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium*, chamadas coletivamente de rizóbio, são capazes de se associar simbioticamente a diversas leguminosas e algumas não-leguminosas, formando estruturas altamente específicas, os nódulos, nos quais ocorre o processo de fixação

biológica de nitrogênio (Vargas & Hungria, 1997). Os nódulos são formados nas raízes, na maioria das simbioses conhecidas, com as bactérias já presentes no solo ou introduzidas pelos inoculantes.

A origem da simbiose rizóbio-leguminosa é muito questionada, sobretudo se o evento ocorreu em uma ou em múltiplas etapas, bem como, se existe alguma evidência para a co-evolução do hospedeiro e do microssimbionte (Vargas & Hungria, 1997). O agrupamento dos rizóbios foi inicialmente baseado em características fenotípicas, principalmente na habilidade de nodular determinadas leguminosas, dando origem ao conceito de grupos de inoculação cruzada, que resulta do princípio de que a infecção das plantas pelo rizóbio apresenta certa especificidade, como por exemplo, *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* nodula os trevos (*Trifolium spp.*) e *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* o feijoeiro (Fred et al., 1932).

Após cinquenta anos, Jordan (1984) reclassificou algumas espécies de rizóbio, considerando características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e genéticas, e separou as espécies de crescimento lento em meio de cultura específico em um novo gênero, *Bradyrhizobium* (bradus, do grego significa lento) (Vargas & Hungria, 1997). Segundo Silva et al. (2007), após 1982, os avanços de técnicas moleculares contribuíram para a descrição de seis gêneros, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* e *Allorhizobium*.

Com o estudo de vários isolados e o avanço nas técnicas de biologia molecular, rapidamente foi constatado que as bactérias que nodulavam o feijoeiro apresentavam características fisiológicas e genéticas distintas, permitindo a sua separação em dois grupos, denominados Tipo I e Tipo II (Martínez et al., 1987, citado por Vargas & Hungria, 1997). Essas diferenças levaram à definição de uma nova espécie, *R. tropici* (grego significa trópicos), em 1991, que incluiria as estirpes do Tipo II, e que foi subdividido em IIA e IIB.

As bactérias dessa nova espécie, *R. tropici*, foram descritas como aeróbias, gram-negativas, com bastonetes flagelados, sem a formação de esporos e tamanho de 0,5 µm a 0,7 µm por 1,5 µm a 2,0 µm. As colônias são circulares, convexas, semi-translúcidas, e, usualmente, apresentam diâmetro de 2-4 mm em dois a quatro dias em meio PY (peptona de caseína, 0,5%; extrato de levedura, 0,3%; CaCl₂, 10mM). O pH ótimo para crescimento varia de 5 a 7 e o crescimento pode ocorrer em temperaturas de até 40°C. Todas as estirpes são resistentes ao ácido nalidíxico. A estirpe IIB CIAT 899 (SEMIA 4077) foi designada como estirpe padrão e a estirpe representativa do grupo IIA é a CFN

299. A estirpe SEMIA4077 é resistente a metais pesados e aos antibióticos cloranfenicol, espectinomina, carbenicilina e estreptomicina (Martínez-Romero et al., 1991), e apresenta maior tolerância à acidez (Graham et al., 1994) e a temperaturas elevadas (Hungria et al., 1993).

Após a criação da espécie *R. tropici*, a designação *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* deveria ser usada somente para as estirpes que estivessem estreitamente relacionadas aos genes cromossomiais dos outros biovars desta espécie. A proximidade das estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* com bv. *viciae* e bv. *trifolii* resulta na possibilidade de fácil recombinação dos genes cromossomiais e de transferência de plasmídeos entre diferentes biovars ou biótipos. Além disso, os níveis de hibridização DNA-DNA são elevados e as sequências de nucleotídeos de um fragmento do gene 16 S rRNA são idênticas entre os três biovars. Os isolados desse gênero também mostraram baixo nível de polimorfismo e apresentaram similaridade, nos ensaios enzimáticos, com os outros dois biovars (Vargas & Hungria, 1997).

Algumas características fenotípicas e genotípicas diferenciam as estirpes de rizóbio que nodulam o feijão como: *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* é específica do feijoeiro e apresenta morfologia da colônia em meio YM transparente e úmida, temperatura máxima de crescimento *in vitro* de 35°C, e tolerância à acidez; enquanto que *R. tropici* tipo IIA e IIB não são específicas do feijoeiro, tem morfologia da colônia opaca e branca ou transparente e úmida, temperatura de 37°C a 40°C e maior tolerância à acidez (Vargas & Hungria, 1997).

Em estirpes de bactérias do gênero *Rhizobium*, os genes estruturais da nitrogenase e os genes determinantes de várias etapas da nodulação estão encerrados em um único plasmídeo, chamado de plasmídeo simbiótico (pSym). Já nas estirpes dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium*, as informações de modo geral estão encerradas somente no DNA cromossomal, embora algumas estirpes de *B. japonicum* também tenham megaplasmídeos. As estirpes de crescimento rápido parecem ser taxonomicamente mais diversificadas e ecologicamente mais adaptadas do que as de crescimento lento, provavelmente os principais genes ligados a FBN estão em plasmídeos, o que confere maior dinamicidade ao processo e, evidências para isso foram obtidas em estudos sobre tolerância a salinidade (Vargas & Hungria, 1997).

Ainda são desconhecidos todos os fatores que determinam a distribuição geográfica das espécies de rizóbio que nodulam o feijoeiro, mas a origem da disseminação da planta hospedeira deve estar relacionada a predominância da espécie de rizóbio, que

deve ser carregada com as sementes. A espécie *R. tropici* parece ser nativa da região tropical da América do Sul, sendo largamente encontrada no Brasil (Martínez-Romero et al., 1991). Em uma análise da população em solos cultivados com feijoeiro no estado do Paraná, foi constatado que em média, a população era constituída de 29% de rizóbio capaz de nodular somente o feijoeiro (*R. leguminosarum* bv. *phaseoli* ou *R. etli*), 25% capaz de nodular feijoeiro e leucena (*R. tropici* ou *R. etli*) e 46% capaz de nodular leucena (Hungria & Stacey, 1997). Entre isolados de solos da Bahia e do Espírito Santo, usando a leucena como planta recuperadora, 47,3% foram classificados como *R. tropici* IIA, 1,5% como *R. tropici* IIB e os demais como tipo I (*R. etli*) (Straliotto et al., 1995).

Em levantamento realizado em solos da região dos Cerrados, em que as estirpes foram isoladas de *Leucaena*, e depois, testadas para nodulação em feijoeiro, foi constatado que de 415 isolados, 83,6% pertenciam ao tipo IIA, portanto, *R. tropici* A e 16,4% ao tipo IIB, com base no crescimento em meio LB (triptona, 10 g; extrato de levedura, 5 g; NaCl, 3 g, pH 7,5) (Mercante, 1993). Entretanto, como foi utilizada somente a leucena como planta recuperadora, excluíram-se todos os rizóbios capazes de nodular apenas o feijoeiro, o que não permite conhecer a proporção entre as espécies de rizóbio do feijoeiro. Porém, como diversos parâmetros não são característicos das espécies, ainda existe muitas dúvidas sobre a distribuição dessas espécies na região dos Cerrados. Os isolados dos Cerrados, mesmo dentro de cada espécie, também se caracterizam por uma heterogeneidade elevada, avaliada em termos de perfil de proteínas do envelope celular e dos lipopolissacarídeos, perfil de DNA, tolerância à acidez e temperaturas elevadas, massa nodular e N total acumulado nas plantas (Vargas & Hungria, 1997).

Segundo Cardoso et al. (1992), a competitividade do microrganismo é uma propriedade que se refere à rapidez relativa, variável entre as espécies, em dominar os sítios de nodulação quando em presença de outras estirpes. Além disso, seja em ambiente estéril ou no solo, a proporção de nódulos formados por uma das estirpes dentro da mistura depende também da proporção relativa de cada uma no inóculo. No entanto, estirpes de alta competitividade podem ir perdendo essa propriedade, ao passo que outras com baixa ocupação inicial em uma área juntamente com outras estirpes, se adaptam e ressurgem com alta porcentagem nos nódulos.

Há relatos de nodulação do feijoeiro com estirpes de *Sinorhizobium meliloti*, *S. fredii* e por rizóbio isolado de diversas leguminosas florestais, e não só *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* como antigamente. Algumas estirpes também são capazes de nodular forrageiras como lótus, adubos verdes como *Canavalia* e espécies de *Vigna*. No caso de

Bradyrhizobium japonicum, há evidências de que a multiplicação no nódulo é importante para manter a população infectiva de rizóbio. Não foram conduzidos estudos semelhantes com o feijoeiro, mas é provável que a natureza promíscua das estirpes que nodulam o feijoeiro, ao contrário da soja, possa permitir a manutenção da infectividade pela nodulação de diversos hospedeiros (Vargas & Hungria, 1997).

Segundo Cardoso et al. (1992), a especificidade hospedeira é derivada da evolução conjunta da planta e da bactéria, ou seja, de um complexo conjunto de informações genéticas obedecido pelo mecanismo de reconhecimento entre a bactéria e a planta, a infecção e a formação dos nódulos. A especificidade pode ocorrer à nível de espécie ou de cultivares, e é maior entre as leguminosas de clima temperado do que entre as tropicais, mas, mesmo nestas, há ocorrência de grupos com alta especificidade.

O processo da nodulação envolve múltiplas etapas e a expressão de genes específicos da planta hospedeira e da bactéria. O processo tem início com a excreção, pela planta hospedeira, de compostos que facilitam a colonização rizosférica, e outros compostos exsudados pela planta, como aminoácidos, açúcares, ácidos orgânicos e metabólitos secundários, apresentam ação quimiotática sobre o rizóbio. O gradiente de umidade do solo influencia o movimento do rizóbio, facilitando sua aproximação até as raízes (Vargas & Hungria, 1997).

As células isoladas das bactérias aderem à superfície radicular, provavelmente, a sítios específicos e, a seguir, outras bactérias aderem às que já estão presas aos pêlos radiculares. Segundo Cardoso et al. (1992), em *R. leguminosarum* bv. *trifolii* foi demonstrado que a proteína trifolina produzida pelo trevo pode estar envolvida no processo de reconhecimento e aderência. Outra etapa da infecção, que ocorre simultaneamente com a adesão, são as trocas de sinais moleculares entre a planta hospedeira e o microssimbionte. Essa troca de sinais inicia com a exsudação pela planta de moléculas indutoras dos genes nod e que foram identificadas, em diversas leguminosas, como compostos fenólicos, flavonóides, e, para *S. meliloti*, também duas betaínas.

A sinalização molecular inicia com a exsudação, pelo feijoeiro, de uma série de compostos que induzem os genes nod comuns, em um processo que requer o gene regulatório nodD. No segundo passo da sinalização molecular, a indução dos genes nod conduz o rizóbio a sintetizar moléculas que são responsáveis por diversas alterações citológicas e fenotípicas das raízes, tais como, deformação e incremento do número dos pêlos radiculares, que são pré-estágios essenciais para a formação dos nódulos propriamente dita (Vargas & Hungria, 1997).

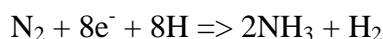
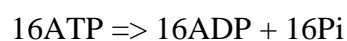
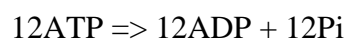
Na etapa seguinte, os rizóbios penetram na raiz, pela extremidade do pêlo radicular, por meio da invaginação da membrana do plasma, ao redor da qual a planta forma, por deposição de um material semelhante à parede celular, uma estrutura denominada cordão de infecção, na qual as bactérias proliferam. Ao mesmo tempo, as células do córtex externo, no caso do feijoeiro, começam a se dividir, formando o primórdio do nódulo. Os cordões de infecção penetram nas células desses primórdios, e no citoplasma as bactérias são liberadas envoltas em uma membrana e, em seguida, os primórdios diferenciam-se em nódulos e as bactérias diferenciam-se em bacteróides. Quando o nódulo está formado, são sintetizadas as enzimas relacionadas com a quebra da tríplice ligação do nitrogênio atmosférico e com a assimilação do nitrogênio fixado, iniciando-se o processo de fixação (FBN). A leghemoglobina é uma nodulina tardia importante no processo de formação do nódulo, responsável pelo controle da concentração de oxigênio nos nódulos (Vargas & Hungria, 1997).

A nitrogenase, ou dinitrogenase, é a denominação dada ao complexo enzimático, presente no rizóbio, responsável pela redução do N_2 a amônia. Esse complexo enzimático também é o responsável pela redução dos prótons de hidrogênio (H^+), resultando no gás hidrogênio (H_2), em um processo que ocorre concomitantemente com a redução do N_2 , com um gasto mínimo de 25% dos elétrons que, de outro modo, seriam utilizados para a redução do N_2 . Algumas bactérias possuem uma segunda enzima, a hidrogenase, capaz de oxidar parcial ou totalmente o H_2 evoluído, recuperando parte da energia perdida (Vargas & Hungria, 1997). Essa proteína, importante no transporte de oxigênio para a respiração dos bacteróides, mantém o oxigênio na forma associada, não permitindo a presença de oxigênio livre, que afetaria o funcionamento da nitrogenase (Cardoso et al., 1992).

Segundo os autores, cada célula vegetal pode conter milhares de bacteróides e o nódulo 1 milhão a 1 bilhão. A forma do nódulo depende da planta, podendo ser esférica, cilíndrica, multilobada ou coralóide. O tamanho também é relacionado a espécie da planta e a efetividade da simbiose. A posição do nódulo na raiz principal e/ou junto ao colo da planta indica uma formação precoce e efetiva, ao contrário da formação nas raízes secundárias que indica uma infecção tardia e/ou estirpes pouco competitivas ou pouco efetivas. Em solos com poucas células do rizóbio os poucos nódulos formados tendem a crescer ao máximo, pela exigência da planta em nitrogênio. Ao atingir o florescimento ou o final do ciclo da planta, os nódulos senescem e o pigmento da hemoglobina (vermelho) muda para cor verde ou castanha. Em condições de estresse ambiental, por exemplo, os

nódulos podem envelhecer precocemente. Em algumas espécies arbóreas ocorrem nódulos indeterminados ou perenes, cujo crescimento é contínuo e anual, e em geral, apresentam nódulos em forma coralóide. Em plantas anuais a persistência dos nódulos é variável, podendo durar todo o ciclo ou diversas camadas de nódulos se sucederem.

A nitrogenase é capaz de promover a reação que transforma o nitrogênio atmosférico em amônia, à temperatura ambiente e pressão normal, utilizando energia proveniente de processos foto ou quimiossintéticos ou obtida a partir de carboidratos (fermentação ou respiração) e armazenada sob a forma de ATP (Cardoso et al., 1992). Essa reação é descrita por:



A FBN necessita então da nitrogenase ativa, de suprimento de energia e geração de redutores. A nitrogenase ativa consiste em dois componentes proteicos, sendo uma proteína tetramérica com duas sub-unidades alfa e duas beta, contendo dois átomos de molibdênio e trinta e três átomos de ferro (MoFe-proteína); e um dímero proteico com duas sub-unidades gama e quatro átomos de ferro (Fe-proteína), chamado de nitrogenase redutase por transferir os elétrons para a MoFe-proteína. O ATP para suprimento de energia é produzido a partir da oxidação de substratos que podem ser provenientes da fotossíntese (nódulos de leguminosas e cianobactérias) ou então substratos disponíveis no ambiente (bactérias fixadoras de vida livre), sendo a natureza química destes substratos variável e dependente do microrganismo em questão. Algumas substâncias químicas passíveis de serem oxidadas por microrganismos fixadores de nitrogênio para obtenção de energia são: glicerol, acetaldeído, malonato, L-arabinose, frutose, glicose, chiro-inositol, mio-inositol, sacarose, trealose, entre outras (Neves & Rumjaneck, citado por Cardoso et al., 1992). Os doadores de elétrons para a nitrogenase são a flavodoxina e a ferredoxina, que recebem elétrons do NADH, o qual é reduzido a partir da oxidação de compostos de carbono, via cadeia respiratória ou via metabolismo anaeróbico.

2.5 FATORES ENVOLVIDOS NA EFICIÊNCIA DA FBN PELO FEJJOEIRO

Algumas observações, como resistência a algumas doenças e insetos, evidenciam que o processo de domesticação do feijoeiro pode ter sido restrito a poucas

plantas ou a uma parcela pequena da população de feijoeiros silvestres (Romero-Andreas et al., 1986). Assim, foi levantada a hipótese de que, durante o processo de domesticação do feijoeiro, teriam sido selecionadas certas características desejáveis, sendo acompanhadas de um processo indireto de seleção negativa em relação à capacidade de nodulação e FBN (Mytton, 1984). Um exemplo para isso é o da observação de que, em um mapa de ligação genética do feijoeiro, as regiões para expressão de nodulação abundante estavam associadas as regiões onde se expressa a suscetibilidade à *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, e conseqüentemente, a seleção para resistência à bacteriose seria negativa para a FBN (Nodari et al., 1993). Como há resultados indicando que existe grande potencial de nodulação e FBN em feijoeiros selvagens (Franco, 1993; Andriolo et al., 1994, citado por Vargas & Hungria, 1997), fica evidente que mais esforços deveriam ser tomados em programas de melhoramento que utilizem genótipos silvestres.

A competitividade das bactérias é influenciada pelos fatores abióticos do solo, que podem afetar tanto a população indígena do solo como as condições para o estabelecimento de novas estirpes. Tem sido atribuído à acidez do solo um papel relevante na competitividade, havendo algumas evidências de que a dominância das espécies em determinados solos esteja relacionada ao seu pH (Vargas & Hungria, 1997). Vargas & Graham (1989) descobriram que a estirpe tolerante a acidez *R. tropici* CIAT 899 (SEMIA 4077) era mais competitiva para formar nódulos em solos ácidos. O mesmo ocorreu com *R. tropici* CO5-I, cuja ocupação dos nódulos do feijoeiro diminuiu com a calagem de um solo que originalmente apresentava pH 5,3.

A região dos cerrados se caracteriza por solos extremamente ácidos e a maior ocupação dos nódulos por *R. tropici* também foi confirmada em um experimento em que *R. tropici* CIAT 899 foi capaz de formar até 91,4% dos nódulos, competindo com as estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* UMR 1135 e V23 (Vargas & Hungria, 1997). Diversos estudos tem mostrado que plantas em simbiose com rizóbio são mais suscetíveis aos fatores ambientais do que plantas recebendo N mineral, e plantas como o feijoeiro são mais sensíveis a estresses hídrico e térmico, salinidade, deficiências nutricionais.

Os solos da maioria das áreas produtoras de feijão da América Latina são caracterizados pela acidez elevada e o quadro característico resultante, com toxicidade por certos elementos e deficiência de diversos nutrientes, pode ser um fator crítico ao desempenho simbiótico das leguminosas. Os solos da região dos cerrados são particularmente ácidos, com pH médio de 5,0, alta toxicidade de Al e algumas vezes de Mn, além de apresentar baixos teores de Ca, Mg, P e micronutrientes. Como o processo de

FBN resulta em excreção de H^+ , os problemas relacionados à acidez podem ser agravados na rizosfera das leguminosas noduladas. Segundo Vargas & Hungria (1997), a acidez, além de prejudicar o crescimento da planta, afeta o rizóbio, em termos de sobrevivência, taxa de crescimento, morfologia, perda da infectividade e da eficiência simbiótica.

2.6 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ISOLADOS DE RIZÓBIOS

As características culturais e morfológicas das espécies bacterianas capazes de formar nódulos em leguminosas, genericamente identificadas como rizóbio, fornecem informações importantes para sua identificação e agrupamento (Martins et al., 1997). Os autores concluíram que as maiores diferenças encontradas são relativas ao tempo de crescimento associada com a alteração do pH do meio promovida pelas estirpes, à morfologia de colônia e, principalmente ao tipo de muco produzido.

A caracterização das estirpes de rizóbio é realizada em meio Yeast Mannitol Agar (YMA) (Fred & Waksman, 1928) com azul de bromotimol em pH ideal de 6,8 a 7,0, e comumente é realizada após o aparecimento de colônias isoladas, durante pelo menos uma semana. Os isolados podem ser cultivados também em meio YMA com vermelho congo, que é um corante com propriedades fungicidas e utilizado para facilitar a diferenciação entre rizóbio e contaminantes. O rizóbio crescente no meio rico é incapaz de absorver o corante, aparecendo com uma coloração rosada difusa (Martins et al., 1997).

2.6.1 Tempo de crescimento

As colônias de estirpes de rizóbio são diferenciadas com base no tempo de crescimento em rápidas, aquelas que produzem crescimento moderado e abundante em até três dias; intermediárias, entre quatro a cinco dias; lentas, aquelas que tem pouco crescimento em seis dias e crescimento moderado em nove dias; e muito lentas, aquelas que crescem a partir de dez dias (Martins et al., 1997). Segundo Marin et al. (1999) e Alves (2005), tradicionalmente, se tem dividido os rizóbios em grupos, de acordo com a velocidade de crescimento, como primeiro sugerido por Lonis & Hansen (1921), os de crescimento rápido (*Rhizobium*, *Azorhizobium* e *Sinorhizobium*), crescimento intermediário (*Mesorhizobium*) e crescimento lento (*Bradyrhizobium*).

Sprent (1994) sugeriu que bactérias de crescimento rápido são mais comuns em regiões áridas, porque a habilidade para fixar N_2 não é a maior prioridade para esses

microrganismos, mas sim a sua sobrevivência no solo. É possível que as condições específicas desta região tenham propiciado a seleção de uma alta incidência de rizóbio de crescimento rápido.

Segundo Freitas et al. (2007), todos os 24 isolados procedentes dos solos salinos, em trabalho de caracterização de rizóbios de jacatupé, uma leguminosa herbácea, no estado de Pernambuco, formaram colônias em menos de 24 horas e que caracteriza estirpes de crescimento rápido.

Segundo Marshall (1964), Bushby & Marshall (1977) e Van Rensburg & Strijdom (1980), as diferenças de comportamento apresentadas pelas diversas espécies de rizóbio em solos com baixa umidade, se devem a características relacionadas com o tipo de crescimento das bactérias, pois em um solo sob dessecação rápida o rizóbio de crescimento lento sobrevive melhor do que o de crescimento rápido, enquanto que em condições de dessecação lenta ocorre o inverso. Para Lovato (1984), tais observações indicam que os mecanismos de resistência estão ligados a características intrínsecas da estirpe, que se manifestam diferentemente conforme a taxa de perda de água pelas células.

Para Harris (1981), muitos microrganismos são capazes de ajustar seu potencial de água interno para equilibrar a tensão de água do solo pela acumulação compatível de solutos. Van Gestel et al. (1991) mostraram que as bactérias no solo desenvolvem estratégias para sobreviver em condições de estresse. O tipo e estado fisiológico dos microrganismos do solo influenciam sua suscetibilidade para as condições de seca, o que, provavelmente, está relacionado com as diferenças nas propriedades da parede celular. Nesse estudo de população de rizóbio, estes autores observaram que, em solos de áreas muito secas, a população de crescimento rápido apresenta resistências similares a dos demais microrganismos nativos (Martins et al., 1997).

Estirpes de crescimento rápido e lento tem muito pouco em comum, tanto fisiológica como bioquimicamente. Se um grupo evoluiu após o outro ou se ambos evoluíram independentemente, é difícil de responder, no entanto, existem teorias que propõem explicações. Uma teoria propõe que estirpes de crescimento rápido, produtoras de ácido, coevoluíram com as tribos mais avançadas de leguminosas adaptadas aos solos mais novos e alcalinos das regiões temperadas (Norris, 1965). Estas estirpes foram inicialmente descritas como mais evoluídas por causa de sua faixa simbiótica estreita e seu requerimento por pH alto do solo, disponibilidade de nutrientes e carbono. Esta teoria tem sido corroborada pela presença de intermediários evolucionários que possuem características comuns tanto as estirpes de crescimento lento quanto rápido (Tan &

Broughton, 1981; Bromfield & Kumar Rao, 1983). Contudo dados de taxonomia numérica sugerem que os dois grupos são muito diferentes entre si (Graham, 1964b). Se a aquisição de características de crescimento rápido é um processo de seleção natural às condições de clima temperado, não existe coerência nas observações que indicam uma maior resistência do rizóbio de crescimento rápido a condições extremas (Martins et al., 1997). No entanto, a sobrevivência de bactérias que nodulam raízes pode também ser dependente do pH do solo, textura, temperatura, teor de umidade e presença de organismos antagonistas.

Norris (1965) sugeriu que leguminosas que nodulam melhor em condições ácidas se associam preferencialmente com rizóbio de crescimento lento, que não produz ácido em meio de cultura, e que, as leguminosas adaptadas a pH neutro estão associadas com rizóbio de crescimento rápido, os quais geralmente produzem ácido. Tan & Broughton (1981) também observaram que as estirpes de crescimento rápido normalmente nodulam leguminosas de regiões temperadas e habitam solos neutros ou alcalinos. Martins (1995), citado por Martins et al. (1997), mostrou que os isolados que não alteraram o pH do meio (reação neutra) foram mais frequentes nas áreas onde os solos são geralmente neutros ou alcalinos (Sertão nordestino), do que nas áreas onde se encontram solos mais ácidos (Zona da Mata), e esta relação foi independente do tempo de crescimento em meio de cultura.

Bioquimicamente, rizóbios de crescimento lento e rápido diferem quanto ao metabolismo e excreção de vários compostos de carbono e nitrogênio. De modo geral, os rizóbios de crescimento rápido necessitam menos nitrogênio (tanto na forma de NH_4^+ ou de NO_3^-), P e K, do que os de crescimento lento. Ambas as classes de organismos absorveram mais NH_4^+ do que NO_3^- por célula (Tan & Broughton, 1982). Em relação às fontes de nitrogênio os rizóbios de crescimento lento metabolizam mais glutamato e α -ceto glutarato do que os rizóbios de crescimento rápido, enquanto que o manitol é utilizado do mesmo modo por ambos (Martins et al., 1997).

2.6.2 Alteração no pH do meio de cultura

Os rizóbios podem ser divididos em três classes quanto à alteração de pH produzida no meio de cultura: estirpes que acidificam o meio, estirpes que alcalinizam o meio e estirpes que não alteram o pH do meio de cultura (Martins et al., 1997). Em placas com meio YMA recém preparadas com azul de bromotimol, a coloração apresentada é verde e o pH em torno de 6,8.

Os rizóbios de crescimento lento tendem a alcalinizar o meio causando uma mudança na cor do indicador para azul, enquanto que os rizóbios de crescimento rápido geralmente acidificam o meio tornando-o amarelo. Essas mudanças podem ocorrer devido a utilização preferencial de açúcares pelas estirpes de crescimento rápido e consequente excreção de ácidos orgânicos, e, de compostos nitrogenados, pelas estirpes de crescimento lento e liberação de cátions; cuja diferenciação é observada em meio contendo manitol. Ao contrário do esperado, as estirpes produtoras de ácido em meio de cultura não são mais tolerantes a acidez do solo (Norris, 1965) mas, seu crescimento rápido parece conferir uma certa vantagem competitiva na região da raiz devido a maior competição com outros microrganismos.

Segundo Martins et al. (1997), essa vantagem competitiva pode ser explicada pela maior ou menor capacidade das estirpes em sobreviverem num determinado pH. Por exemplo, estirpes isoladas de solos ácidos que são capazes de excretar substâncias que alcalinizam o meio, enquanto que estirpes isoladas de solos alcalinos excretam substâncias que acidificam o meio, o que parece ser um mecanismo de adaptação a condições adversas. Posteriormente, esse autor sugeriu que se o rizóbio que nodula uma espécie de leguminosa é normalmente produtor de ácido, essa leguminosa deverá nodular com uma faixa estreita de estirpes e de modo geral será dificilmente nodulada em solos ácidos. Já Halliday (1978), constatou que a produção de ácido ou base é consequência da fonte de carbono e não uma característica intrínseca do rizóbio, sugerindo que o comportamento seja dependente do tipo de solo, e da quantidade e qualidade dos nutrientes disponíveis.

2.6.3 Morfologia das colônias

O diâmetro das colônias dos isolados que nodulam leguminosas é um parâmetro que pode ser correlacionado com outras características, uma vez que colônias puntiformes apresentam geralmente superfície seca ou produzem pequenas quantidades de muco. As colônias com diâmetro inferior a 1,0 mm costumam ser translúcidas e produzem pouco muco, enquanto que aquelas maiores do que 1,0 mm são geralmente produtoras de muito muco.

Medeiros et al. (2009) obtiveram um total de 304 isolados a partir de nódulos coletados em experimento com caupi, a maior parte apresentou tamanho classificado como puntiforme, borda homogênea e translúcida. Chagas Júnior et al. (2010), considerando os parâmetros morfológicos de vinte isolados nativos estudados de solos da Amazônia,

observaram que a maioria dos isolados formou colônias maior que ou igual a 2 mm de diâmetro. Vários autores (Soares et al., 2006; Frizzo, 2007; Freitas et al., 2007), obtiveram as características culturais da maioria dos isolados com diâmetro maior que 2 mm.

Em um trabalho avaliando a diversidade de *Pseudomonas fluorescentes* isoladas de trigo com base nas características morfológicas, Ferreira et al. (2009) observaram que nos isolados com tamanho de colônia inferior a 2 mm, foi comum a característica de pouca elasticidade, enquanto naqueles com colônias maiores que 2 mm o muco apresentou elasticidade.

Segundo Allen & Allen (1950), citado por Martins et al. (1997), existe uma correlação entre o tamanho da colônia do rizóbio e suas características na habilidade de fixar N₂ simbioticamente. Em um estudo envolvendo 17 isolados separados de *Rhizobium spp.*, Herridge & Roughley (1975), mostraram que isolados que formaram colônias grandes e mucóides foram simbioticamente ineficientes enquanto os que originaram colônias pequenas e secas foram simbioticamente eficientes. Em contraposição, Fuhrmann (1990), encontrou três tipos de colônias de isolados que nodulam soja em meio YMA: grande e produtora de muco tipo viscoso, grande e com muco aquoso (bastante coalescente) e pequena e seca. Os isolados que produziram colônias grandes e viscosas tenderam a fixar mais N₂ do que os que apresentaram colônias pequenas e secas, enquanto que os isolados que produziram colônias grandes e aquosas foram claramente inferiores (Martins et al., 1997).

2.6.4 Transparência e forma das colônias

A transparência é definida pela passagem da luz por meio da colônia. Os isolados caracterizados no trabalho de Martins (1995) variaram de opacos a translúcidos, em que a colônia compacta (opaca) não permite a passagem da luz e não evidencia o brilho característico das colônias translúcidas, caracterizadas pela passagem de luz. O muco coalescente ou aquoso está geralmente associado com colônias translúcidas, enquanto que aquelas com muco compacto e consistente foram caracterizadas como opacas (Martins et al., 1997).

A forma das colônias isoladas podem se apresentar de forma circular a irregular, e é depende do dia em que é realizada a caracterização e, principalmente, da consistência do muco produzido, ou seja, da intensidade da coalescência do muco. As colônias de forma puntiformes apresentam diâmetro inferior a 1,0 mm, ao passo que,

colônias com 1,0 mm de diâmetro geralmente são circulares e não coalescem. A maioria das colônias que variam de 1,0 até 2,0 mm são circulares, porém alguns grupos apresentam a forma irregular. A forma variável caracteriza a maioria das colônias com diâmetro maior do que 2,0 mm (Martins et al., 1997). Soares et al. (2006), trabalhando com a diversidade fenotípica de populações de bactérias nativas que nodulam o feijão, obtiveram as características culturais da maioria dos isolados com diâmetro maior que 2 mm.

Dependendo da consistência do muco são observados dois tipos principais: (1) colônias com muco tipo aquoso que forma colônias circulares no início do crescimento, se tornando irregulares pela coalescência do muco após este período inicial; (2) colônias que produzem quantidade abundante de muco consistente, em que a forma inicial é circular modificando-se com o passar dos dias, para a forma irregular. Geralmente, as estirpes de rizóbio, independente da forma da colônia, possuem a borda lisa ou inteira (Martins et al., 1997).

2.6.5 Superfície das colônias

As colônias isoladas normalmente são caracterizadas em secas ou mucóides quanto à superfície. Foi observada uma relação entre a superfície das colônias e as regiões de origem dos isolados por Martins (1996). Isolados de superfície mucóide foram encontrados indiscriminadamente em solos do Sertão, Agreste e Zona da Mata da região do Nordeste Brasileiro. Porém, os isolados de superfície seca, que são uma porcentagem menor do total de isolados, têm uma maior ocorrência nos solos do Sertão, caracterizada pelo clima semi-árido.

Segundo Freitas et al. (2007), a característica de alta produção de exopolissacarídeos vem sendo descrita por vários autores como um mecanismo envolvido no processo de adaptação e sobrevivência dos rizóbios em distintas condições edafoclimáticas, como, solos salinos (Xavier et al., 1998), condições de temperatura elevada (Osa-Afiana & Alexander, 1982) e em presença de actinomicetos produtores de antibióticos (Coutinho et al., 1999).

A falta de descrição de estirpes que produzem um excesso de exopolissacarídeos na literatura causou certa omissão sobre esse grupo de bactérias por bastante tempo, por acreditar tratar-se de contaminantes (Freitas et al., 2007). Entretanto, nos estudos de Sinclair & Eagleshan (1984) citado por Freitas et al. (2007), as estirpes que formaram exopolissacarídeos foram mais eficientes em fixar N_2 que aquelas que

produziam colônias secas sob condições salinas, uma vez que essa alta produção de mucosidade pode representar uma forma de proteção da bactéria aos estresses ocorridos.

Soares et al. (2006), avaliando a diversidade fenotípica de bactérias nativas em Perdões (MG), encontraram a maioria dos isolados com alta produção de goma, tempo de crescimento da colônia de dois a três dias, diâmetro maior que 2 mm, alteração do pH ácido e coloração das colônias amarela.

2.6.6 Produção, consistência e aparência do muco

Em relação à produção do muco pelas colônias isoladas de rizóbio, uma grande diversidade é encontrada. De modo geral, os isolados que não produzem muco são definidos como secos e os que produzem são caracterizados de acordo com os vários tipos de consistência: viscosa, viscosa de aparência floculosa, pegajosa, gomosa, aquosa e butírica. A consistência viscosa costuma ser bastante comum e é definida pela característica da colônia de grudar na alça de platina. A viscosidade é uma característica de isolados tanto lentos como rápidos, apresentando variações intrínsecas, como por exemplo, pouca, média e muita elasticidade do muco produzido (Martins et al., 1997).

O muco com consistência viscosa pode apresentar aparências diferentes, floculosa, gomosa, aquosa e leitosa. Alguns isolados com consistência viscosa apresentam um muco com aparência de leite coalhado que foi definido como tipo floculoso. Neste, a colônia apresenta inicialmente forma circular, mas aos poucos vai adquirindo forma irregular pela coalescência do muco produzido (Martins et al., 1997).

Chagas Júnior et al. (2010), considerando as características morfológicas de vinte isolados nativos estudados de solos da Amazônia, observaram que a maioria dos isolados apresentou forma circular e borda inteira da colônia, com elevação, transparente e homogênea e muco sem elasticidade e caracterizado como viscoso.

Os isolados de consistência aquosa são definidos pela capacidade de coalescência do muco que se espalha por toda a placa, chegando a cair nas tampas das placas que são incubadas de forma invertida. Geralmente, esses isolados possuem colônias translúcidas e confluentes onde as colônias se espalham e se juntam umas as outras. Elas costumam apresentar elevação plana, forma irregular e quantidade de muco variando de médio a abundante (Martins et al., 1997).

Ao contrário da característica aquosa, a consistência gomosa é aquela em que a colônia apresenta uma maior quantidade de massa bacteriana e, o muco, ao ser tocado com

a alça de platina, forma um fio parecido com um elástico. É característica principalmente em estirpes de crescimento rápido. Apresenta colônias com elevação, e em alguns casos, essas colônias gotejam nas tampas das placas que são incubadas invertidas. Já o muco butírico (semelhante à manteiga) se apresenta consistente, ou seja, não apresenta confluência, formando colônias semelhantes a pérolas, de cor creme, opacas, e sempre convexas (Martins et al., 1997).

A produção de muco analisada visualmente deve ser feita de forma comparativa com os demais isolados. Na maior parte das estirpes a quantidade de muco produzida coincide com o tempo de crescimento. Martins (1996) observou que as estirpes de crescimento rápido tiveram produção abundante de muco, enquanto que as de crescimento lento apresentaram produção média de muco e as de crescimento muito lento não produziram muco. Resultados semelhantes também foram descritos por Campêlo (1976), predominando a produção de muco nas estirpes de crescimento rápido. Freitas et al. (2007), estudando a caracterização de rizóbios isolados de jacatupé, no Estado de Pernambuco, encontraram isolados caracterizados, de forma geral com produção variável de exopolissacarídeos, bem como, colônias circulares, com diâmetro de 1 a 4 mm, bordas inteiras, homogêneas e de coloração branca.

Rizóbios do grupo caupi são nativos de solos tropicais, e tem sido sugerido que a produção de polissacarídeo (presente no muco) pode agir como uma barreira protetora contra fatores bióticos e abióticos, possibilitando a sobrevivência e persistência no solo. Resultados mostraram que estirpes de rizóbio deste grupo produtoras de muco viscoso quando crescidas em meio YMA foram mais resistentes a antibióticos do que estirpes que apresentam colônias secas (Martins et al., 1997). Segundo os autores, geralmente as estirpes produtoras de muco apresentam altos níveis de resistência a antibióticos.

O muco apresenta como componentes principais, os carboidratos EPS (exopolissacarídeos) e CPS (polissacarídeo capsular) que interferem na passagem de substâncias para dentro da célula bacteriana, embora o mecanismo de ação não seja ainda conhecido, mas é possível que haja alguma proteção contra a assimilação do antibiótico (Castellane, 2007). Outra característica que tem sido associada a produção de muco é a capacidade de sobrevivência a altas temperaturas (Martins et al., 1997).

A produção e consistência de muco deve ser considerada, portanto, uma característica importante para agrupar os isolados de rizóbio, lembrando que as informações sobre consistência de muco são obtidas a partir de meio de cultura, em que o carbono e o nitrogênio não devem estar limitando o crescimento celular, podendo ser

relacionado com a grande diversidade encontrada para estes microrganismos (Martins et al., 1997).

2.7 CARACTERIZAÇÃO QUANTO A UTILIZAÇÃO DE FONTES DE CARBONO DOS ISOLADOS DE RIZÓBIOS

A primeira etapa do processo de formação do nódulo inicia com a exsudação, pela planta hospedeira, de compostos que facilitam a colonização rizosférica, e outros compostos exsudados pela planta, como aminoácidos, açúcares, ácidos orgânicos e metabólitos secundários, que apresentam ação quimiotática sobre o rizóbio (Vargas & Hungria, 1997). Algumas substâncias são passíveis de serem oxidadas por microrganismos fixadores de nitrogênio para obtenção de energia, na forma de ATP (adenosina tri-fosfato). Grande parte dos processos metabólicos celulares requer ATP, o qual, em geral, é produzido à custa da oxidação de uma fonte de carbono (Darnell et al., 1990, citado por Castellane, 2007).

A sacarose é um tipo de glicídio formado por uma molécula de glicose e uma de frutose, produzida pela planta ao realizar o processo de fotossíntese. Os rizóbios são capazes de utilizar uma ampla variedade de carboidratos como glicose, galactose (hexoses), sacarose, lactose (dissacarídeos), arabinose, frutose (pentoses) (Alves, 2005).

Marinez-Drets (1974), citado por Martins et al. (1997), mostraram que a utilização de sacarose por estirpes de *Rhizobium* é dependente do tipo de crescimento do rizóbio. As diferenças metabólicas podem ser explicadas pela presença de uma invertase em estirpes de crescimento rápido e *Agrobacterium tumefaciens*, capaz de metabolizar a sacarose pela ausência dessa enzima e da sacarose fosforilase em estirpes de crescimento lento, o que torna inadequado o uso de sacarose para o crescimento de *Bradyrhizobium* (Martins et al., 1997; Alves, 2005).

As estirpes do gênero *Rhizobium* são de crescimento rápido e utilizam uma série de carboidratos como fontes de carbono, tais como: pentoses, hexoses, polióis, ácidos orgânicos, dissacarídeos e polissacarídeos, sem a formação de gás (Castellane, 2007). Além disso, segundo o autor, o crescimento em meio contendo carboidrato é usualmente acompanhado pela produção de goma.

Diversos estudos tem mostrado grande variabilidade na utilização de carboidratos pelos rizóbios. Idrissi et al. (1996), citado por Alves (2005), observaram que rizóbios nativos isolados de *Ceratonia siliqua* foram capazes de metabolizar uma grande

variedade de carboidratos como arabinose, xilose, galactose, glicose, frutose, manose, inositol, sorbitol, maltose, trealose, além do manitol.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE SOLO

As amostras de solo foram coletadas no período de setembro de 2011 a janeiro de 2012 em seis áreas dos cerrados, nos municípios de Jussara-GO (15°51'54"S, 50°52'05"W, 317 m de altitude), Nova Veneza-GO (16°22'15"S, 49°19'23"W, 806 m de altitude), Unaí-MG (16°21'27"S, 46°54'22"W, 575 m de altitude), Uberlândia-MG (18°55'08"S, 48°16'37"W, 863 m de altitude), Araucária-PR (25°32'22"S, 49°30'44,9"W, 922 m de altitude) e Prudentópolis-PR (25°11'11,9"S, 51°00'23"W, 777 m de altitude). As coletas foram realizadas na profundidade de 0-20 cm, com auxílio do trado holandês, e cada amostra composta foi constituída de dez simples.

As amostras foram enviadas para o Laboratório de Análises Agroambientais da Embrapa Arroz e Feijão. As características químicas (Tabela 1) e granulométricas (Tabela 2) das amostras de solo foram determinadas segundo a metodologia proposta em Embrapa (1997).

Tabela 1. Características químicas dos solos¹ coletados para a instalação do ensaio de obtenção de isolados de rizóbio em nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro, na camada de 0-20 cm de profundidade (Goiânia, 2013).

	pH	M.O.	P	K	Ca	Mg	Al	(H+Al)	Cu	Zn	Fe	Mn
Localidade	em água	g kg ⁻¹	..mg dm ⁻³mmol _c dm ⁻³mmol _c dm ⁻³mmol _c dm ⁻³mmol _c dm ⁻³mmol _c dm ⁻³mg dm ⁻³mg dm ⁻³mg dm ⁻³mg dm ⁻³
Jussara	6,4	23,3	50	119	9	3	0	5	1,7	0,6	24	27
NovaVeneza	4,8	11,1	2,2	69	23	9	2	50	5,8	8,5	23	31
Unaí	6,4	31,1	25,3	86	27	20	0	15	0,8	41,5	25	28
Uberlândia	6,7	10,6	30	56	17	11	0	5	2,0	21,3	26	14
Araucária	6,4	25,5	72	237	32	18	0	15	1,0	3,5	31	34
Prudentópolis	5,2	63,2	18,2	367	40	20	2	112	1,3	5,1	32	39

¹ Matéria orgânica (M.O.): método de Walkley & Black (1934); fósforo (P) e potássio (K): extração com a solução de Mehlich 1 (HCl a 0,5 N + H₂SO₄ a 0,025 N) e determinação, respectivamente, em colorímetro e fotômetro de chama; cálcio (Ca²⁺) e magnésio (Mg²⁺): extração em KCl a 1N e determinação por titulação de EDTA; micronutrientes: cobre (Cu), zinco (Zn), ferro (Fe) e manganês (Mn): determinação em espectrofotômetro de absorção atômica utilizando-se o extrator Mehlich 1; acidez potencial (H⁺ + Al³⁺): determinação por titulometria, usando-se solução de acetato de cálcio 1N a pH 7 para sua extração.

Tabela 2. Características granulométricas dos solos coletados para a instalação do ensaio de obtenção de isolados de rizóbio em nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro, na camada de 0-20 cm de profundidade (Goiânia, 2013).

Localidade	Argila	Silte	Areia	Classe Textural
g kg ⁻¹			
Jussara	140	2	858	Areia franca
Nova Veneza	620	62	318	Muito argiloso
Unai	320	122	558	Franco argilo arenoso
Uberlândia	220	62	718	Franco argilo arenoso
Araucária	460	82	458	Argila
Prudentópolis	460	222	318	Argila

3.2 OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE RIZÓBIO

Os genótipos silvestres de feijoeiro utilizados foram: 1- G23499A, 2- G23490, 3- G23500A, 4- G12912, 5- G23475, 6- G12858, 7- G23460, 8- G12904, 9- PHA VUL 8169B, 10- PHA VUL 8141 e 11- PHA VUL 8122 (Figura 1).

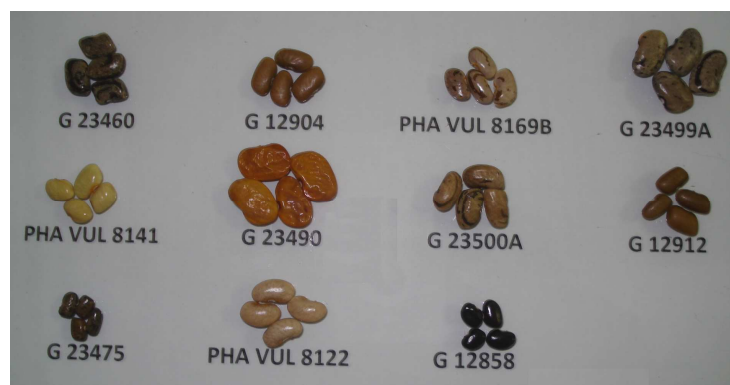


Figura 1. Sementes dos genótipos silvestres de feijoeiro utilizados como planta-isca em ensaio para obtenção de isolados de rizóbios.

Para a obtenção dos isolados de rizóbios foi realizado um ensaio em casa-de-vegetação utilizando vasos de três litros esterilizados preenchidos com solo coletado das seis áreas em estudo, com quatro sementes de cada genótipo silvestre de feijoeiro, sendo duas sementes por vaso. As sementes de feijoeiro silvestre foram selecionadas, escurificadas com lixa, e esterilizadas com álcool 70% por cinco minutos, solução de hipoclorito de sódio por três minutos, e lavagem em água estéril por um minuto (em cinco

vezes), realizada em câmara de fluxo laminar. Em seguida as sementes foram colocadas em papel estéril umedecido para pré-germinação em germinador a 25°C por dois a três dias e foram semeadas em vasos esterilizados com capacidade para três litros (Figura 2). Após trinta dias da semeadura, as plantas foram coletadas e os nódulos formados nas raízes foram mantidos em frascos hermeticamente fechados contendo sílica gel por um período máximo de uma semana. O objetivo da esterilização dos materiais utilizados é a obtenção de isolados de rizóbios presentes nos solos em estudo.



Figura 2. Ensaio em casa-de-vegetação da Embrapa Arroz e Feijão com genótipos silvestres de feijoeiro em solo coletado de seis localidades dos Estados de Goiás, Minas Gerais e Paraná.

Dez nódulos obtidos a partir de cada genótipo foram selecionados para o isolamento de rizóbios. Os nódulos obtidos foram reidratados por um minuto e esterilizados com álcool 70% por três minutos, hipoclorito de sódio por três minutos, e lavados em água estéril por um minuto (em dez vezes), realizada em câmara de fluxo laminar. A obtenção dos isolados foi realizada utilizando meio Yeast Mannitol Agar (YMA) (Fred & Waksman, 1928), em pH ideal de 6,8 a 7,0 em placas de Petri, com azul de bromotimol como indicador, de acordo com a metodologia descrita por Hungria (1994).

As placas foram incubadas em estufa a 28°C até o aparecimento de colônias, quando, então, foram repicadas e novamente incubadas, até a obtenção de colônias puras, ou seja, livres de contaminação. As placas foram observadas diariamente até o aparecimento de colônias isoladas contando-se o mesmo número de dias para se proceder à caracterização morfológica. Foram obtidos 523 isolados de rizóbios, sendo 90, 55, 89, 119, 103 e 67 isolados de rizóbios oriundos dos municípios de Jussara, Nova Veneza, Uberlândia, Unai, Araucária e Prudentópolis, respectivamente.

3.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS ISOLADOS DE RIZÓBIO

Os 523 isolados obtidos foram caracterizados morfolologicamente. Essa caracterização foi feita com base nas características morfológicas da colônia: velocidade de crescimento (rápido- um dia, normal- dois dias e lento- três dias), pH (ácido, alcalino e neutro), tamanho (1-2 ou >2 mm), aparência (heterogêneo ou homogêneo), borda (inteira ou irregular), forma (circular ou irregular), elevação (elevado ou plano), cor (abóbora, amarela, branca e creme); e da massa celular: transparência (opaco ou translúcido), quantidade (muito pouco, pouco, médio, muito e muitíssimo), elasticidade (pouca, média e muita), consistência do muco (aquoso, butírico, floculoso, leitoso e seco), com base nas informações de Martins et al. (1997). Foi realizada análise exploratória com os dados dos isolados obtidos, empregando-se a análise estatística univariada, com tabulação dos dados em gráficos de frequência.

Após a caracterização morfológica, os isolados foram repicados para tubos de ensaio contendo meio YMA inclinados e após o aparecimento de abundante massa celular, foi adicionado glicerol autoclavado, visando à formação de uma barreira que impedisse o fluxo de oxigênio para as culturas estocadas. Os isolados foram repicados também para tubos eppendorf (1,5 mL) contendo 0,5 mL de meio de cultura YMA líquido e 0,5 mL de glicerol, visando a conservação dos isolados sob refrigeração, sendo todo o material previamente autoclavado.

A partir dos dados da caracterização morfológica, preparou-se uma matriz binária de dados, usando 0 (zero) para a ausência da característica e 1 (um) para a presença. Esta foi utilizada para calcular a matriz de similaridade entre os isolados pelo coeficiente de Jaccard; sendo gerados para os estados de Goiás, Minas Gerais e Paraná, dendrogramas de similaridade pelo método de agrupamento UPGMA (Unweighted pair-group method), usando o software NTSYS-pc, versão 1.8 (Rohlf, 1993).

A partir dos dendrogramas foi selecionado pelo menos um isolado de cada grupo (ramificação), para elaboração de outros dendrogramas de similaridade para as características morfológicas, obtendo um total de 231 isolados, sendo 76 de Goiás, 99 de Minas Gerais e 56 do Paraná. Foram utilizadas sete espécies de bactérias como estirpes de referência oriundas da coleção Embrapa Agrobiologia, sendo três do gênero *Rhizobium tropici* (SEMIA 4077, SEMIA 4080 e SEMIA 4088), três do gênero *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (BR266, BR351 e BR281) e uma do gênero *Rhizobium multihospitium* (R82), para fins de comparação com os dados obtidos.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS DE RIZÓBIO QUANTO À UTILIZAÇÃO DE FONTES DE CARBONO

Os isolados selecionados para caracterização morfológica juntamente com as estirpes padrão de *Rhizobium tropici* (SEMIA 4077, SEMIA 4080 e SEMIA 4088), *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (BR266, BR351 e BR281) e *Rhizobium multihospitium* (R82) foram caracterizados também quanto ao uso de fontes de carbono, sendo utilizadas como fontes de carbono: sacarose, glicose, ácido málico, ácido maléico, ácido nicotínico, inositol, sorbitol, arabinose, frutose e glicerol.

Para a realização da caracterização de uso de fontes de carbono, foram colocados 5 mL de meio YMA líquido em tubos de penicilina, os quais foram tampados e esterilizados em autoclave. De cada isolado selecionado e das estirpes padrão foram colocadas duas alças nos tubos de penicilina e colocados para incubar sob agitação (150 rpm, 28°C, 48 h). Um tubo de penicilina somente com meio de cultura (controle) também foi colocado para incubar sob agitação, para conferir ausência de contaminação.

O preparo das placas de Petri foi realizado em câmara de fluxo laminar, com 40 mL de meio de cultura YMA (sólido e sem fonte de carbono - sulfato de amônio) medidos em uma proveta de 100 mL e transferidos para um erlemeyer, sendo adicionados 400 µl da fonte de carbono e passados para a placa de Petri, devidamente etiquetada. Esse procedimento foi realizado para cada placa com uma diferente fonte de Carbono.

Após o crescimento dos isolados incubados sob agitação, uma alíquota de 200 µl de cada isolado foi transferida para placa de 96 poços e, com auxílio de um carimbo replicador, os isolados foram inoculados em dez placas de Petri contendo meio YMA e uma diferente fonte de carbono por placa, a qual foi adicionada no preparo das placas. Em seguida, as placas foram colocadas para incubar a 28°C. A verificação do crescimento dos isolados nas diferentes placas contendo fontes de carbono distintas foi realizada após 48 h de incubação, por um período de 96 h (Figura 3). Após o crescimento dos isolados incubados sob agitação em meio de cultura YMA líquido, uma alíquota de 0,5 mL de cada isolado foi transferida para tubo eppendorf e adicionados 0,5 mL de glicerol (30%) autoclavados, visando a sua conservação em refrigerador.



Figura 3. Placas de Petri exemplificando a habilidade de isolados de rizóbios quanto à utilização de diferentes fontes de carbono, obtidos de nódulos em genótipos silvestres de feijoeiro.

A partir das informações do uso de fontes de carbono pelas bactérias, foi montada uma matriz binária usando 0 (zero) para a ausência de crescimento e 1 (um) para a presença de crescimento. A partir dessa matriz binária foi gerada uma matriz de similaridade usando coeficiente de Jaccard, sendo gerados para os estados de Goiás, Minas Gerais e Paraná, dendrogramas de similaridade pelo método de agrupamento UPGMA, usando o software NTSYS-pc, versão 1.8 (Rohlf, 1993).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DE ISOLADOS DE RIZÓBIO OBTIDOS EM GENÓTIPOS SILVESTRES DE FEJJOEIRO

A partir dos nódulos coletados no experimento com genótipos silvestres de feijoeiro, foram obtidos 523 isolados com características típicas de rizóbio. Destes, 90 isolados foram obtidos do solo coletado no município de Jussara, 55 de Nova Veneza, 89 de Uberlândia, 119 de Unaí, 103 de Araucária e 67 de Prudentópolis. O menor número de isolados obtidos de Nova Veneza e Prudentópolis pode ser devido ao menor pH destes solos em relação aos outros em estudo, demonstrados na análise química (4,8 e 5,2), visto que, a competitividade das bactérias em dominar os sítios de nodulação é influenciada pelos fatores abióticos do solo, que podem afetar tanto a população nativa do solo como as condições para o estabelecimento de novas estirpes (Vargas & Hungria, 1997).

Considerando o solo de Jussara, de acordo com as características morfológicas, a maior parte em porcentagem dos isolados acidificou o pH do meio de crescimento (93%), apresentou velocidade de crescimento em dois dias (67%), formou colônias com tamanho maior que 2 mm (74%), coloração amarela (70%), aparência heterogênea (81%), borda inteira (97%) e forma circular (79%), e quantidade de muco produzido médio (53%), com pouca elasticidade (92%) e opaco (96%) (Figura 4).

A maioria dos isolados em porcentagem obtidos do solo de Nova Veneza mostrou diferenças em relação ao solo de Jussara, pois não alterou o pH do meio de cultivo (neutro) (56%), apresentou colônias de cor creme (53%) e produziu pouco muco (47%) (Figura 5). Além disso, a maioria dos isolados de Nova Veneza apresentou velocidade de crescimento normal (51%), colônias superiores a 2 mm de diâmetro (55%), de aparência heterogênea (58%), borda inteira (89%) e forma circular (75%), e muco opaco (91%) e com pouca elasticidade (98%) (Figura 5).

Em relação ao solo de Uberlândia, a maior parte em porcentagem dos isolados acidificou o meio de cultivo (87%), apresentou crescimento em dois dias (70%), colônias com diâmetro maior que 2 mm (70%), de coloração amarela (64%) e heterogênea (65%),

borda inteira (98%) e forma circular (76%), e quantidade de muco produzido médio (64%), com pouca elasticidade (90%) e opaco (82%) (Figura 6).

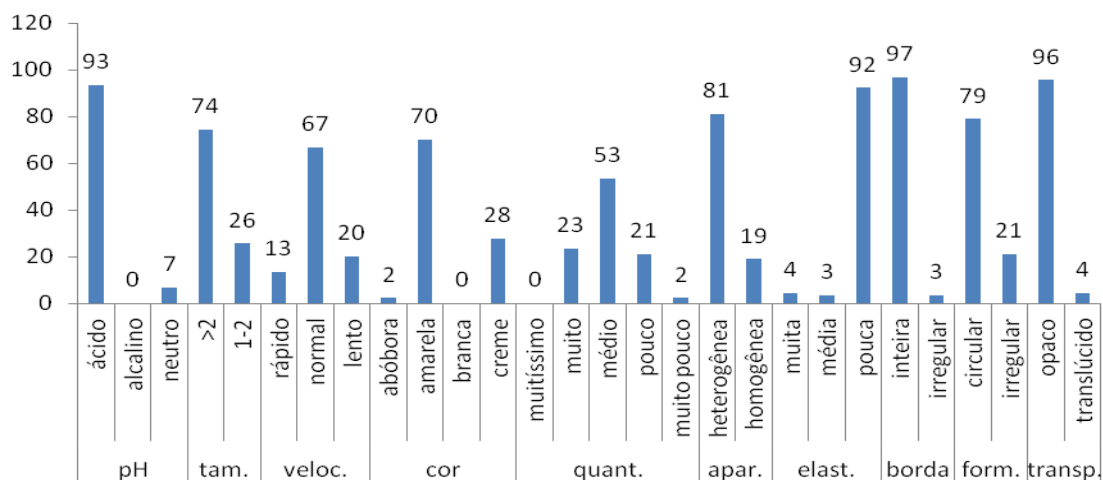


Figura 4. Porcentagem dos isolados de rizóbios obtidos de nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro em solos do município de Jussara, quanto às características morfológicas avaliadas de alteração de pH; tamanho das colônias; velocidade de crescimento (rápido-1 dia, normal-2 dias e lento-3 dias); cor das colônias; quantidade de muco produzida; aparência das colônias; elasticidade do muco; tipo de borda; forma e transparência das colônias.

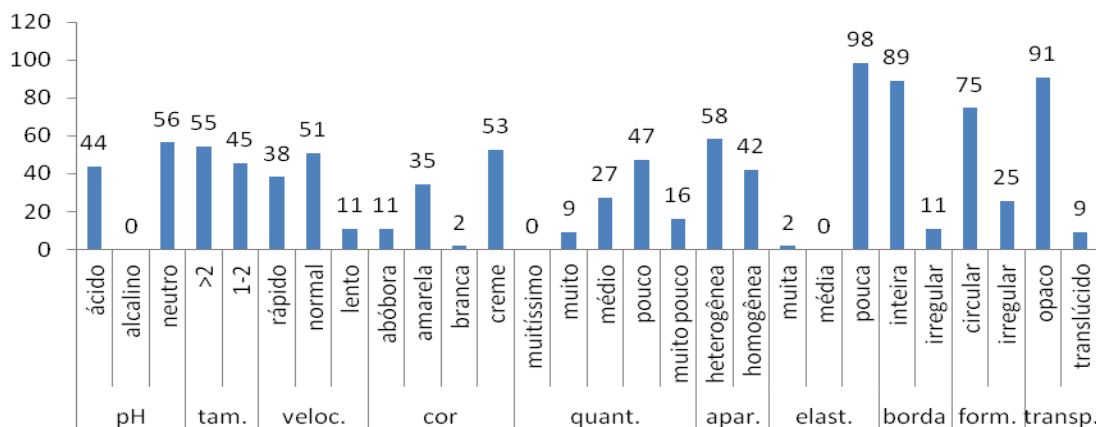


Figura 5. Porcentagem dos isolados de rizóbios obtidos de nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro em solos do município de Nova Veneza, quanto às características morfológicas avaliadas de alteração de pH; tamanho das colônias; velocidade de crescimento (rápido-1 dia, normal-2 dias e lento-3 dias); cor das colônias; quantidade de muco produzida; aparência das colônias; elasticidade do muco; tipo de borda; forma e transparência das colônias.

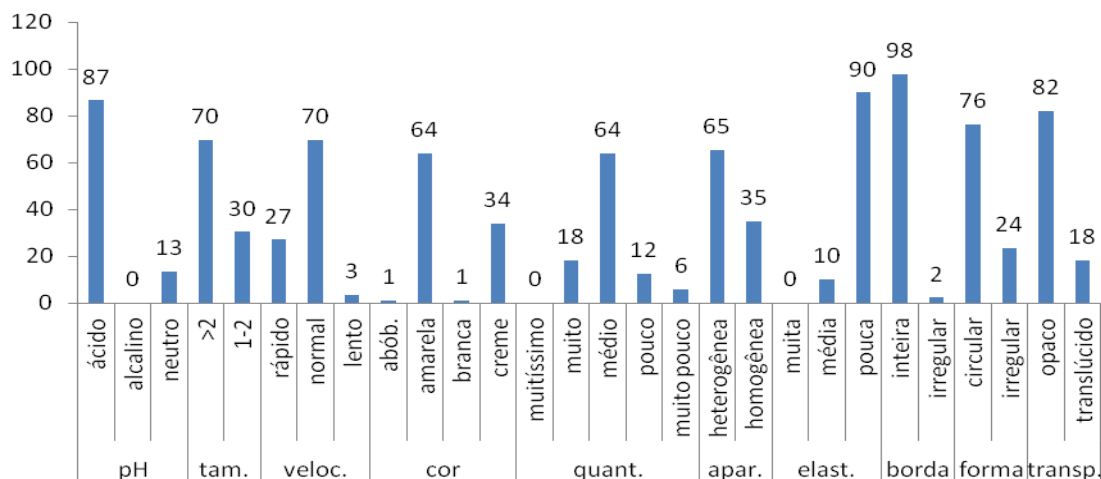


Figura 6. Porcentagem dos isolados de rizóbios obtidos de nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro em solos do município de Uberlândia, quanto às características morfológicas avaliadas de alteração de pH; tamanho das colônias; velocidade de crescimento (rápido-1 dia, normal-2 dias e lento-3 dias); cor das colônias; quantidade de muco produzida; aparência das colônias; elasticidade do muco; tipo de borda; forma e transparência das colônias.

Quanto ao solo de Unaí, a maioria dos isolados em porcentagem acidificou o meio de cultivo (66%), apresentou crescimento em dois dias (68%), colônias com diâmetro maior que 2 mm (67%), de coloração amarela (47%), aparência heterogênea (72%), borda inteira (99%) e forma circular (85%), e produziu média quantidade de muco (50%), com pouca elasticidade (96%) e opaco (70%) (Figura 7).

Considerando o solo de Araucária, a maioria dos isolados em porcentagem apresentou pH ácido do meio de cultivo (90%), tempo de crescimento em dois dias (97%), formou colônias com diâmetro maior que 2 mm (92%), com coloração amarela (88%) e aparência heterogênea (91%), com borda inteira (97%) e forma circular (84%), e produziu quantidade de muco classificado como muito (57%), com pouca elasticidade (98%) e opaco (94%), diferindo dos outros solos em estudo devido a maior quantidade de muco produzido pela maioria dos isolados (Figura 8). Além disso, observou-se outra diferença quanto ao solo de Araucária, de que um isolado obtido alterou o pH do meio de cultivo para alcalino, ao contrário da maioria que acidificaram o meio ou não promoveram alteração (Figura 8).

Em relação ao solo de Prudentópolis, a maioria dos isolados em porcentagem acidificou o meio de cultivo (96%), apresentou tempo de crescimento normal (85%) e formou colônias com tamanho maior que 2 mm (70%), porém, de coloração creme (72%) e aparência homogênea (72%), diferindo da maioria dos isolados obtidos de Araucária. Além

disso, a maior parte dos isolados de Prudentópolis formou colônias com borda inteira (100%) e forma circular (66%), e produziu muita quantidade de muco (55%), com pouca elasticidade (91%) e opaco (96%) (Figura 9).

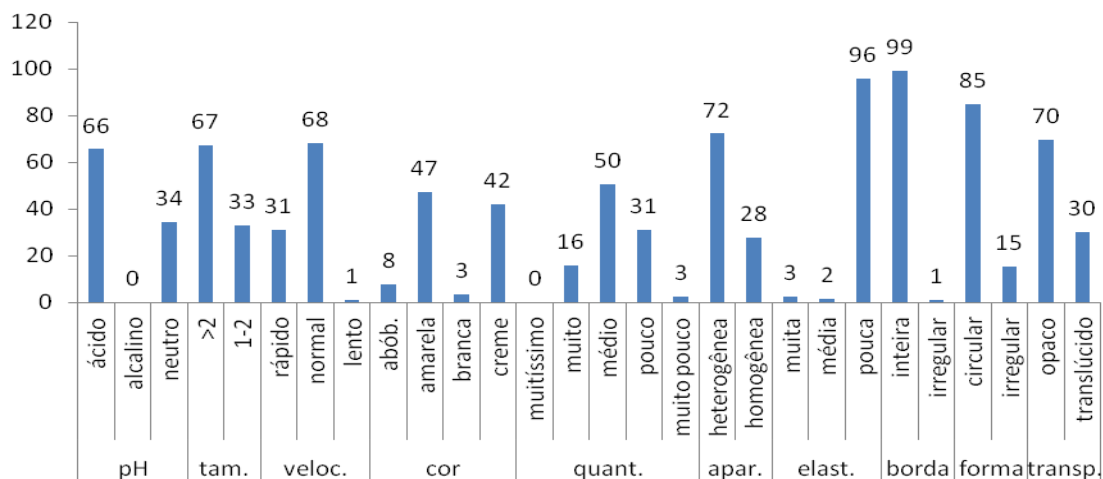


Figura 7. Porcentagem dos isolados de rizóbios obtidos de nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro em solos do município de Unaí, quanto às características morfológicas avaliadas de alteração de pH; tamanho das colônias; velocidade de crescimento (rápido-1 dia, normal-2 dias e lento-3 dias); cor das colônias; quantidade de muco produzida; aparência das colônias; elasticidade do muco; tipo de borda; forma e transparência das colônias.

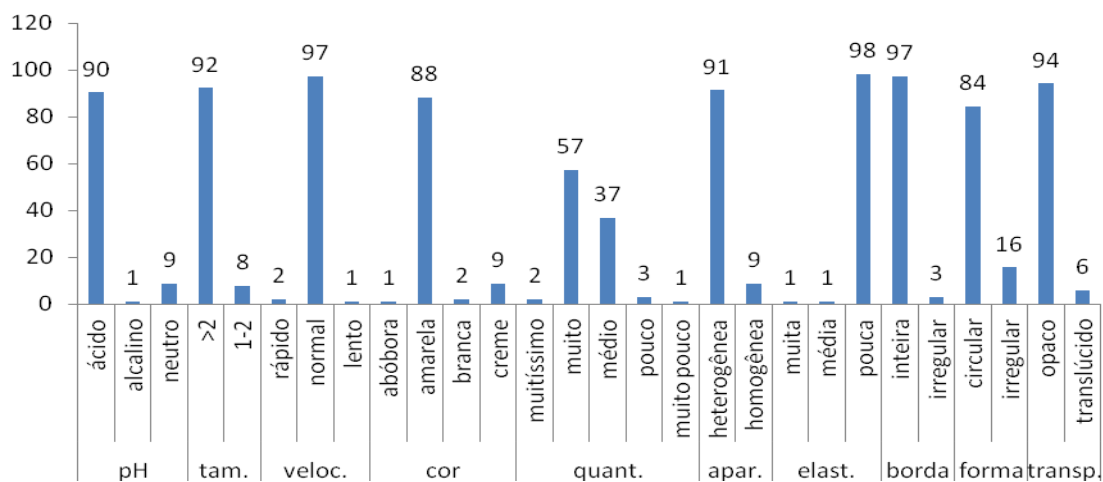


Figura 8. Porcentagem dos isolados de rizóbios obtidos de nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro em solos do município de Araucária, quanto às características morfológicas avaliadas de alteração de pH; tamanho das colônias; velocidade de crescimento (rápido-1 dia, normal-2 dias e lento-3 dias); cor das colônias; quantidade de muco produzida; aparência das colônias; elasticidade do muco; tipo de borda; forma e transparência das colônias.

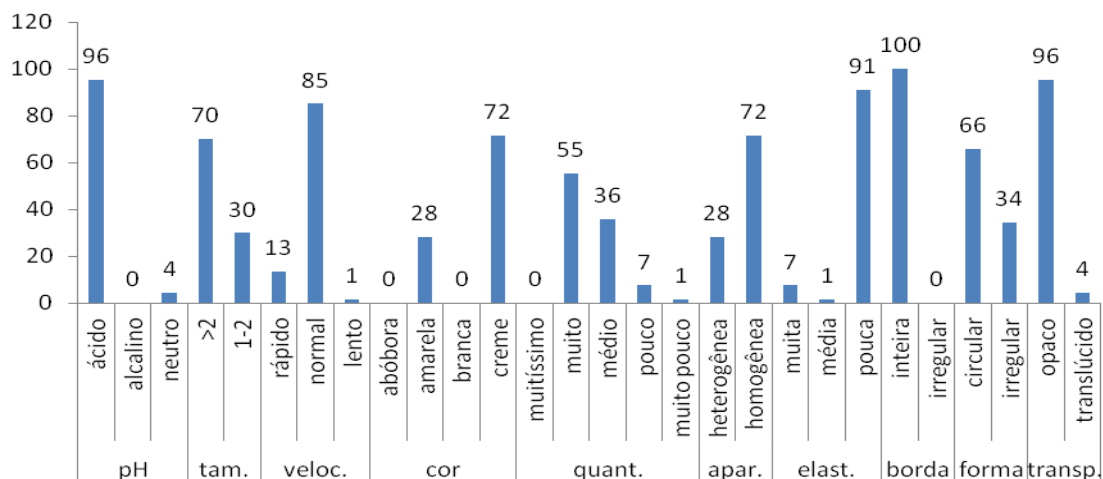


Figura 9. Porcentagem dos isolados de rizóbios obtidos de nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro em solos do município de Prudentópolis, quanto às características morfológicas avaliadas de alteração de pH; tamanho das colônias; velocidade de crescimento (rápido-1 dia, normal-2 dias e lento-3 dias); cor das colônias; quantidade de muco produzida; aparência das colônias; elasticidade do muco; tipo de borda; forma e transparência das colônias.

A alteração de pH em meio de cultura YMA é, comumente, uma característica para diferenciação dos gêneros *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*, que apresentam a propriedade de acidificar o meio de cultura, enquanto *Azorhizobium* e *Bradyrhizobium* alcalinizam o meio YMA (Coutinho et al., 1999, citado por Lima et al., 2012). Isto indica que os solos em estudo, com exceção de Nova Veneza, obtiveram a maioria dos isolados de rizóbios com características que se adequam às do gênero *Rhizobium*, devido, principalmente, a alteração do pH do meio de cultivo para ácido e ao tempo de crescimento rápido (de até três dias), como também a outras características, por exemplo, formação de colônias com diâmetro maior que 2 mm.

Esses dados concordam com os resultados de Medeiros et al. (2009), que obtiveram um total de 304 isolados a partir de nódulos coletados em experimento com caupi, embora a maior parte tenha apresentado crescimento em um dia, tamanho classificado como puntiforme, borda homogênea e translúcida. Os autores concluíram que os isolados obtidos apresentaram crescimento rápido e pH ácido em meio de cultivo.

Também concordando com os resultados, Chagas Júnior et al. (2010), considerando os parâmetros morfológicos de vinte isolados nativos estudados de solos da Amazônia, observaram que a maioria dos isolados exibiu crescimento rápido, acidificou o meio de crescimento, formou colônias maiores que ou iguais a 2 mm de diâmetro e

coloração branca, apresentou forma circular e borda inteira da colônia, com elevação, transparente e homogênea, muco sem elasticidade e caracterizado como viscoso.

Concordando com os dados obtidos, Soares et al. (2006), avaliando a eficiência agronômica de rizóbios selecionados e a diversidade fenotípica de populações de bactérias nativas que nodulam o feijão em Perdões (MG), obtiveram as características culturais da maioria dos isolados de: tempo de crescimento da colônia de dois a três dias, diâmetro maior que 2 mm, alta produção de goma, alteração do pH ácido, absorção do indicador do meio de cultura e coloração das colônias amarela. Estes autores concluíram que, a população nativa apresentou alta diversidade fenotípica; e, com base no perfil proteico total, os isolados da população nativa foram classificados, em sua maioria, com 80% de similaridade, como *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*.

Freitas et al. (2007), estudando a caracterização de rizóbios isolados de jacatupé, uma leguminosa herbácea, no Estado de Pernambuco, encontraram as características fenotípicas das colônias bacterianas de 24 isolados, de forma geral foram, circulares, com diâmetro de 1 a 4 mm, bordas inteiras, homogêneas, com elevação, coloração branca e produção variável de exopolissacarídeos. Os autores afirmaram que a grande capacidade de produção de exopolissacarídeos observada nos isolados estudados de solos do estado de Pernambuco pode estar relacionada à tolerância a estresse ambiental, possibilitando a sobrevivência nos solos salinos de onde foram isolados.

Em trabalho com caracterização e seleção de populações nativas de rizóbios de solo da região semi-árida de Pernambuco, Silva et al. (2007) concluíram que a diversidade morfológica e fisiológica dos isolados de caupi possibilitou a identificação de diferentes grupos, alguns deles com padrões de similaridade próximos à estirpe padrão *Bradyrhizobium* sp. Semia 6145. No que concerne à formação de ácido e álcalis, os autores verificaram que a maioria dos isolados apresentou reação alcalina em meio de cultura YMA, mostrando resultados diferentes dos encontrados no presente estudo. Os autores também concluíram que um dos isolados, além de resistir à temperatura elevada, mostrou-se resistente aos antibióticos estudados, permitindo inferir sobre a sua competitividade em regiões semi-áridas.

Frizzo (2007), estudando rizóbios nativos de solos do Rio Grande do Sul, encontrou que, após sete dias de incubação, a maioria dos isolados de *Lotus corniculatus* formaram colônias de três a cinco milímetros, e já nos isolados de *Lotus uliginosus*, predominou a ocorrência de colônias pequenas, um a dois milímetros. Estes resultados mostraram que, provavelmente, a maioria dos isolados obtidos de *L. corniculatus*

pertencem ao gênero *Mesorhizobium*, de crescimento intermediário, e que a maioria dos isolados de *L. uliginosus* pertencem ao gênero *Bradyrhizobium*, de crescimento lento, por apresentarem, respectivamente, diâmetros de colônias semelhantes aos descritos para estes gêneros.

Considerando a distribuição dos isolados por local de coleta dos solos para isolamento de rizóbios, sendo, estado de Goiás (Jussara e Nova Veneza), de Minas Gerais (Uberlândia e Unaí) e do Paraná (Araucária e Prudentópolis), verificou semelhança entre as características morfológicas dos isolados apresentadas nos três estados. A maior porcentagem dos isolados de cada estado apresentou crescimento em dois dias (61%, 69% e 92%, para Goiás, Minas Gerais e Paraná, respectivamente) e acidificou o pH do meio de cultivo (74%, 75% e 92%, para Goiás, Minas Gerais e Paraná, respectivamente) (Figura 10). Foi observada diferença entre os estados para a quantidade de muco produzida, visto que a maioria dos isolados em porcentagem obtidos do Paraná apresentou essa característica classificada como muito (56%), enquanto a maioria dos isolados de Goiás e Minas Gerais apresentou a quantidade de muco classificada como médio (56% e 43% respectivamente) (Figura 10).

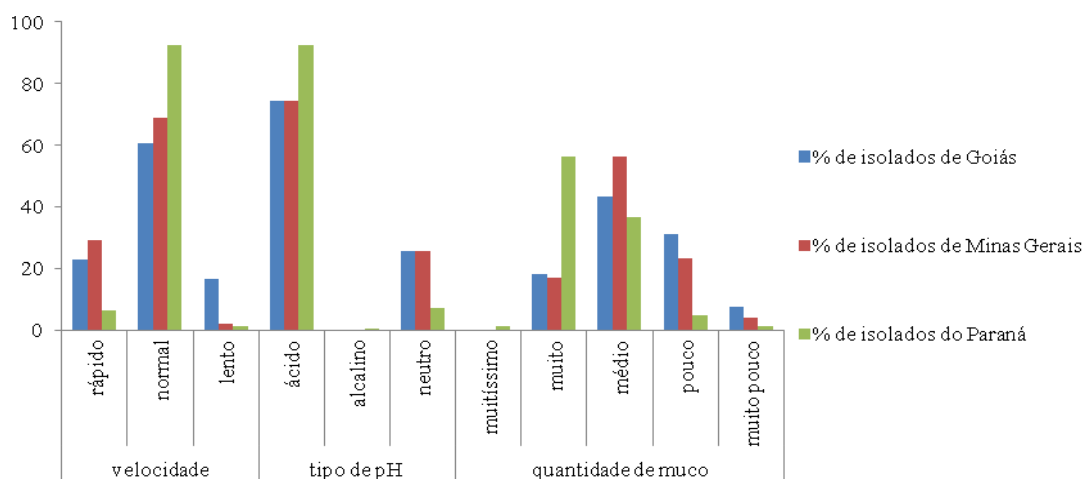


Figura 10. Porcentagem dos isolados obtidos de nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro, quanto às características morfológicas de velocidade de crescimento (rápido-1 dia, normal-2 dias e lento-3 dias); alteração de pH e quantidade de muco produzida, considerando a distribuição por local de coleta do solo dos Estados de Goiás, Minas Gerais e Paraná.

Foi observado que uma maior porcentagem de isolados que promoveram aumento da quantidade de muco produzida apresentaram colônias com maior diâmetro, classificadas como maior que 2 mm (81%, 94% e 100%), enquanto uma maior

porcentagem de isolados que formaram colônias de 1 a 2 mm de diâmetro apresentaram menor quantidade de muco produzido (64%, 100% e 100%), para os estados de Goiás, Minas Gerais e Paraná, respectivamente (Figura 11). Os dados corroboram com Martins et al. (1997), que relatam que as colônias com diâmetro inferior a 1,0 mm costumam ser translúcidas e produzir pouco muco, enquanto que aquelas maiores do que 1,0 mm são geralmente produtoras de muito muco.

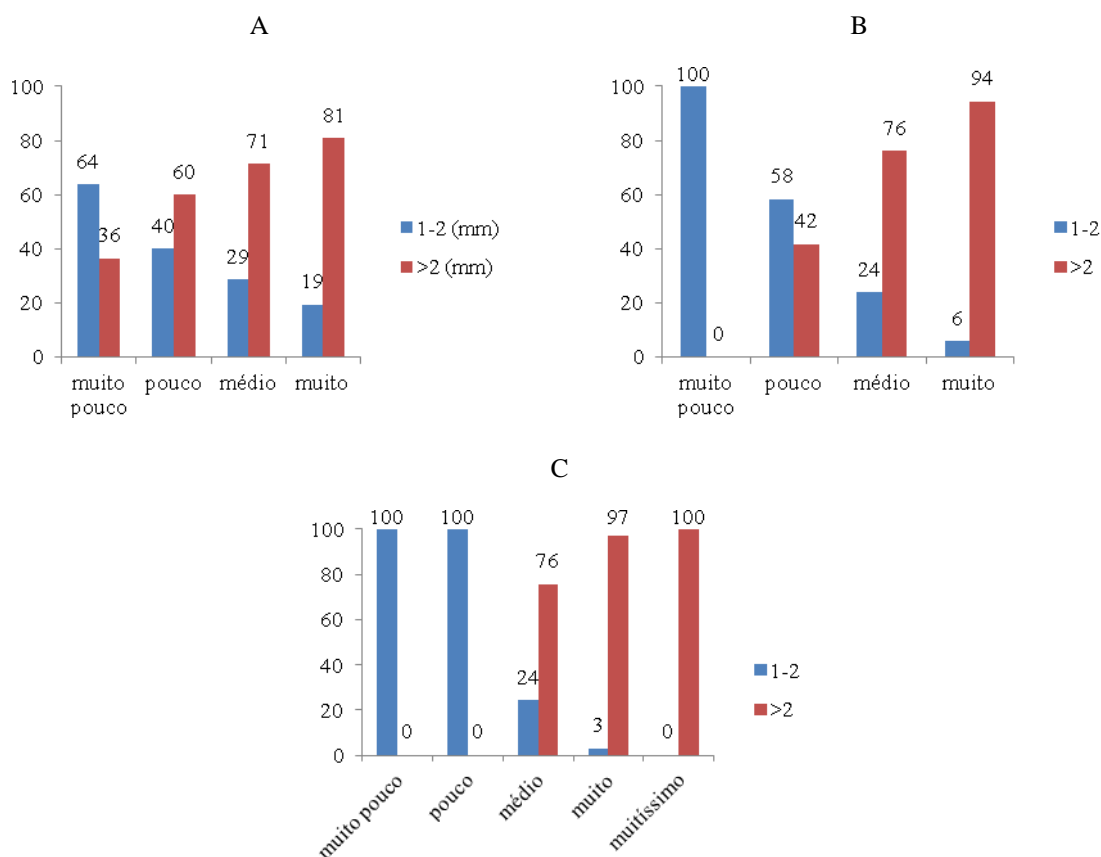


Figura 11. Porcentagem de isolados de nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro obtidos de (A) solos do Estado de Goiás, (B) solos do Estado de Minas Gerais e (C) solos do Estado do Paraná, de acordo com o tamanho das colônias e a quantidade de muco produzida.

Neste ensaio, observa-se que a maioria dos isolados em porcentagem, à medida que aumenta a consistência do muco há uma diminuição da transparência da massa de células, visto que isolados que apresentam consistência aquosa apresentam em maior porcentagem translúcidos em relação às outras consistências (45%, 69% e 33%, para Goiás, Minas Gerais e Paraná, respectivamente) e em menor porcentagem opacos (55%, 31% e 67% para Goiás, Minas Gerais e Paraná, respectivamente) (Figuras 12). Segundo Martins et al. (1997), o muco coalescente ou aquoso está geralmente associado com

colônias translúcidas, enquanto aquelas com muco compacto e consistente foram caracterizadas como opacas.

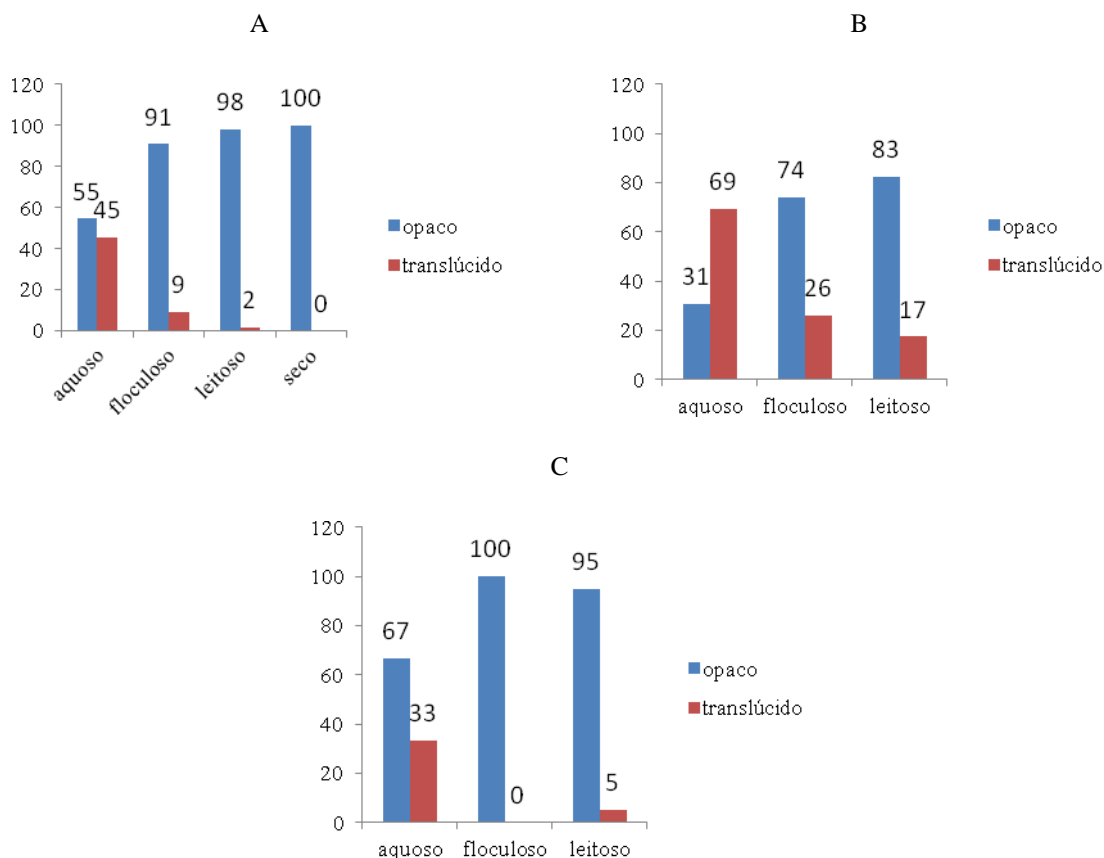


Figura 12. Porcentagem dos isolados obtidos de nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro, quanto à transparência e consistência da massa de células, em solos do Estado de Goiás (A), de Minas Gerais (B) e do Paraná (C).

Neste estudo os isolados apresentaram crescimento rápido (em até três dias), porém, foram classificados com diferentes velocidades de crescimento, rápido, um dia, normal, dois dias e lento, três dias. Martins (1996) observou que as estirpes de crescimento rápido tiveram produção abundante de muco, enquanto as de crescimento lento apresentaram produção média de muco e as de crescimento muito lento não produziram muco. Quanto à quantidade de muco, a maior parte dos isolados com velocidade de crescimento normal produziu a maior quantidade de muco quando proveniente dos solos dos Estados de Goiás e Paraná (73% e 100%), e de crescimento rápido produzindo a menor quantidade de muco quando obtida dos solos do Estado de Goiás (73%). A maior parte de isolados com velocidade de crescimento rápido produziu a menor quantidade de muco quando proveniente de solos do Estado de Minas Gerais (100%) (Figura 13).

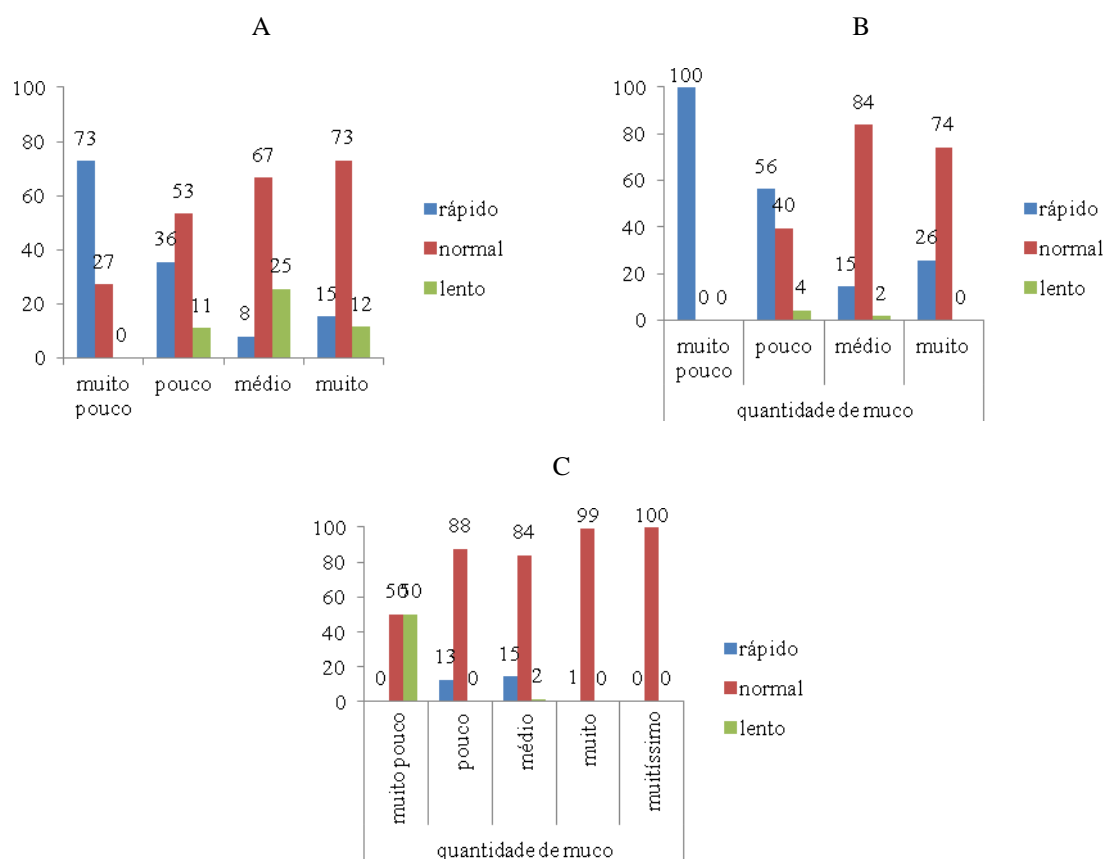


Figura 13. Porcentagem de isolados de nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro obtidos de (A) solos do Estado de Goiás, (B) solos do Estado de Minas Gerais e (C) solos do Estado do Paraná, de acordo com a velocidade de crescimento (1 dia - rápido, 2 dias - normal e 3 dias - lento) e a quantidade de muco produzida.

4.2 DIVERSIDADE MORFOLÓGICA E USO DE FONTES DE CARBONO DE ISOLADOS DE RIZÓBIOS SELECIONADOS

4.2.1 Estado de Goiás (solos provenientes dos municípios de Jussara e Nova Veneza)

Com base nas características morfológicas dos isolados selecionados a partir dos isolados nativos obtidos de genótipos silvestres de feijoeiro e das estirpes-referência provenientes de solos do Estado de Goiás (Jussara e Nova Veneza) (Tabela 3), foi possível agrupá-los em cinco grupos (Figura 14).

Os grupos 1, 4 e 5 foram formados por isolados nativos, mostrando índices de similaridade de 58%, 45% e 70%, respectivamente, e não se agruparam com qualquer estirpe-referência (Figura 14). O grupo 2 apresentou 45% de similaridade entre os isolados

e as estirpes-referência SEMIA 4077, SEMIA 4080, SEMIA 4088, BR266, BR351 e BR281.

Tabela 3. Características morfológicas dos isolados de rizóbios obtidos de nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro em solos de Jussara e Nova Veneza (Goiás) e das estirpes padrão.

Isolados/ Estirpes ¹	Características morfológicas dos isolados/estirpes											
	VC	pH	DC	AC	BC	FC	EC	CC	TM	QM	EM	CM
BR266	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
BR281	N	A	>2	Ho	I	C	E	Cr	T	M	P	L
BR351	N	A	>2	Ho	I	C	E	Cr	O	M	P	L
JPrG10A1	N	N	>2	Ho	I	C	E	Am	O	P	P	L
JPrG10A6	R	A	>2	He	I	Ir	E	Am	O	P	P	Aq
JPrG10A8	R	A	>2	He	I	Ir	E	Am	T	P	P	Aq
JPrG11A7	R	A	>2	He	I	Ir	E	Am	O	M	M	Aq
JPrG1A1	R	A	>2	He	I	Ir	P	Cr	O	MP	M	F
JPrG1A9	L	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	Aq
JPrG2A10	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
JPrG2A2	L	A	>2	He	I	C	E	Am	O	P	P	F
JPrG2A5	L	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
JPrG2A6	L	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
JPrG2A7	L	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
JPrG3A3	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	P	Mu	F
JPrG3A4	N	A	1-2	He	I	C	E	Am	O	M	M	L
JPrG3A7	L	A	>2	He	I	C	E	Am	O	Um	P	L
JPrG3A9	N	A	1-2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
JPrG4A1	L	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
JPrG4A10	N	A	>2	He	I	C	E	Cr	O	M	P	L
JPrG4A3	L	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
JPrG4A4	N	A	>2	Ho	I	Ir	E	Cr	O	M	P	L
JPrG4A7	L	A	>2	He	I	Ir	E	Am	O	M	P	L
JPrG4A9	N	A	>2	He	I	C	E	Cr	O	P	P	L
JPrG5A10	N	N	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
JPrG5A2	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
JPrG5A3	N	A	>2	He	I	Ir	E	Am	O	M	P	L
JPrG5A4	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
JPrG5A5	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
JPrG5A6	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
JPrG5A7	R	A	1-2	Ho	I	C	E	Am	O	P	P	L
JPrG5A9	N	A	>2	He	I	C	E	Cr	O	M	P	L
JPrG6A10	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	P	P	L
JPrG6A2	R	N	1-2	Ho	Ir	Ir	E	Cr	O	MP	P	Aq
JPrG6A8	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
JPrG7A2	R	N	1-2	Ho	Ir	Ir	E	Cr	T	P	P	F
JPrG7A5	N	A	1-2	He	I	C	E	Am	O	P	P	F
JPrG7A9	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
JPrG8A1	N	A	1-2	He	I	C	E	Am	O	M	Mu	F
JPrG8A3	N	A	>2	Ho	I	C	E	Cr	O	Um	P	L
JPrG8A4	R	N	1-2	Ho	Ir	Ir	E	Cr	T	P	P	F
JPrG8A5	N	A	1-2	Ho	I	C	E	Cr	O	Um	P	F
JPrG8A6	N	A	1-2	Ho	I	C	E	Am	O	P	Mu	F
JPrG8A7	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	Um	P	L
JPrG8A8	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	Um	P	L
JPrG9A2	N	A	>2	Ho	I	C	E	Cr	O	Um	P	L
JPrG9A3	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	Um	P	L
JPrG9A6	N	A	1-2	He	I	Ir	E	Am	O	M	P	L
JPrG9A9	N	A	1-2	Ho	I	C	E	Cr	O	M	P	L

Tabela 3. Cont.

Isolados/ Estirpes ¹	Características morfológicas dos isolados/estirpes											
	VC	pH	DC	AC	BC	FC	EC	CC	TM	QM	EM	CM
NVSG11A1	N	N	>2	He	I	C	E	Cr	O	M	P	L
NVSG11A3	N	A	>2	He	Ir	Ir	E	Am	O	M	P	L
NVSG11A6	N	A	>2	He	I	Ir	E	Am	O	P	P	L
NVSG1A1	R	N	1-2	Ho	I	C	E	Cr	T	P	P	L
NVSG1A2	N	N	>2	Ho	I	C	E	B	T	P	P	Aq
NVSG2A1	N	N	>2	He	Ir	Ir	E	Cr	O	P	P	F
NVSG2A2	N	N	1-2	Ho	I	C	E	Ab	O	MP	P	S
NVSG2A4	R	N	1-2	Ho	I	C	E	Cr	O	P	P	L
NVSG2A6	R	N	1-2	Ho	I	C	E	Cr	O	P	P	L
NVSG3A3	N	N	>2	He	I	Ir	E	Cr	O	M	P	L
NVSG3A4	N	N	>2	He	I	C	E	Am	O	P	P	L
NVSG4A11	N	A	1-2	He	I	C	E	Am	O	Um	P	L
NVSG4A15	N	N	1-2	Ho	I	C	E	Am	O	MP	P	F
NVSG4A5	N	A	>2	He	I	C	E	Cr	O	M	P	L
NVSG4A6	N	N	1-2	Ho	I	C	E	Ab	O	MP	P	S
NVSG5A3	R	N	1-2	Ho	I	C	E	Am	O	P	P	L
NVSG6A2	N	N	1-2	Ho	I	C	E	Cr	O	P	P	Aq
NVSG6A5	R	A	>2	He	Ir	Ir	P	Cr	O	MP	P	F
NVSG7A1	R	N	1-2	He	I	Ir	E	Am	O	M	P	L
NVSG7A11	N	A	>2	He	I	Ir	E	Am	O	P	P	L
NVSG7A2	N	N	>2	He	I	C	E	Am	O	P	P	F
NVSG7A3	N	N	>2	He	I	C	E	Cr	O	P	P	L
NVSG7A5	L	A	1-2	He	I	C	E	Ab	O	M	P	L
NVSG7A7	N	A	>2	Ho	I	C	E	Cr	O	P	P	L
NVSG7A9	L	A	>2	He	I	C	E	Ab	O	P	P	L
NVSG8A1	L	N	>2	He	I	C	E	Am	O	P	P	L
NVSG8A10	N	A	>2	He	I	Ir	E	Cr	T	P	P	Aq
NVSG8A2	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
NVSG8A7	N	A	>2	Ho	I	C	E	Cr	O	P	P	L
NVSG8A9	L	A	>2	He	I	C	E	Ab	O	P	P	L
R82	R	N	1-2	Ho	I	C	E	Cr	O	M	P	L
SEMIA4077	R	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	Aq
SEMIA4080	R	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
SEMIA4088	R	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L

¹ (JPrGnAn): isolados oriundos de solos da cidade de Jussara (J), fazenda Primavera (Pr), genótipo (G) e número do nódulo (A); (NVSGnAn): isolados oriundos de solos da cidade de Nova Veneza (NV), fazenda Souza (S), genótipo (G) e número do nódulo (A); e (SEMIA 4077, SEMIA 4080, SEMIA 4088, BR266, BR351, BR281, R82): estirpes de referência. (VC) velocidade de crescimento (R-rápido-1 dia, N-normal-2 dias e L-lento-3 dias), pH (A-ácido e N-neutro), (DC) diâmetro da colônia em mm, (AC) aparência da colônia (He-heterogênea e Ho-homogênea), (BC) borda da colônia (I-inteira e Ir-irregular), (FC) forma da colônia (C-circular e Ir-irregular), (EC) elevação da colônia (E-elevado e P-plano), (CC) cor da colônia (Am-amarela, B-branca, Cr-creme e Ab-abóbora), (TM) transparência da massa celular (O-opaco e T-translúcido), (QM) quantidade de muco (MP-muito pouco, P-pouco, M-médio, Mu-muito), (EM) elasticidade do muco (P-pouca, M-média e Mu-muita), (CM) consistência do muco (L-leitoso, Aq-aquoso, F-floculoso e S-seco).

Pelas características apresentadas no grupo 2, os isolados JPrG2A10, JPrG5A2, JPrG5A4, JPrG5A5, JPrG5A6, JPrG6A8, JPrG7A9 e NVSG8A2 e a referência BR266 são 100% semelhantes, sendo provavelmente também *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. Esses isolados e mais JPrG2A5, JPrG2A6, JPrG2A7, JPrG4A1 e JPrG4A3, são semelhantes às estirpes-tipo SEMIA 4077, SEMIA 4080 e SEMIA 4088 com 80% de similaridade. Os isolados JPrG4A10, JPrG5A9 e NVSG4A5 são semelhantes a referência BR351 com 85% de similaridade; e a estirpe padrão BR281 é semelhante ao isolado JPrG4A4 com 70% de similaridade.

O grupo 3 foi formado por isolados nativos e a estirpe referência R82 com 40% de similaridade. Neste grupo, os isolados NVSG2A4 e NVSG2A6 foram semelhantes à estirpe tipo R82 com 85% de similaridade (Figura 14). O grande número de ramificações formado pelos isolados de solos de Goiás indica uma elevada diversidade morfológica entre os isolados obtidos destes solos (Figura 14).

Freitas et al. (2007) concluíram que as estirpes de rizóbio nativas de solos salinos isoladas de nódulos de jacatupé mostraram uma diversidade bastante elevada, porém baixa similaridade com as estirpes de referência testadas no estudo, podendo se tratar de espécies novas ainda não descritas. Medeiros et al. (2009), em trabalho com rizóbios isolados de caupi, concluíram que os resultados indicam elevada diversidade morfológica da população nativa de rizóbio do semi-árido do Rio Grande do Norte.

Também em trabalho de Chagas Júnior et al. (2010), com vinte isolados de rizóbios de caupi oriundos de solos da Amazônia, com base nas características morfológicas dos isolados nativos e das estirpes-referência, foi possível agrupá-los em cinco grupos, com a construção de um dendrograma de similaridade. Segundo estes autores, para as 12 características morfológicas estudadas foi possível encontrar índice de similaridade de 100% entre o isolado INPA R851 e BR 10026 (*Rhizobium etli*), e o INPA R927 e as estirpes referência BR 10016 (*R. tropici* IIA) e BR 112 (*Sinorhizobium fredii*).

Quanto às características dos isolados selecionados e das estirpes-tipo relativas ao crescimento em diferentes fontes de carbono, provenientes de solos do Estado de Goiás (municípios de Jussara e Nova Veneza) (Tabela 4), foram definidos três grupos (Figura 15). A análise da Tabela 4 mostra que as fontes de carbono mais utilizadas pelos isolados de rizóbios em genótipos silvestres de feijoeiro de solos do estado de Goiás foram glicose, arabinose, frutose e glicerol, que equivale a 68 isolados dos 76 selecionados, ou 89% desses. No entanto, ácido maleico e ácido nicotínico foram as fontes de carbono menos utilizadas, apenas 12 e 27 isolados utilizaram essas fontes de carbono, respectivamente, que corresponde a 15% e 35% dos isolados.

Em relação às estirpes de referência, de acordo com a Tabela 4, todas as fontes de carbono, sacarose, glicose, ácido málico, ácido maleico, ácido nicotínico, inositol, sorbitol, arabinose, frutose e glicerol, foram utilizadas pelas estirpes SEMIA 4080 e SEMIA 4088. A estirpe padrão SEMIA 4077 também utilizou essas fontes de carbono para crescimento, com exceção do ácido maleico. A fonte de carbono ácido nicotínico não foi utilizada pelas estirpes de referência BR266, BR351 e R82, porém, as outras fontes de

carbono foram utilizadas. A estirpe-tipo BR281 utilizou somente as fontes de carbono sacarose, arabinose e frutose (Tabela 4).

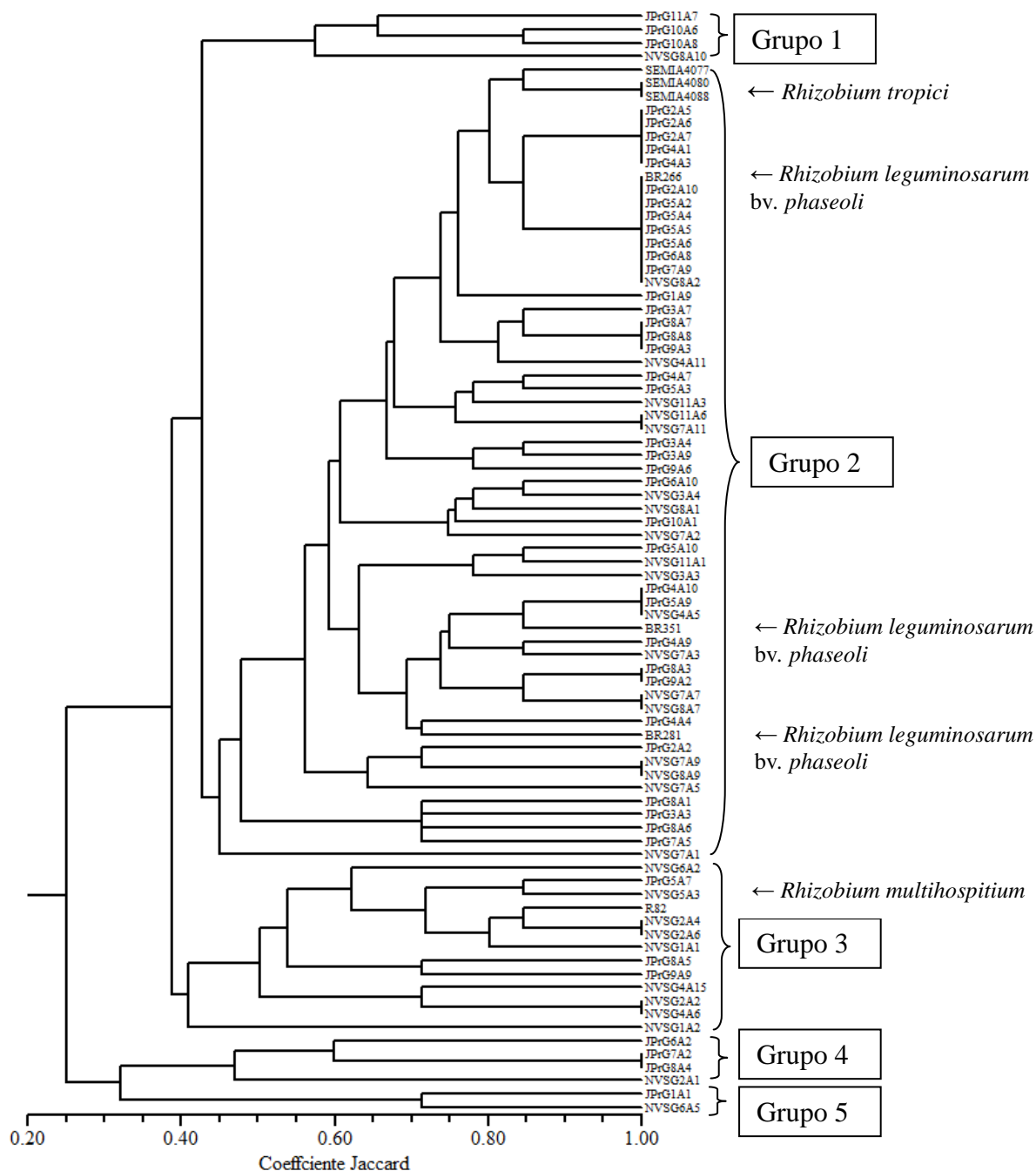


Figura 14. Dendrograma de similaridade construído com base nas características morfológicas de isolados de rizóbios obtidos de solos de Goiás, usando Jaccard como coeficiente de similaridade e UPGMA como método de agrupamento.

Com base na escala de similaridade no dendrograma, o grupo 1 apresentou similaridade de 40% entre os isolados e as estirpes referência BR266, BR351, R82,

SEMIA 4080, SEMIA 4088, SEMIA 4077 e BR281, sendo que as três primeiras apresentaram 100% de similaridade com os isolados JPrG7A5, JPrG8A3 e JPrG8A6 (Figura 15). Estes isolados mostraram ausência de crescimento em meio contendo ácido nicotínico como fonte de carbono, de acordo com a Tabela 4.

Tabela 4. Crescimento em diferentes fontes de carbono dos isolados de rizóbios obtidos de nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro em solos de Jussara e Nova Veneza (Goiás) e das estirpes padrão.

Isolados/ Estirpes ¹	Fontes de carbono									
	S	G	AM	AMe	AN	I	S	A	F	Gl
BR266	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
BR281	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
BR351	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
JPrG10A1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
JPrG10A6	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
JPrG10A8	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
JPrG11A7	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
JPrG1A1	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
JPrG1A9	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
JPrG2A10	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
JPrG2A2	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
JPrG2A5	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
JPrG2A6	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
JPrG2A7	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
JPrG3A3	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
JPrG3A4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
JPrG3A7	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
JPrG3A9	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
JPrG4A1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
JPrG4A10	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+
JPrG4A3	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
JPrG4A4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JPrG4A7	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
JPrG4A9	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
JPrG5A10	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
JPrG5A2	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
JPrG5A3	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
JPrG5A4	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+
JPrG5A5	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+
JPrG5A6	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+
JPrG5A7	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
JPrG5A9	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
JPrG6A10	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
JPrG6A2	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-
JPrG6A8	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
JPrG7A2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
JPrG7A5	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
JPrG7A9	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
JPrG8A1	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
JPrG8A3	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
JPrG8A4	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+
JPrG8A5	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
JPrG8A6	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
JPrG8A7	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+
JPrG8A8	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

Tabela 4. Cont.

Isolados/ Estirpes ¹	Fontes de carbono									
	S	G	AM	AMe	AN	I	S	A	F	Gl
JPrG9A2	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
JPrG9A3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
JPrG9A6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
JPrG9A9	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-
NVSG11A1	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
NVSG11A3	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
NVSG11A6	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
NVSG1A1	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
NVSG1A2	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+
NVSG2A1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NVSG2A2	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+
NVSG2A4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NVSG2A6	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
NVSG3A3	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
NVSG3A4	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
NVSG4A11	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
NVSG4A15	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
NVSG4A5	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
NVSG4A6	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
NVSG5A3	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
NVSG6A2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NVSG6A5	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
NVSG7A1	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
NVSG7A11	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
NVSG7A2	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+
NVSG7A3	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
NVSG7A5	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
NVSG7A7	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
NVSG7A9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NVSG8A1	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
NVSG8A10	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+
NVSG8A2	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
NVSG8A7	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
NVSG8A9	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
R82	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SEMIA4077	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
SEMIA4080	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SEMIA4088	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

¹ (JPrGnAn): isolados oriundos de solos da cidade de Jussara (J), fazenda Primavera (Pr), genótipo (G) e número do nódulo (A); (NVSGnAn): isolados oriundos de solos da cidade de Nova Veneza (NV), fazenda Souza (S), genótipo (G) e número do nódulo (A); e (SEMIA 4077, SEMIA 4080, SEMIA 4088, BR266, BR351, BR281, R82): estirpes de referência. (+) Crescimento; (-) Ausência de crescimento. (S) sacarose, (G) glicose, (AM) ácido málico, (AMe) ácido maleico, (AN) ácido nicotínico, (I) inositol, (S) sorbitol, (A) arabinose, (F) frutose, (Gl) glicerol.

Foi encontrada similaridade de 100% também entre os isolados JPrG10A1, JPrG3A4, JPrG7A2, NVSG2A4, NVSG6A2, NVSG7A9 e NVSG2A1 e as estirpes-tipo SEMIA 4080 e SEMIA 4088 (Figura 15), os quais crescem em todas as dez fontes de carbono estudadas (Tabela 4); e entre os isolados JPrG10A8, JPrG1A1, JPrG5A7, JPrG6A8, NVSG11A3, NVSG1A1, NVSG2A6, NVSG3A4, NVSG4A5 e NVSG8A9 e a referência SEMIA 4077 (Figura 15), os quais não crescem em meio contendo ácido maleico. De forma geral, o maior número de isolados agrupa especialmente com as estirpes

usadas como inoculante do feijoeiro comum (SEMIA 4080, SEMIA 4088 e SEMIA 4077), indicando que estes isolados apresentam características metabólicas semelhantes a estas estirpes, revelando um grande potencial para a agricultura.

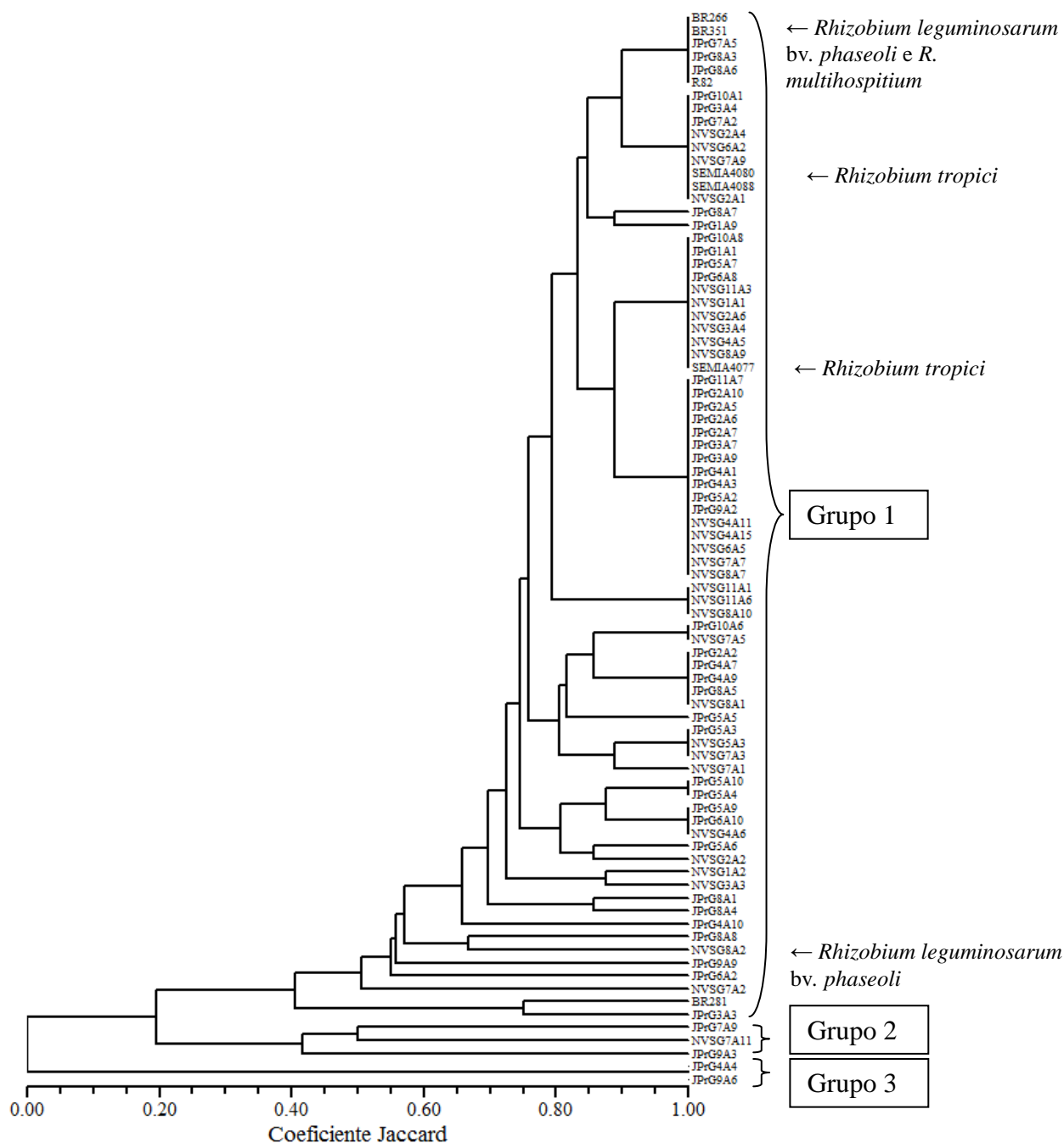


Figura 15. Dendrograma de similaridade construído com base no uso de diferentes fontes de carbono por isolados de rizóbios obtidos de solos de Goiás, usando Jaccard como coeficiente de similaridade e UPGMA como método de agrupamento.

É provável que mais isolados oriundos dos solos de Nova Veneza (GO) tenham sido semelhantes à estirpe tipo *Rhizobium tropici* devido ao pH do solo ácido de 4,8 (Tabela 1), sendo que a estirpe SEMIA4077 (estirpe padrão de *R. tropici* IIB) apresenta maior tolerância à acidez e a temperaturas elevadas, segundo Vargas & Hungria (1997). Segundo os autores, a região dos cerrados se caracteriza por solos ácidos e a maior ocupação dos nódulos por *Rhizobium tropici* também foi confirmada em um experimento em que *R. tropici* CIAT 899 foi capaz de formar até 91,4% dos nódulos, competindo com as estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* UMR 1135 e V23.

Ainda no grupo 1, o isolado JPrG3A3 apresentou similaridade de 75% com a estirpe referência BR281. Os grupos 2 e 3 foram formados por isolados nativos e não se agruparam com nenhuma estirpe-referência, com níveis de similaridade de 40% e 100%, respectivamente (Figura 15).

Segundo Castellane (2007), trabalhando com análise de polissacarídeos essenciais para nodulação do feijoeiro por *Rhizobium tropici* cultivados em diferentes fontes de carbono, observou que a estirpe SEMIA 4077 apresentou produção média de goma quando cultivada em meio contendo glicerol e em meio com glicose, e uma produção inferior de goma, quando cultivada em meio contendo galactose, como fonte de carbono. Entretanto, as células dessa bactéria quando cultivadas em meio com sacarose na sua composição liberaram bastante goma, sendo esta opaca, de coloração esbranquiçada e bastante viscosa. Martinez-Drets & Arias (1972), citado por Castellane (2007), sugeriram que enquanto as bactérias pertencentes aos gêneros *Rhizobium* utilizam uma série de carboidratos e sais de ácidos orgânicos como fontes de carbono, muitas estirpes de *Bradyrhizobium* preferem a arabinose.

4.2.2 Estado de Minas Gerais (solos provenientes dos municípios de Uberlândia e Unaí)

Com base nas características morfológicas dos isolados selecionados a partir de isolados obtidos em genótipos silvestres de feijoeiro provenientes de solos de Minas Gerais (Uberlândia e Unaí) (Tabela 5) e das estirpes referência, foi possível agrupá-los em quatro grupos (Figura 16). O grupo 1 foi formado por isolados nativos e as estirpes referência BR266, SEMIA 4077, SEMIA 4080, SEMIA 4088, BR351 e BR281 com 45% de similaridade, de acordo com a escala no dendrograma (Figura 16). Os isolados UbALG10A2, UbALG10A6, UbALG4A7, UbALG6A9, UbALG7A7, UbALG8A3,

UbALG8A5, UbALG9A5, UnPaG11A1, UnPaG11A2, UnPaG2A1, UnPaG2A11, UnPaG2A12, UnPaG3A20, UnPaG5A11 e UnPaG5A8 apresentaram 100% de similaridade com a estirpe-tipo BR266 quanto às características morfológicas estudadas, sendo provavelmente também *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Figura 16).

Tabela 5. Características morfológicas dos isolados de rizóbios obtidos de nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro em solos de Uberlândia e Unaí (Minas Gerais) e das estirpes padrão.

Isolados/ Estirpes ¹	Características dos isolados/estirpes											
	VC	pH	DC	AC	BC	FC	EC	CC	TM	QM	EM	CM
BR266	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
BR281	N	A	>2	Ho	I	C	E	Cr	T	M	P	L
BR351	N	A	>2	Ho	I	C	E	Cr	O	M	P	L
R82	R	N	1-2	Ho	I	C	E	Cr	O	M	P	L
SEMIA4077	R	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	Aq
SEMIA4080	R	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
SEMIA4088	R	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
UbALG10A1	R	N	>2	He	Ir	Ir	E	Am	O	P	P	F
UbALG10A2	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
UbALG10A4	N	A	>2	Ho	I	C	E	Cr	O	Mu	P	L
UbALG10A5	N	A	1-2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
UbALG10A6	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
UbALG10A9	N	A	>2	He	I	Ir	E	Am	O	M	P	L
UbALG11A4	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	M	L
UbALG11A5	R	A	1-2	Ho	I	C	E	Cr	O	Mu	P	L
UbALG1A1	R	N	1-2	Ho	I	C	E	Cr	T	P	P	L
UbALG1A8	R	N	1-2	Ho	I	Ir	E	Cr	T	P	P	L
UbALG2A2	N	A	>2	Ho	I	Ir	E	Cr	O	M	P	L
UbALG2A4	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	F
UbALG3A3	R	A	>2	He	I	Ir	E	Cr	O	P	P	L
UbALG3A4	R	A	>2	He	I	Ir	E	Am	O	P	M	L
UbALG3A5	R	A	>2	Ho	I	C	E	Cr	O	M	M	L
UbALG4A10	R	N	1-2	He	I	C	E	Cr	T	P	P	F
UbALG4A2	R	N	1-2	Ho	I	Ir	E	Cr	T	MP	M	F
UbALG4A6	N	A	1-2	Ho	I	C	E	Am	T	P	P	F
UbALG4A7	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
UbALG6A3	R	N	1-2	He	I	C	E	Am	O	M	P	F
UbALG6A9	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
UbALG7A7	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
UbALG8A1	N	A	>2	Ho	I	Ir	E	Cr	T	Mu	P	L
UbALG8A10	N	A	>2	He	I	Ir	E	Cr	T	M	P	L
UbALG8A3	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
UbALG8A5	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
UbALG9A10	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	Mu	P	L
UbALG9A5	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
UnPaG10A11	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	P	P	L
UnPaG10A12	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	P	P	L
UnPaG10A3	N	A	>2	He	I	C	E	Cr	O	M	P	L
UnPaG10A4	N	A	>2	He	I	C	E	Cr	O	M	P	Aq
UnPaG11A1	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
UnPaG11A10	R	A	>2	Ho	I	C	E	B	T	Mu	P	L
UnPaG11A2	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
UnPaG11A4	R	A	>2	Ho	I	Ir	P	Cr	T	M	P	Aq
UnPaG11A5	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	P	P	L
UnPaG11A6	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	Mu	P	L

Tabela 5. Cont.

Isolados/ Estirpes ¹	Características dos isolados/estirpes											
	VC	pH	DC	AC	BC	FC	EC	CC	TM	QM	EM	CM
UnPaG11A7	N	A	>2	He	I	C	E	Ab	O	M	P	L
UnPaG11A8	N	A	>2	He	I	C	E	Ab	O	M	P	L
UnPaG11A9	N	N	>2	He	I	C	E	Ab	O	P	M	L
UnPaG1A1	N	A	>2	He	I	C	E	Ab	T	Mu	P	L
UnPaG1A10	N	N	>2	He	I	C	E	Am	O	P	P	L
UnPaG1A12	N	A	>2	He	I	Ir	E	Ab	O	Mu	Mu	L
UnPaG1A2	N	A	1-2	Ho	I	C	E	Cr	O	P	P	L
UnPaG1A9	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	P	P	L
UnPaG2A1	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
UnPaG2A10	N	N	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	Aq
UnPaG2A11	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
UnPaG2A12	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
UnPaG2A3	N	A	>2	He	I	C	E	Am	T	M	P	L
UnPaG2A4	N	A	>2	He	I	C	E	Am	T	M	P	L
UnPaG2A5	N	A	1-2	He	I	C	E	Ab	O	P	P	F
UnPaG2A6	N	A	1-2	He	I	C	E	Ab	O	M	P	F
UnPaG2A9	R	N	1-2	Ho	I	C	E	Cr	O	P	P	L
UnPaG3A1	N	A	>2	He	I	C	E	Cr	O	M	P	F
UnPaG3A15	N	N	1-2	Ho	I	C	E	Cr	T	M	P	F
UnPaG3A17	R	N	1-2	Ho	I	C	E	Cr	T	M	P	L
UnPaG3A18	R	N	1-2	Ho	I	C	E	Am	T	P	P	F
UnPaG3A19	N	A	1-2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
UnPaG3A2	R	N	>2	He	I	Ir	E	Cr	T	M	P	Aq
UnPaG3A20	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
UnPaG3A5	N	A	1-2	He	I	C	E	Am	O	M	P	F
UnPaG3A6	N	A	>2	He	I	Ir	E	Am	O	P	P	L
UnPaG3A9	N	N	>2	He	I	C	E	Cr	O	P	P	L
UnPaG4A1	N	N	>2	He	I	Ir	E	Cr	O	Mu	P	L
UnPaG4A12	N	A	>2	He	I	C	E	B	O	M	Mu	Aq
UnPaG4A2	R	N	1-2	Ho	I	C	E	Am	O	P	P	F
UnPaG4A5	L	A	>2	He	I	Ir	E	Am	O	P	P	L
UnPaG4A6	N	N	>2	He	I	Ir	E	Cr	O	M	P	L
UnPaG4A9	N	A	>2	He	I	C	E	Cr	O	M	P	L
UnPaG5A11	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
UnPaG5A12	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	P	P	L
UnPaG5A7	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	Mu	P	Aq
UnPaG5A8	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
UnPaG6A10	N	A	>2	He	I	C	E	Cr	O	M	P	L
UnPaG6A12	N	A	1-2	He	I	C	E	Am	O	M	Mu	L
UnPaG6A2	N	A	>2	He	I	C	E	Am	T	M	P	Aq
UnPaG6A5	N	N	>2	He	I	Ir	E	Am	T	P	P	L
UnPaG6A6	N	A	1-2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
UnPaG6A7	N	A	>2	He	I	C	E	Cr	O	Mu	P	L
UnPaG6A9	N	A	1-2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
UnPaG7A1	N	N	>2	He	I	C	E	Cr	O	M	P	L
UnPaG7A11	R	A	1-2	Ho	I	C	E	Cr	O	M	P	F
UnPaG7A2	R	N	1-2	Ho	I	C	E	Am	O	P	P	L
UnPaG7A3	R	N	1-2	Ho	I	C	E	Am	O	P	P	L
UnPaG7A4	R	N	1-2	Ho	I	C	E	Am	O	P	P	L
UnPaG7A5	R	N	>2	Ho	I	Ir	E	B	T	Mu	P	L
UnPaG7A6	R	N	1-2	Ho	I	C	E	B	T	Mu	P	L
UnPaG7A7	N	N	>2	Ho	I	Ir	E	Am	O	Mu	P	Aq
UnPaG7A8	N	N	>2	He	I	C	E	Cr	T	M	P	L
UnPaG8A1	R	A	1-2	Ho	I	C	E	Cr	T	P	P	Aq
UnPaG8A11	N	A	>2	He	I	C	E	Cr	O	P	P	L
UnPaG8A12	N	A	>2	He	I	C	E	Cr	O	M	P	L
UnPaG8A2	R	A	1-2	Ho	I	C	E	Cr	T	P	P	Aq

Tabela 5. Cont.

Isolados/ Estirpes ¹	Características dos isolados/estirpes											
	VC	pH	DC	AC	BC	FC	EC	CC	TM	QM	EM	CM
UnPaG8A3	R	N	1-2	Ho	I	C	P	Cr	T	P	P	Aq
UnPaG8A4	R	N	>2	He	I	Ir	P	Cr	T	M	P	Aq
UnPaG8A7	R	N	1-2	He	Ir	Ir	P	Cr	T	P	P	Aq
UnPaG8A8	R	A	>2	He	I	Ir	E	Cr	T	M	P	Aq

¹ (UbALGnAn): isolados oriundos de solos da cidade de Uberlândia (Ub), fazenda Água Limpa (AL), genótipo (G) e número do nódulo (A); (UnPaGnAn): isolados oriundos de solos da cidade de Unaí (Un), fazenda Paris (Pa), genótipo (G) e número do nódulo (A); e (SEMIA 4077, SEMIA 4080, SEMIA 4088, BR266, BR351, BR281, R82): estirpes de referência. (VC) velocidade de crescimento (R-rápido-1 dia, N-normal-2 dias e L-lento-3 dias), pH (A-ácido e N-neutro), (DC) diâmetro da colônia em mm, (AC) aparência da colônia (He-heterogênea e Ho-homogênea), (BC) borda da colônia (I-inteira e Ir-irregular), (FC) forma da colônia (C-circular e Ir-irregular), (EC) elevação da colônia (E-elevado e P-plano), (CC) cor da colônia (Am-amarela, B-branca, Cr-creme e Ab-abóbora), (TM) transparência da massa celular (O-opaco e T-translúcido), (QM) quantidade de muco (MP-muito pouco, P-pouco, M-médio, Mu-muito), (EM) elasticidade do muco (P-pouca, M-média e Mu-muita), (CM) consistência do muco (L-leitoso, Aq-aquoso, F-floculoso e S-seco).

Com os dados apresentados, pode-se observar que 34 isolados, incluindo a referência BR266 foram semelhantes às estirpes-tipo SEMIA 4077, SEMIA 4080 e SEMIA 4088, com 75% de similaridade (Figura 16). No grupo 1, o isolado UbAIG10A4 foi semelhante a referência BR351 com 85% de similaridade, e estes, juntamente com o isolado UbAIG2A2, foram semelhantes a estirpe padrão BR281 com 80% de similaridade (Figura 16).

O grupo 3, com 45% de similaridade, foi constituído pela estirpe referência R82 e os isolados, sendo que UnPaG2A9 mostrou semelhança de 85% com esta referência. Os grupos 2 e 4 foram formados por isolados nativos, mostrando índices de similaridade de 40%, e não se agruparam com nenhuma estirpe-referência (Figura 16). Em geral, o grande número de ramificações formado pelos isolados de solos de Minas Gerais indica uma elevada diversidade morfológica entre os isolados obtidos destes solos (Figura 16).

Com base nas características dos isolados selecionados e das estirpes-tipo quanto ao uso de fontes de carbono, provenientes de solos do estado de Minas Gerais (Uberlândia e Unaí) (Tabela 6), foram definidos quatro grupos (Figura 17). A análise do uso de fontes de carbono dos 99 isolados selecionados provenientes de solos do estado de Minas Gerais revelou que as fontes mais utilizadas foram frutose, sorbitol, sacarose, glicose, arabinose e glicerol (Tabela 6). A fonte de carbono ácido maleico foi a menos utilizada para crescimento dos isolados, sendo que apenas vinte isolados ou 20% dos isolados utilizaram essa fonte de carbono.

De acordo com o dendrograma, o grupo 1 foi formado pelos isolados UnPaG10A4, UnPaG10A3 e UnPaG1A2 e a estirpe-tipo BR281, com 40% de similaridade (Figura 17). Os grupos 2 e 4 não se agruparam com nenhuma estirpe de referência, mostrando índices de similaridade de 50% e 20%, respectivamente.

O grupo 3 foi formado por isolados nativos e as referências SEMIA 4077, SEMIA 4080, SEMIA 4088, BR266, BR351 e R82, com 40% de similaridade, sendo que a primeira apresentou crescimento nas fontes de carbono estudadas com 100% de similaridade a 35 isolados (Figura 17), ou seja, cresceram em meio contendo todas as fontes de carbono exceto ácido maleico (Tabela 6).

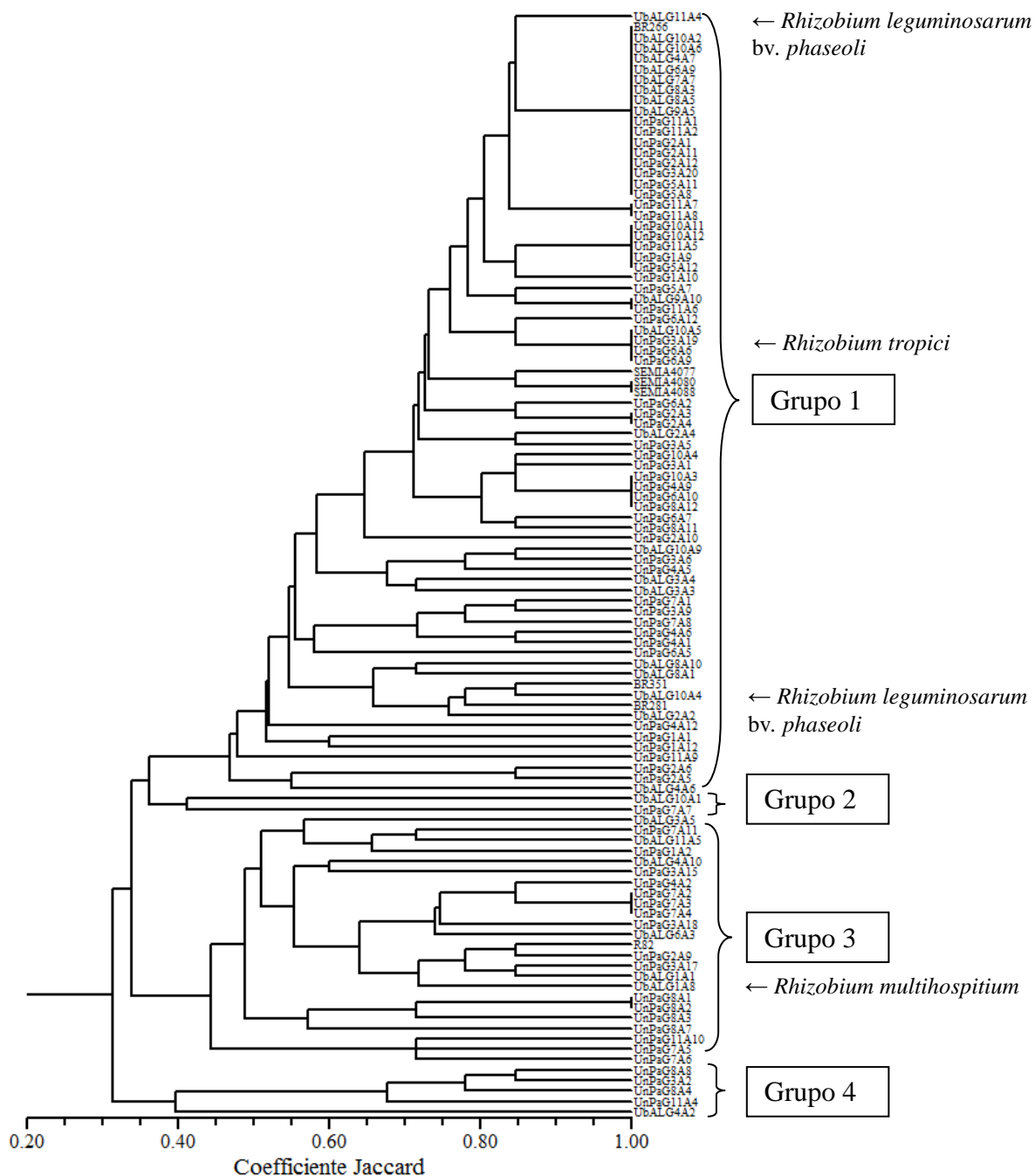


Figura 16. Dendrograma de similaridade construído com base nas características morfológicas de isolados de rizóbios obtidos de solos de Minas Gerais, usando Jaccard como coeficiente de similaridade e UPGMA como método de agrupamento.

Já os isolados UbAIG10A1, UbAIG10A4, UbAIG1A1, UbAIG3A5, UbAIG2A4, UbAIG4A2, UbAIG9A10, UnPaG11A4, UnPaG2A9, UnPaG3A19, UnPaG1A12, UnPaG3A20 e UnPaG8A7 foram 100% semelhantes às estirpes de referência SEMIA 4080 e SEMIA 4088, mostrando crescimento em todas as fontes de carbono (Tabela 6). Observou-se que um maior número de isolados agrupa com as estirpes de *R. tropici*, indicando que estes isolados apresentam características metabólicas semelhantes a estas estirpes, revelando um grande potencial para a agricultura.

Castellane (2007) observou que a estirpe SEMIA 4080 cresceu adequadamente nas hexoses, glicose e galactose, por outro lado, esses açúcares não permitiram grande desenvolvimento da estirpe SEMIA 4077. Ambas as estirpes cresceram em glicerol, porém a estirpe SEMIA 4077 cresceu muito pouco nesta fonte de carbono. Apesar disso, o glicerol foi descrito como uma excelente fonte de carbono para o crescimento de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. Neste estudo, as duas estirpes cresceram em meio contendo glicose e glicerol (Tabela 6). No grupo 3, quatro isolados (UbAIG3A3, UbAIG6A3, UnPaG3A9 e UnPaG6A2) apresentaram características metabólicas 100% semelhantes às estirpes BR266, BR351 e R82 (Figura 17), os quais não cresceram em meio com ácido nicotínico (Tabela 6).

Segundo Castellane (2007), as curvas de crescimento das estirpes SEMIA 4077 e SEMIA 4080 mostraram que o dissacarídeo sacarose foi utilizado para promover o crescimento e liberação de exopolissacarídeo. Entretanto, tal utilização só se iniciou após 28 horas de cultivo e, então, foi aumentando progressivamente com o tempo. Para isso, faz-se necessária a presença da enzima chamada invertase ou β -D-frutofuranosidase (Rose & Harrison, 1970, citado por Castellane, 2007). Também segundo Martins et al. (1997), isto pode ser explicado pela presença de uma invertase em estirpes de crescimento rápido, capaz de metabolizar a sacarose pela ausência dessa enzima e da sacarose fosforilase em estirpes de crescimento lento, o que torna inadequado o uso de sacarose para o crescimento de *Bradyrhizobium*.

Tabela 6. Crescimento em diferentes fontes de carbono dos isolados de rizóbios obtidos de nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro em solos de Uberlândia e Unai (Minas Gerais) e das estirpes padrão.

Isolados/ Estirpes ¹	Fontes de carbono									
	S	G	AM	AMe	NA	I	S	A	F	Gl
BR266	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
BR281	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
BR351	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
R82	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SEMIA4077	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
SEMIA4080	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SEMIA4088	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UbAIG10A1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UbAIG10A2	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
UbAIG10A4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UbAIG10A5	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
UbAIG10A6	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
UbAIG10A9	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
UbAIG11A4	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
UbAIG11A5	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
UbAIG1A1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UbAIG1A8	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
UbAIG2A2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
UbAIG2A4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UbAIG3A3	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
UbAIG3A4	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
UbAIG3A5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UbAIG4A10	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
UbAIG4A2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UbAIG4A6	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
UbAIG4A7	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
UbAIG6A3	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
UbAIG6A9	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
UbAIG7A7	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
UbAIG8A1	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
UbAIG8A10	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
UbAIG8A3	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
UbAIG8A5	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
UbAIG9A10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UbAIG9A5	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
UnPaG10A11	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
UnPaG10A12	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
UnPaG10A3	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
UnPaG10A4	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
UnPaG11A1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
UnPaG11A10	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
UnPaG11A2	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
UnPaG11A4	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
UnPaG11A5	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+
UnPaG11A6	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
UnPaG11A7	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
UnPaG11A8	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
UnPaG11A9	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
UnPaG1A1	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
UnPaG1A10	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
UnPaG1A12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UnPaG1A2	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
UnPaG1A9	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
UnPaG2A1	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+

Tabela 6. Cont.

Isolados/ Estirpes ¹	Fontes de carbono									
	S	G	AM	AMe	NA	I	S	A	F	Gl
UnPaG2A10	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
UnPaG2A11	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
UnPaG2A12	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
UnPaG2A3	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
UnPaG2A4	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
UnPaG2A5	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-
UnPaG2A6	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
UnPaG2A9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UnPaG3A1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
UnPaG3A15	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
UnPaG3A17	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
UnPaG3A18	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
UnPaG3A19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UnPaG3A2	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
UnPaG3A20	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UnPaG3A5	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
UnPaG3A6	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
UnPaG3A9	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
UnPaG4A1	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
UnPaG4A12	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
UnPaG4A2	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
UnPaG4A5	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
UnPaG4A6	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
UnPaG4A9	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
UnPaG5A11	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
UnPaG5A12	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
UnPaG5A7	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
UnPaG5A8	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
UnPaG6A10	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
UnPaG6A12	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
UnPaG6A2	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
UnPaG6A5	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
UnPaG6A6	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
UnPaG6A7	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
UnPaG6A9	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-
UnPaG7A1	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
UnPaG7A11	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
UnPaG7A2	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
UnPaG7A3	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
UnPaG7A4	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
UnPaG7A5	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
UnPaG7A6	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
UnPaG7A7	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
UnPaG7A8	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
UnPaG8A1	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
UnPaG8A11	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
UnPaG8A12	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
UnPaG8A2	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
UnPaG8A3	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
UnPaG8A4	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
UnPaG8A7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UnPaG8A8	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+

¹ (UbALGnAn): isolados oriundos de solos da cidade de Uberlândia (Ub), fazenda Água Limpa (AL), genótipo (G) e número do nódulo (A); (UnPaGnAn): isolados oriundos de solos da cidade de Unai (Un), fazenda Paris (Pa), genótipo (G) e número do nódulo (A); e (SEMIA 4077, SEMIA 4080, SEMIA 4088, BR266, BR351, BR281, R82): estirpes de referência. (+) Crescimento; (-) Ausência de crescimento. (S) sacarose, (G) glicose, (AM) ácido málico, (AMe) ácido maleico, (AN) ácido nicotínico, (I) inositol, (S) sorbitol, (A) arabinose, (F) frutose, (Gl) glicerol.

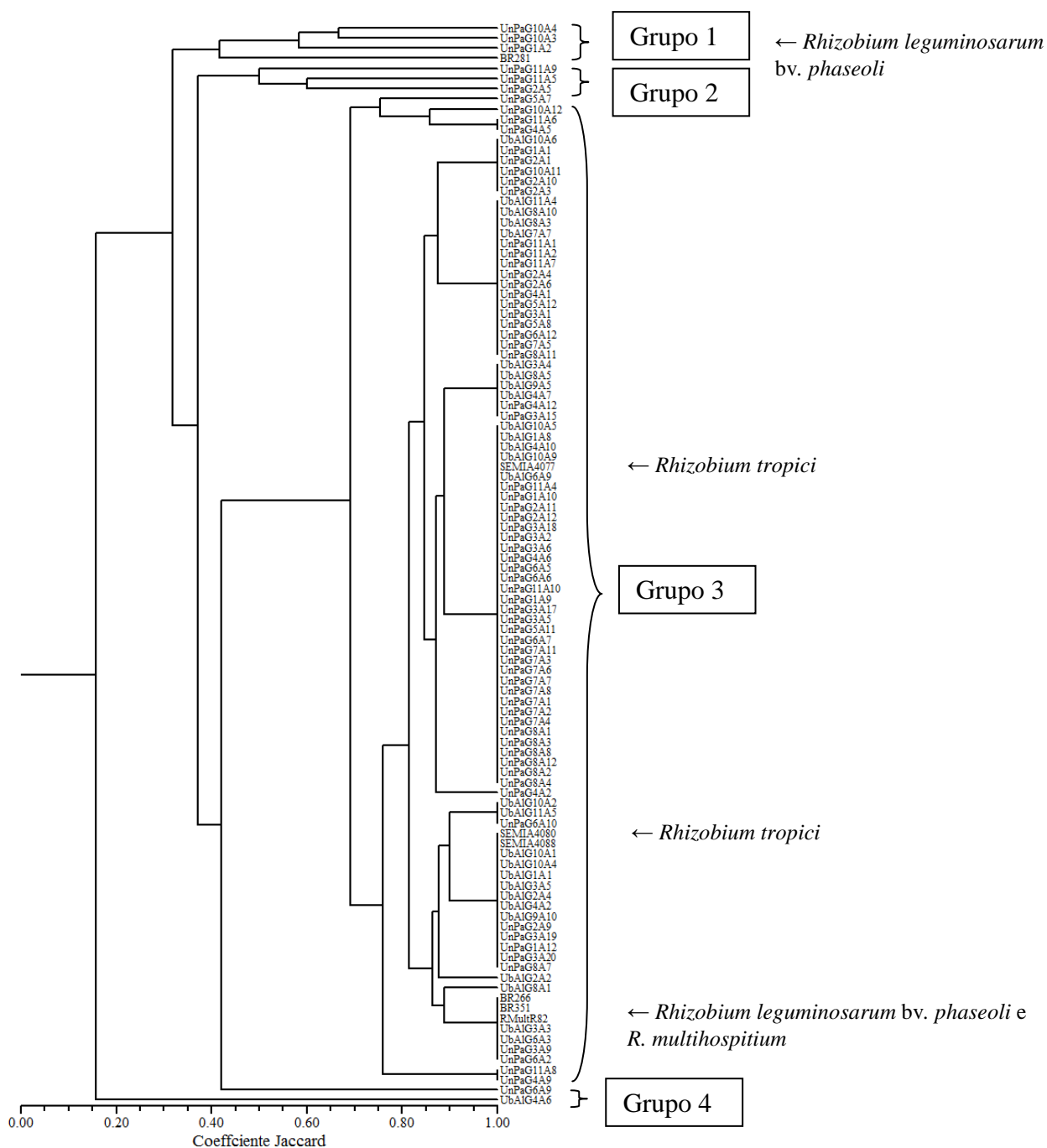


Figura 17. Dendrograma de similaridade construído com base no uso de diferentes fontes de carbono por isolados de rizóbios obtidos de solos de Minas Gerais, usando Jaccard como coeficiente de similaridade e UPGMA como método de agrupamento.

4.2.3 Estado do Paraná (solos provenientes dos municípios de Araucária e Prudentópolis)

Com base nas características morfológicas dos isolados selecionados a partir dos isolados nativos obtidos de genótipos silvestres de feijoeiro e das estirpes-referência

provenientes de solos do estado do Paraná (Araucária e Prudentópolis) (Tabela 7), foi possível agrupá-los em três grupos (Figura 18). Os isolados PCG2A10, PCG8A10, PCG1A6 e PCG1A5 foram semelhantes, com 70% de similaridade, à estirpe referência R82; e os isolados ALSG1A7, ALSG5A3 e PCG4A8 mostraram-se 100% semelhantes à referência BR266, sendo provavelmente também *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Figura 18).

Estes últimos, juntamente com o isolado ALSG5A4 apresentou similaridade entre as estirpes-tipo SEMIA 4080 e SEMIA 4088 de 80%; e o isolado PCG3A2 foi semelhante à referência SEMIA 4077 com 85% de similaridade. Em geral, o grande número de ramificações formado pelos isolados de solos de Paraná indica uma elevada diversidade morfológica entre os isolados obtidos destes solos (Figura 18).

Tabela 7. Características morfológicas dos isolados de rizóbios obtidos de nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro em solos de Araucária e Prudentópolis (Paraná) e das estirpes padrão.

Isolados/ Estirpes ¹	Características morfológicas dos isolados/estirpes											
	VC	pH	DC	AC	BC	FC	EC	CC	TM	QM	EM	CM
ALSG10A8	N	N	1-2	Ho	Ir	Ir	P	B	O	P	P	F
ALSG11A2	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	Mu	P	L
ALSG1A3	N	Al	1-2	Ho	Ir	Ir	E	Am	T	MP	P	L
ALSG1A6	N	A	>2	He	I	Ir	E	Cr	O	Mu	P	L
ALSG1A7	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
ALSG1A9	L	N	>2	He	I	Ir	E	Cr	T	M	M	L
ALSG2A10	N	N	>2	He	I	Ir	E	Am	O	M	P	L
ALSG2A3	N	A	>2	He	I	C	E	Ab	O	Mu	P	L
ALSG2A5	N	N	>2	He	I	C	E	Am	O	Mu	P	L
ALSG2A6	N	A	>2	He	I	C	E	Am	T	Mu	P	L
ALSG2A7	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	Mu	L
ALSG2A9	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	MM	P	L
ALSG3A5	N	A	>2	He	I	Ir	E	Am	O	M	P	L
ALSG4A1	N	N	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
ALSG4A7	R	A	>2	He	I	Ir	E	Am	T	M	P	Aq
ALSG5A1	N	A	1-2	Ho	I	Ir	E	Cr	T	P	P	L
ALSG5A3	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
ALSG5A4	N	A	1-2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
ALSG5A6	N	A	>2	He	I	C	E	Am	T	M	P	L
ALSG5A9	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	Mu	P	L
ALSG6A1	R	N	1-2	Ho	I	Ir	E	Am	O	M	P	L
ALSG6A7	N	A	>2	Ho	I	C	E	B	O	M	P	L
ALSG7A7	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	Mu	P	L
ALSG9A8	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	Mu	P	L
BR266	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
BR281	N	A	>2	Ho	I	C	E	Cr	T	M	P	L
BR351	N	A	>2	Ho	I	C	E	Cr	O	M	P	L
PCG10A6	N	A	>2	He	I	Ir	E	Am	O	Mu	P	Aq
PCG10A7	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	Mu	P	L
PCG1A2	N	A	>2	Ho	I	C	E	Cr	O	Mu	P	L
PCG1A3	R	A	1-2	Ho	I	C	E	Cr	O	M	M	F
PCG1A5	R	A	1-2	Ho	I	C	E	Cr	O	P	P	L
PCG1A6	R	A	1-2	Ho	I	C	E	Cr	O	M	P	L

Tabela 7. Cont.

Isolados/ Estirpes ¹	Características morfológicas dos isolados/estirpes											
	VC	pH	DC	AC	BC	FC	EC	CC	TM	QM	EM	CM
PCG1A8	N	A	1-2	Ho	I	Ir	E	Cr	O	P	Mu	F
PCG1A9	N	A	1-2	Ho	I	C	E	Cr	O	P	P	F
PCG2A10	N	A	1-2	Ho	I	C	E	Cr	O	Mu	P	L
PCG2A2	N	A	1-2	Ho	I	Ir	E	Cr	O	M	P	L
PCG2A5	N	A	>2	Ho	I	Ir	E	Cr	O	Mu	P	L
PCG2A6	N	A	>2	He	I	C	E	Cr	O	M	P	L
PCG2A8	N	A	1-2	Ho	I	Ir	E	Cr	O	M	Mu	L
PCG3A2	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	Aq
PCG3A3	N	A	1-2	He	I	C	E	Cr	O	M	Mu	L
PCG3A6	N	A	1-2	Ho	I	C	E	Cr	O	M	Mu	L
PCG3A7	N	A	1-2	Ho	I	C	E	Cr	O	M	P	F
PCG3A8	N	A	>2	He	I	Ir	E	Am	O	Mu	P	L
PCG4A1	R	A	>2	Ho	I	Ir	E	Cr	O	M	P	L
PCG4A6	N	N	>2	Ho	I	C	E	Cr	O	M	P	L
PCG4A8	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
PCG4A9	N	A	>2	Ho	I	Ir	E	Am	O	Mu	P	L
PCG5A3	N	A	>2	Ho	I	Ir	E	Cr	O	M	P	L
PCG5A5	R	A	1-2	Ho	I	Ir	E	Cr	O	M	P	L
PCG5A6	N	A	>2	Ho	I	Ir	E	Cr	T	M	P	L
PCG5A7	L	N	1-2	Ho	I	Ir	E	Cr	T	MP	P	L
PCG5A8	N	A	>2	Ho	I	C	E	Cr	O	M	P	L
PCG7A1	N	A	>2	He	I	C	E	Am	O	Mu	P	L
PCG7A8	N	A	>2	Ho	I	C	E	Cr	O	Mu	P	L
PCG8A10	R	A	1-2	Ho	I	C	E	Cr	O	Mu	P	L
PCG8A2	N	A	1-2	Ho	I	C	E	Cr	T	P	P	L
PCG8A6	N	A	>2	Ho	I	C	E	Cr	O	Mu	Mu	L
R82	R	N	1-2	Ho	I	C	E	Cr	O	M	P	L
SEMIA4077	R	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	Aq
SEMIA4080	R	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L
SEMIA4088	R	A	>2	He	I	C	E	Am	O	M	P	L

¹ (ALSGnAn): isolados oriundos de solos da cidade de Araucária (A), fazenda Lagoa Suja (LS), genótipo (G) e número do nódulo (A); (PCGnAn): isolados oriundos de solos da cidade de Prudentópolis (P), fazenda Campi (C), genótipo (G) e número do nódulo (A); e (SEMIA 4077, SEMIA 4080, SEMIA 4088, BR266, BR351, BR281, R82): estirpes de referência. (VC) velocidade de crescimento (R-rápido-1 dia, N-normal-2 dias e L-lento-3 dias), pH (A-ácido e N-neutro), (DC) diâmetro da colônia em mm, (AC) aparência da colônia (He-heterogênea e Ho-homogênea), (BC) borda da colônia (I-inteira e Ir-irregular), (FC) forma da colônia (C-circular e Ir-irregular), (EC) elevação da colônia (E-elevado e P-plano), (CC) cor da colônia (Am-amarela, B-branca, Cr-creme e Ab-abóbora), (TM) transparência da massa celular (O-opaco e T-translúcido), (QM) quantidade de muco (MP-muito pouco, P-pouco, M-médio, Mu-muito), (EM) elasticidade do muco (P-pouca, M-média e Mu-muita), (CM) consistência do muco (L-leitoso, Aq-aquoso, F-floculoso e S-seco).

De acordo com a Tabela 7, observa-se que o isolado ALSG1A3, proveniente da cidade de Araucária, Paraná, foi o único que alterou o pH do meio YMA para alcalino, enquanto os demais alteraram para ácido ou neutro. Com isso, este isolado não se enquadra nas características do gênero *Rhizobium*, nem do gênero *Bradyrhizobium* por apresentar crescimento rápido, podendo se enquadrar mais nas características do gênero *Azorhizobium*, de acordo com Lima et al. (2012).

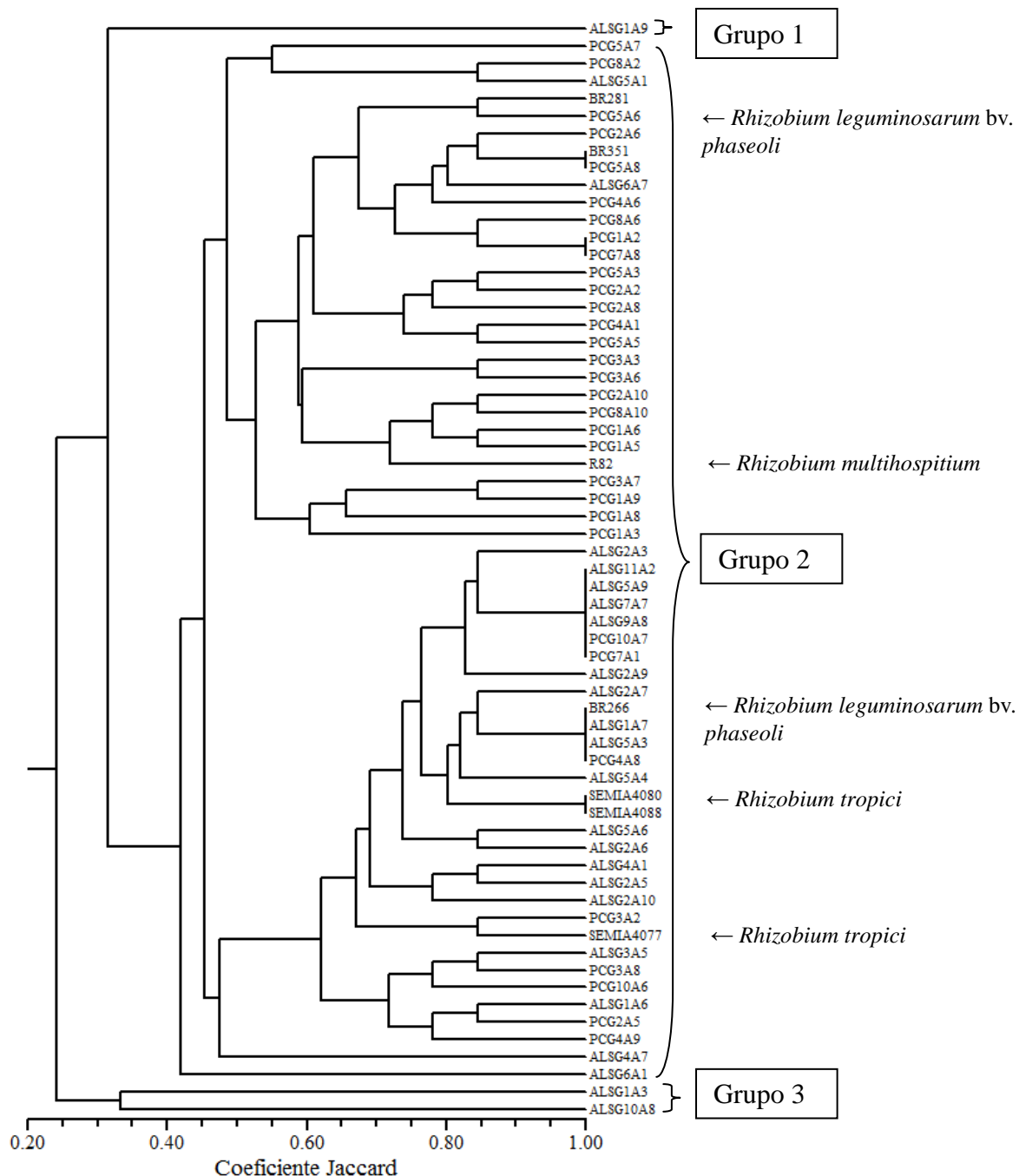


Figura 18. Dendrograma de similaridade construído com base nas características morfológicas de isolados de rizóbios obtidos de solos do Paraná, usando Jaccard como coeficiente de similaridade e UPGMA como método de agrupamento.

Com base nas características dos isolados selecionados e das estirpes-referência quanto ao uso de fontes de carbono provenientes do estado do Paraná (Araucária e Prudentópolis) (Tabela 8), foram definidos quatro grupos (Figura 19). De acordo com a Tabela 8, a fonte de carbono para crescimento dos isolados provenientes de solos do Paraná mais utilizada foi sacarose, utilizada por 55 isolados dos 56 selecionados, que

corresponde a 98% dos isolados. Porém, as outras fontes de carbono, arabinose, frutose, glicose, sorbitol, inositol e glicerol, ácido málico, ácido nicotínico e ácido maleico, também foram bastante utilizadas pelos isolados.

De acordo com o dendrograma, os grupos 1 e 2 foram formados por isolados nativos e não agruparam com nenhuma estirpe referência, com 0% e 20% de similaridade, respectivamente (Figura 19). O grupo 3 foi formado por um isolado e uma referência, com 30% de similaridade, sendo que este isolado, PCG10A6, foi 100% semelhante à referência BR281 (Figura 19), os quais mostraram crescimento com a utilização de sacarose, arabinose e frutose como fontes de carbono (Tabela 8).

Alves (2005) observou que a sacarose e a frutose foram os carboidratos mais facilmente utilizados, pois dentre os 126 isolados avaliados, apenas três não utilizaram esses carboidratos como fonte de carbono para seu crescimento. Giongo (2003), citado por Alves (2005), observou que quatro dos 86 rizóbios isolados de *Phaseolus vulgaris*, não foram capazes de utilizar nenhum dos carboidratos estudados (sacarose, arabinose, galactose e inositol) com exceção do manitol.

Tabela 8. Crescimento em diferentes fontes de carbono dos isolados de rizóbios obtidos de nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro em solos de Araucária e Prudentópolis (Paraná) e das estirpes padrão.

Isolados/ estirpes ¹	Fontes de carbono									
	S	G	AM	AMe	AN	I	S	A	F	Gl
ALSG10A8	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
ALSG11A2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ALSG1A3	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
ALSG1A6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ALSG1A7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ALSG1A9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ALSG2A10	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
ALSG2A3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ALSG2A5	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
ALSG2A6	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
ALSG2A7	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
ALSG2A9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ALSG3A5	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
ALSG4A1	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
ALSG4A7	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
ALSG5A1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ALSG5A3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ALSG5A4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ALSG5A6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ALSG5A9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ALSG6A1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ALSG6A7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ALSG7A7	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
ALSG9A8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BR266	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
BR281	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-

Tabela 8. Cont.

Isolados/ estirpes ¹	Fontes de carbono									
	S	G	AM	AMe	AN	I	S	A	F	Gl
BR351	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
PCG10A6	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
PCG10A7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PCG1A2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PCG1A3	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
PCG1A5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PCG1A6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PCG1A8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PCG1A9	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
PCG2A10	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
PCG2A2	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
PCG2A5	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
PCG2A6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PCG2A8	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
PCG3A2	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
PCG3A3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PCG3A6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PCG3A7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PCG3A8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PCG4A1	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
PCG4A6	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
PCG4A8	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+
PCG4A9	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
PCG5A3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PCG5A5	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
PCG5A6	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
PCG5A7	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+
PCG5A8	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
PCG7A1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PCG7A8	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
PCG8A10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PCG8A2	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
PCG8A6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
R82	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
SEMIA4077	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
SEMIA4080	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SEMIA4088	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

¹ (ALSGnAn): isolados oriundos de solos da cidade de Araucária (A), fazenda Lagoa Suja (LS), genótipo (G) e número do nódulo (A); (PCGnAn): isolados oriundos de solos da cidade de Prudentópolis (P), fazenda Campi (C), genótipo (G) e número do nódulo (A); e (SEMIA 4077, SEMIA 4080, SEMIA 4088, BR266, BR351, BR281, R82): estirpes de referência. (+) Crescimento; (-) Ausência de crescimento. (S) sacarose, (G) glicose, (AM) ácido málico, (AMe) ácido maleico, (AN) ácido nicotínico, (I) inositol, (S) sorbitol, (A) arabinose, (F) frutose, (Gl) glicerol.

O grupo 4 foi formado por isolados nativos e as estirpes referência SEMIA 4080, SEMIA 4088, BR266, BR351, R82 e SEMIA 4077 com 50% de similaridade. As duas primeiras referências foram semelhantes a 27 isolados nativos com 100% de similaridade (Figura 19), apresentando crescimento em todas as fontes de carbono estudadas (Tabela 8). Já os isolados PCG2A10, PCG2A2, PCG2A8, PCG4A6, PCG4A9, PCG7A5, e ALSG10A8 foram 100% semelhantes às estirpes de referência BR266, BR351 e R82, que não mostraram crescimento em meio contendo ácido nicotínico como fonte de carbono (Tabela 8).

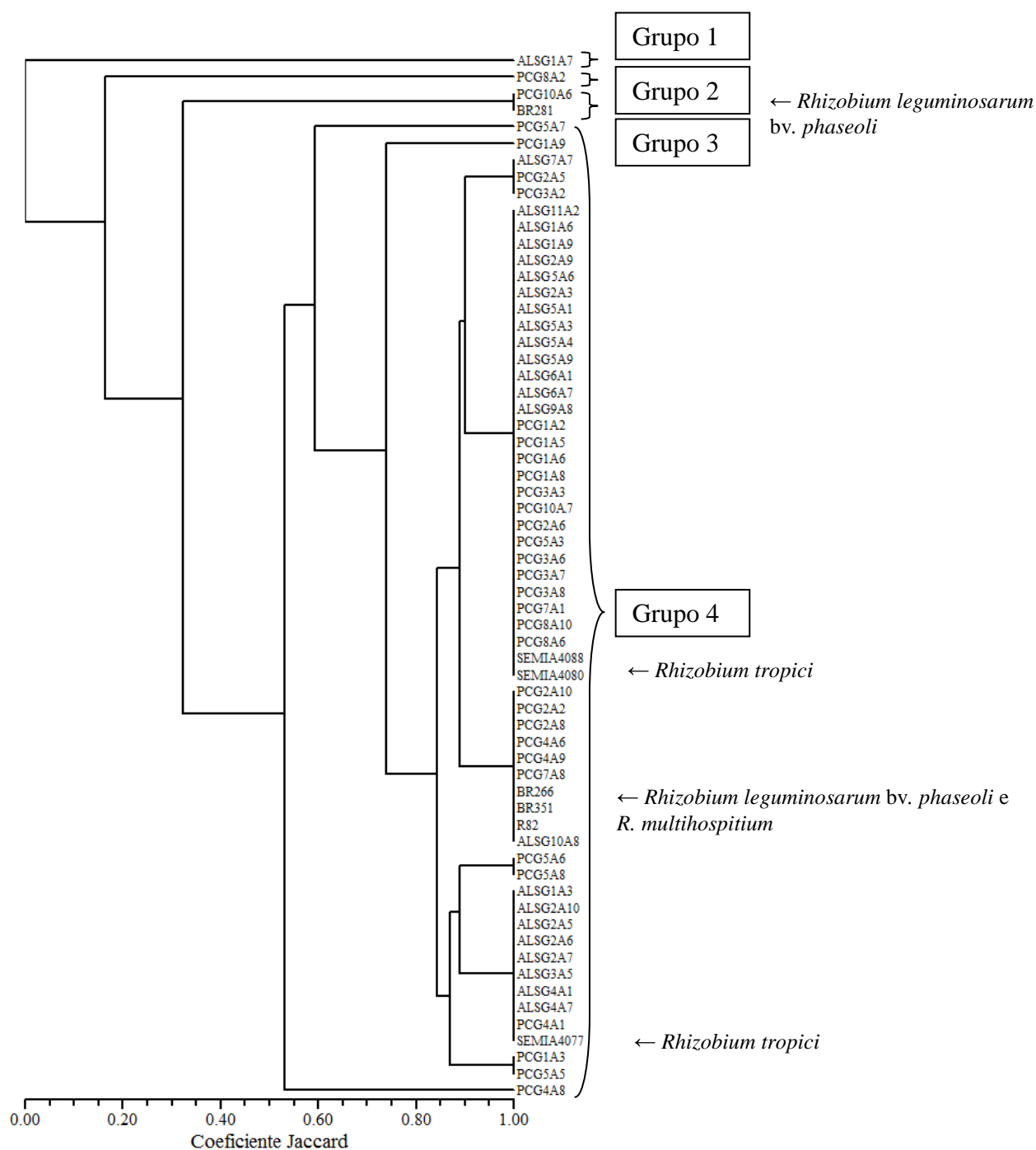


Figura 19. Dendrograma de similaridade construído com base no uso de diferentes fontes de carbono por isolados de rizóbio obtidos de solos do Paraná, usando Jaccard como coeficiente de similaridade e UPGMA como método de agrupamento.

Ainda no grupo 4, os isolados ALSG1A3, ALSG2A10, ALSG2A5, ALSG2A6, ALSG2A7, ALSG3A5, ALSG4A1, ALSG4A7 e PCG4A1 foram semelhantes a estirpe referência SEMIA 4077 com 100% de similaridade, os quais não cresceram em meio com a fonte de carbono ácido maleico. Isto mostra que um maior número de isolados apresentaram características metabólicas semelhantes às estirpes utilizadas como

inoculante do feijoeiro (SEMIA 4077, SEMIA 4080 e SEMIA 4088), revelando um grande potencial para a agricultura. No trabalho de Alves (2005) o carboidrato mais pobremente utilizado foi arabinose, sendo que dos 126 isolados avaliados 52 não foram capazes de utilizar essa fonte de carbono.

De forma geral, em relação à caracterização morfológica, observa-se que o grande número de ramificações formado nos dendrogramas pelos isolados de solos de Goiás e Minas Gerais revela uma maior diversidade fenotípica entre os isolados obtidos destes solos, quando comparados com os isolados obtidos do Paraná. A análise de uso de fontes de carbono revela que os isolados de rizóbios obtidos de solos do estado de Goiás apresentam maior diversidade metabólica, em comparação com Minas Gerais e Paraná.

De forma geral, em relação ao uso de fontes de carbono, o maior número de isolados agrupa com as estirpes padrão, especialmente com as estirpes usadas como inoculante do feijoeiro comum (SEMIA 4080, SEMIA 4088 e SEMIA 4077), indicando que estes isolados apresentam características metabólicas semelhantes a estas estirpes e, portanto, deverão ser avaliadas em ensaios de campo quanto à possibilidade de uso como inoculantes da cultura do feijoeiro comum.

5 CONCLUSÕES

- i. Obteve-se 523 isolados de nódulos de genótipos silvestres de feijoeiro com predominância de isolados que acidificam o meio de cultivo e de crescimento rápido, sendo que os provenientes de solos de Araucária e Prudentópolis produzem maior quantidade de muco que os de Jussara, Nova Veneza, Uberlândia e Unaí.
- ii. Os isolados de rizóbios obtidos de solos do estado de Goiás e Minas Gerais apresentam maior diversidade fenotípica do que aqueles oriundos de solos do Paraná.
- iii. A análise de uso de fontes de carbono revela que os isolados de rizóbios obtidos de solos do estado de Goiás apresentam maior diversidade metabólica.
- iv. De forma geral, o maior número de isolados agrupa com as estirpes padrão, especialmente com as estirpes usadas como inoculante do feijoeiro comum (SEMIA 4080, SEMIA 4088 e SEMIA 4077), indicando que estes isolados apresentam características metabólicas semelhantes a estas estirpes e, portanto, deverão ser avaliadas em ensaios de campo quanto à possibilidade de uso como inoculantes da cultura do feijoeiro comum.

6 REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, B. K. de. **Caracterização da diversidade genética de Teca (*Tectona grandis*) de diferentes procedências usando marcadores microssatélites**. 2009. 93 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)–Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.
- ALVES, J. B. **Seleção de rizóbios para trevo branco**. 2005. 68 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)–Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- ARAUJO, R. S.; RAVA, C. A.; STONE, L. F.; ZIMMERMANN, M. J. O. **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: POTAFOS, 1996. 786 p.
- BALDANI, J. I.; CARUSO, L.; BALDANI, V. L. D.; GOI, S. R.; DÖBEREINER, J. Recent advances in BNF with non-legume plants. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, n. 5/6, p. 911-922, 1997.
- BODDEEY, R. M.; CHALK, P. M.; VICTORIA, R. L.; MATSUI, E.; DÖBEREINER, J. The use of the ¹⁵N isotope dilution technique to estimate the contribution of associated biological nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of *Paspalum notatum* cv. *batatais*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 29, n. 8, p. 1036-1045, 1983.
- BRASIL. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijão/>>. Acesso em: 22 nov. 2012.
- BROMFIELD, E. S. P.; KUMAR RAO, J. V. D. K. Studies on fast and slow growing *Rhizobium* spp. nodulating *Cajanus cajan* and *Cicer arietinum*. **Annals of Applied Biology**, London, v. 102, n. 3, p. 485-493, 1983.
- BUSHBY, H. N. A.; MARSHALL, K. C. Some factors affecting the survival of root nodule bacteria on dessication. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 143-147, 1977.
- CAMPÊLO, A. B. **Caracterização e especificidade de *Rhizobium* spp de leguminosas florestais**. 1976. 122 f. Dissertação (Mestrado)–Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, 1976.
- CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. 360 p.
- CARVALHO, M. A. C; ARF, O; SÁ, M. E.; BUZETTI, S.; SANTOS, N. C. B.; BASSAN, D. A. Z. Produtividade e qualidade de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) sob influência de parcelamentos e de fontes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 25, n. 3, p. 617-624, 2001.

CASTELLANE, T. C. L. **Análise de polissacarídeos essenciais para a nodulação do feijoeiro por *Rhizobium tropici* cultivados em diferentes fontes de carbono.** 2007. 74 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)–Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO AGROPECUÁRIO.

Acompanhamento da safra brasileira. Disponível em:

<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_09_06_09_18_33_boletim_graos_-_setembro_2012.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2012.

CRUZ, L. M.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, J. I. Expressão fenotípica de estirpes de *Acetobacter diazotrophicus* contendo o gene nifA de *Azotobacter vinelandii*. In: REUNIÃO ANUAL DE GENÉTICA DE MICROORGANISMOS, 20., 1995, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética, 1995. p. 116.

DREYFUS, B.; GARCIA, J. L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbani rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v. 38, n. 1, p. 89-98, 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. 212 p.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Cultivo do feijoeiro comum.** Disponível em:

<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/>>. Acesso em: 20 out. 2012.

EVANS, H. J.; BURRIS, R. H. Highlights in biological nitrogen fixation during the last 50 years. In: STACEY, G.; BURRIS, R. H.; EVANS, H. J. (Ed.). **Biological nitrogen fixation.** New York: Chapman and Hall, 1992. p. 1-42.

FERREIRA, E. P. de B.; VOSS, M.; SANTOS, H. P. dos; DE-POLLI, H.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Diversidade de *Pseudomonas* fluorescentes em diferentes sistemas de manejo do solo e rotação de culturas. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 4, n. 2, p. 140-148, 2009.

FRANCO, A. A.; DÖBEREINER, J. A. A biologia do solo e a sustentabilidade dos solos tropicais. **Summa Phytopathológica**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 68-74, 1994.

FRED, E. B.; BALDWIN, I. L.; MCCOY, E. **Root nodule bacteria of leguminous plants.** Madison: The University of Wisconsin Press, 1932. 343 p.

FREITAS, A. D. S. de; VIEIRA, C. L.; SANTOS, C. E. de R. e S.; STAMFORD, N. P.; LYRA, M. do C. C. P. de. 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.

FRIZZO, M. L. dos S. **Seleção e caracterização de rizóbios nativos, de solos do Rio Grande do Sul, para *Lotus corniculatus* L. e *Lotus uliginosus* Schkuhr.** 2007. 81 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)–Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

FUHRMANN, J. Symbiotic Effectiveness of Indigenous Soybean Bradyrhizobia as Related to Serological, Morphological, Rhizobitoxine, and Hydrogenase Phenotips. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 1, p. 224-229, 1990.

GRAHAM, P. H. The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria of legumes. **Journal of General and Microbiology**, London, v. 35, n. 3, p. 511-517, 1964b.

GRAHAM, P. H.; DRAEGER, K. J.; FERREY, M. L.; CONROY, M. J.; HAMMER, B. E.; MARTÍNEZ, E.; AARONS, S. R.; QUINTO, C. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR11899. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 40, n. 3, p. 198-207, 1994.

HALLIDAY, J. **Field responses by tropical pasture legumes to inoculation with *Rhizobium*.** Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), 1978. 10 p.

HARRIS, R. F. Effect of water potential on microbial growth and activity. In: PARR, J. F.; GARDNER, W. R.; ELLIOTT, L. F. (Ed.). **Water Potential Relations in Soil Microbiology.** Madison: Soil Science Society of America, 1981. p. 23-95.

HERRIDGE, D. F.; ROUGHLEY, R. J. Variation in colony characteristics and symbiotic effectiveness of *Rhizobium*. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 38, n. 1, p. 19-27, 1975.

HUNGRIA, M. Coleta de nódulos e isolamento de rizóbio. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. (Ed.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola.** DF: Embrapa–SPI; Santo Antônio de Goiás: Embrapa-CNPAF. 1994. p. 45-61, (Embrapa-CNPAF. Documentos, 46).

HUNGRIA, M.; FRANCO, A. A.; SPRENT, J. I. New sources of high-temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris* L.. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 149, n. 1, p. 103-109, 1993.

HUNGRIA, M.; STACEY, G. Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: basic aspects and potential application in agriculture. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, n. 5-6, p. 819-830, 1997.

JORDAN, D. C. *Rhizobiaceae*. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. v. 1, p. 234-256.

CHAGAS JUNIOR, A. F.; OLIVEIRA, L. A. de; OLIVEIRA, A. N. de. Caracterização fenotípica de rizóbio nativos isolados de solos da Amazônia e eficiência simbiótica em feijão caupi. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 1, p. 161-169, 2010.

LIMA, A. A. de; JÚNIOR, P. I. F.; PASSOS, S. R.; PAULO, F. S. de; NOSOLINE, S. M.; FARIA, S. M. de; GUERRA, J. G. M.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R. Diversidade e capacidade simbiótica de rizóbios isolados de nódulos de mucuna-cinza e mucuna-anã. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 36, n. 2, p. 337-348, 2012.

LOVATO, P. E. **Sobrevivência e competição de estirpes de *Rhizobium phaseoli* em solo e na rizosfera de feijão**. 1984. 96 f. Dissertação (Mestrado)–Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1984.

MARIN, V. A.; BALDANI, V. L. D.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, J. I. **Fixação biológica de nitrogênio: bactérias fixadoras de nitrogênio de importância para a agricultura tropical**. Seropédica: Embrapa-CNPAB, 1999. 24 p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 91).

MARSHALL, K. C. Survival of root nodule bacteria in dry soils exposed to high temperatures. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 15, n. 2, p. 273-281, 1964.

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

MARTINS, L. M. V. **Características ecológicas e fisiológicas de rizóbio que nodula caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) isolados a partir de solos da região nordeste do Brasil**. 1996. 213 f. Dissertação (Mestrado)–Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1996.

MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. **Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de rizóbio**. Seropédica: Embrapa-CNPAB, 1997. 14 p. (Embrapa-CNPAB. Comunicado Técnico, 19).

MEDEIROS, E. V. de; MARTINS, C. M.; LIMA, J. A. M.; FERNANDES, Y. T. D.; OLIVEIRA, V. R. de; BORGES, W. L. Diversidade morfológica de rizóbios isolados de caupi cultivado em solos do estado do Rio Grande do Norte. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 31, n. 3, p. 529-535, 2009.

MERCANTE, F. M. **Uso de *Leucaena leucocephala* na obtenção de *Rhizobium* tolerante a temperatura elevada para inoculação do feijoeiro**. 1993. 149 f. Dissertação (Mestrado)–Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, 1993.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Feijão**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/feijao>>. Acesso em: 22 nov. 2012.

MOREIRA, F. M. S. & SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2.ed. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2006. 729 p.

- MYTTON, L. R. Developing a breeding strategy to exploit quantitative variation in symbiotic nitrogen fixation. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 82, n. 3, p. 329-335, 1984.
- NODARI, R. O.; TSAI, S. M.; GUZMÁN, P.; GILBERTSON, R. L.; GEPTS, P. Toward an integrated linkage map of common bean. III. Mapping genetic factors controlling host-bacteria interactions. **Genetics**, Maryland, v. 134, n. 1, p. 341-350, 1993.
- NORRIS, D. O. Acid production by Rhizobium a unifying concept. **Plant and Soil**, The Hague, v. 22, n. 2, p. 23-28, 1990.
- ROHLF, F. J. **NTSYS-pc**: numerical taxonomy and multivariate analysis system. New York: Exeter Publications, 1993.
- ROMERO-ANDREAS, J.; YANDELL, B. S.; BLISS, F. A. Bean arcelin, I. Inheritance of a novel seed protein of *Phaseolus vulgaris* L. and its effect on seed composition. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 72, n. 1, p. 123-128, 1986.
- ROSTON, A. J. **Feijão**. Campinas: CATI, 1990. 18 p. (CATI. Boletim Técnico, 199).
- RUIZ, H. A. **Efeito do conteúdo de água sobre o transporte de fósforo em dois Latossolos**. 1986. 86 p. Tese (Doutorado)–Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1986.
- SALVADOR, C. A. **Análise da conjuntura agropecuária safra 2011/12 Feijão**. Paraná: Secretaria da Agricultura e do Abastecimento, Departamento de Economia Rural, 2011. 16 p.
- SILVA, V. N. da; SILVA, L. E. de S. F. da; FIGUEIREDO, M. do V. B.; CARVALHO, F. G. de; SILVA, M. L. R. B. da; SILVA, A. J. N. da. Caracterização e seleção de populações nativas de rizóbios de solo da região semi-árida de Pernambuco. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 37, n. 1, p. 16-21, 2007.
- SOARES, A. L. de; FERREIRA, P. A. A.; PEREIRA, J. P. A. R.; VALE, H. M. M. do; LIMA, A. S.; ANDRADE, M. J. B. de; MOREIRA, F. M. de S. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). II – feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, n. 5, p. 16-21, 2006.
- SPRENT, J. Evolution and diversity in the legume-rhizobium symbiosis: chaos theory? **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 161, n.1, p. 1-10, 1994.
- STRALIOTTO, R.; CUNHA, C. de O.; MERCANTE, F. M.; RUMJANEK, N. G.; FRANCO, A. A. Genotypic diversity of rhizobia nodulating common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) isolated from Brazilian tropical soils. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS – THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, 1995, Angra dos Reis. **Abstracts...** Angra dos Reis: Embrapa-CNPBS, 1995. p. 185-186.
- TAN, I. K. P.; BROUGHTON, W. J. Rhizobia in tropical legumes. XIII. Biochemical basis of acid and alkali reactions. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 13, n. 5, p. 389-393, 1981.

TAN, I. K. P.; BROUGHTON, W. J. Rhizobia in tropical legumes. XIV. Ion uptake differences between fast- and slow-growing strains. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 14, n. 3, p. 295-299, 1982.

VAN GESTEL, M.; LADD, J. N.; AMATO, M. Carbon and nitrogen mineralization from two soils of contrasting texture and microaggregate stability: influence of sequential fumigation, drying and storage. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 23, n. 4, p. 313-322, 1991.

VAN RENSBURG, H. J.; STRIJDOM, B. W. Survival of fast and slow growing *Rhizobium* spp. under conditions of relatively mild dissection. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 353-356, 1980.

VARGAS, A. A. T.; GRAHAM, P. H. Cultivar and pH effects on competition for nodule sites between isolates of *Rhizobium* in beans. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 117, n. 2, p. 195-200, 1989.

VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1997. 524 p.

VIEIRA, C.; PAULA J. R. T. J. de; BORÉM, A. **Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas Gerais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1998. 596 p.

YAMADA, T.; ABDALLA, S. R. S.; VITTI, G. C. **Nitrogênio e Enxofre na Agricultura Brasileira**. Piracicaba: International Plant Nutrition Institute – Brasil, 2007. 722 p.