

**PRISCILA STOCCO**

**BIODIVERSIDADE DE RIZÓBIOS MICROSSIMBIONTES DO  
FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.) EM REGIÕES PRODUTORAS DO  
ESTADO DE SANTA CATARINA**

**LAGES - SC**

**2006**

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA - UDESC**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV**  
**DEPARTAMENTO DE SOLOS**

**PRISCILA STOCCO**

**BIODIVERSIDADE DE RIZÓBIOS MICROSSIMBIONTES DO  
FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.) EM REGIÕES PRODUTORAS DO  
ESTADO DE SANTA CATARINA**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência do Solo.

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Pires Santos  
Co-orientador: Dr<sup>a</sup>. Mariangela Hungria

**LAGES – SC**  
**2006**

**PRISCILA STOCCO**

**BIODIVERSIDADE DE RIZÓBIOS MICROSSIMBIONTES DO  
FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris L*) EM REGIÕES PRODUTORAS DO  
ESTADO DE SANTA CATARINA**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência do Solo.

**Banca Examinadora:**

**Orientador:**

---

**Dr. Julio Cesar Pires Santos**  
UDESC

**Co-orientador:**

---

**Dr<sup>a</sup>. Mariangela Hungria**  
EMBRAPA - Soja

**Membro:**

---

**Dr. Fernando Gomes Barcellos**  
EMBRAPA - Soja

**Membro:**

---

**Dr. Osmar Klauberg Filho**  
UDESC

**Londrina, 15/12/2006**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, razão de toda existência.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Julio Cesar Pires Santos que sempre me atendeu com muita dedicação e carinho. As suas lições e a sua capacidade de doação revelaram-no um professor e uma pessoa muito especial.

Meu especial agradecimento a Dra. Mariangela Hungria que aceitou o desafio de me orientar, pela atenção, dedicação, amizade, compreensão, confiança e constante incentivo. Sem a sua disponibilidade e empenho não seria possível à realização deste trabalho.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À EMBRAPA Soja, pela estrutura que me foi concedida para a realização deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia do Solo: Adalgisa, Alan, Daisy, Eliana, Fabiana, Fábio Mostasso, Fábio Plotegher, Fernando, Glaciela, Jesiane, Leandro, Leny, Lígia, Lucas, Maria, Michele, Nágila, Pâmela, Renan Oliveira, Renan Ribeiro, Rinaldo, Rosinei, Susan e Dr. Rubens, pessoas sem as quais grande parte do meu trabalho não seria possível.

À Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Departamento de Solos pela oportunidade de realização deste curso.

Aos professores do curso de Ciência do Solo, em especial, Jaime, Jackson e Paulo Ernani, pelos conhecimentos compartilhados.

Ao Dr. Osmar Klauberg Filho, por ter me iniciado na pesquisa e pela amizade.

À Eliana, Pâmela, Alan, Fábio Mostasso e Fábio Plotegher por tudo que me ensinaram e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Ao Diego, pela amizade e contribuição para com este trabalho.

Ao bolsista de iniciação científica, Vitor, pela colaboração na realização deste trabalho, meu muito obrigado.

Aos funcionários da UDESC-CAV Alcir, Fátima e Henrique pela colaboração.

Aos colegas, Alex, Alexandre, Anderson, Carlos, Dário, Denis, Fernando, Ivan, Janaína e Maurício, pela contribuição, boa vontade e dedicação nos experimentos a campo.

Aos meus pais, em especial minha mãe, por acreditar nos meus sonhos, pela confiança, proteção e muito amor com que sempre me envolveu.

As minhas irmãs, Camila e Caroliny pelo apoio e incentivo.

Ao meu noivo, Bruno, sempre presente com seu amor, apoio e compreensão.

A Cleusa, Brian, Michele, Daiane, Marcos e Kell pessoas importantes no conjunto que cerca minha vida.

À Adelina e Tatiana amigas de todas as horas, pela amizade, apoio durante os momentos difíceis, e pelos seus conselhos e ajudas frente aos problemas enfrentados.

A Glaciela pela disponibilidade em ajudar, pela paciência em me ensinar, pelo seu incentivo e pela amizade dedicada.

À Ana Carolina de Souza, Ana Carolina Fiúza, Clara, Gabriela, Jéssica, Lígia, Mariana Ebert, Mariana Passoni e Natália pela convivência divertida, as boas risadas e a companhia.

## RESUMO

No Brasil, o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) ocupa um lugar de destaque na agricultura, pois os grãos representam uma fonte importante de proteínas e minerais para a população. Como ocorre com outras leguminosas, o feijoeiro apresenta a capacidade de se associar simbioticamente com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ), a maioria classificada no gênero *Rhizobium*. Em geral, os solos brasileiros apresentam uma população abundante de rizóbios capazes de nodular e fixar  $N_2$  quando em simbiose com o feijoeiro, contudo, a diversidade dessas bactérias ainda é pouco conhecida. Este trabalho teve, por objetivo, avaliar a diversidade de rizóbios associados ao feijoeiro em três regiões do Estado de Santa Catarina, onde predomina a agricultura familiar, praticada em pequenas propriedades. Foram obtidos 117 isolados, provenientes de 23 áreas do extremo-oeste, do meio-oeste e do planalto sul de Santa Catarina. Com base nas propriedades morfo-fisiológicas, os isolados foram classificados em nove grupos. Pela análise do DNA dos isolados após a amplificação com um "primer" (BOX) que codifica regiões conservadas e repetidas do genoma, foi possível constatar um grau elevado de diversidade genética, com a obtenção de 107 perfis distintos; além disso, as populações de rizóbios diferiram em cada uma das três regiões de Santa Catarina. Pela técnica de PCR-RFLP do gene ribossomal 16S, seguida pela digestão com três enzimas de restrição, foram obtidos 13 agrupamentos, que poderiam indicar a ocorrência de espécies distintas ou até gêneros distintos. Embora tenha ocorrido a predominância da espécie *R. etli*, os resultados indicam que novas espécies ainda não

descritas devem estar presentes nos solos de Santa Catarina. O conhecimento dessa diversidade é fundamental, não só para o avanço no conhecimento, como também para delinear estratégias visando incrementar a contribuição do processo biológico para a nutrição nitrogenada do feijoeiro.

**Palavras-chave:** *Phaseolus vulgaris. Rhizobium. Diversidade.*

## ABSTRACT

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) occupies a major position in Brazilian agriculture, as the grains represent an important source of proteins and minerals for the population. Common bean may establish a symbiotic relation with bacteria capable of fixing atmospheric nitrogen ( $N_2$ ), the majority classified into the genus *Rhizobium*. In general the Brazilian soils show an abundant population of rhizobial bacteria capable of nodulating and fixing  $N_2$  with common bean, however, their diversity is still poorly known. The aim of this study was to evaluate the diversity of common bean rhizobia in three regions of the State of Santa Catarina, southern Brazil, where there is a predominance of familiar agriculture performed in small properties. A total of 117 isolates were obtained from 23 areas of the extreme-west, middle-west and southern plateau of Santa Catarina. Based on morphophysiological properties, the isolates were classified into nine groups. The DNA analysis, after the amplification with the BOX primer, which encodes for conserved and repetitive

regions of the genome, detected a high level of genetic diversity, with 107 different profiles. Furthermore, the rhizobial population differed in each of the three regions of Santa Catarina. When the DNA of the isolates was amplified with primers encoding for the ribosomal 16S gene, followed by the digestion with three restriction enzymes, 13 groups were obtained that could be related to different species or genera. Although there was a predominance of *R. etli* in all three regions, the results indicate that new and still undescribed species must be present in the soils of Santa Catarina. The study and detection of rhizobial diversity is fundamental not only for increasing the scientific knowledge, but also to enable the establishment of new strategies towards increasing the contribution of the biological N<sub>2</sub> fixation process to the common bean nutrition.

**Keywords:** *Phaseolus vulgaris*. *Rhizobium*. Diversity.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 - Localização geográfica das áreas coletadas no estado de Santa Catarina .....	24
Figura 2 - Dendrograma obtido pela análise dos produtos de amplificação BOX A1R-PCR, com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J) .....	37
Figura 3 - Dendrograma obtido pela análise dos produtos de amplificação BOX A1R-PCR, com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J) de isolados de feijoeiro da região 1 do estado de Santa Catarina .....	38
Figura 4 - Dendrograma obtido pela análise dos produtos de amplificação BOX A1R-PCR, com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J) de isolados de feijoeiro da região 2 do estado de Santa Catarina .....	37

Figura 5 - Dendrograma da obtido pela análise dos produtos de amplificação BOX A1R-PCR, com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J) de isolados de feijoeiro da região 3 do estado de Santa Catarina .....	38
Figura 6 - Dendrograma obtido pela análise por RFLP-PCR da região 16S rRNA com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J).....	42

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição geográfica e dados climáticos dos locais de coleta, no ano de 2005 <sup>a</sup> .....	25
Tabela 2 - Procedência, classificação e propriedades químicas dos solos do estado de Santa Catarina .....	26
Tabela 3 - Procedência e número de isolados no estado de Santa Catarina.....	33
Tabela 4 - Morfologia das colônias e de pH em meio YMA de rizóbios microssimbiontes de feijoeiro do estado de Santa Catarina. Caracterização realizada aos três dias de crescimento..	34

Tabela 5 - Perfis de RFLP-PCR da região 16S rRNA em isolados de rizóbios de feijoeiro do estado de Santa Catarina .....	43
---	----

## SUMÁRIO

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	14
1.1. A CULTURA DO FEIJOEIRO .....	14
1.2. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO.....	15
1.3. CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE N <sub>2</sub> COM A CULTURA DO FEIJOEIRO.....	17
1.4. ANÁLISES FILOGENÉTICAS PARA A DETERMINAÇÃO DA DIVERSIDADE DE RIZÓBIOS.....	19
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
2.1. ESTIRPES UTILIZADAS COMO REFERÊNCIAS .....	23
2.2. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFO-FISIOLÓGICA DOS ISOLADOS DE RIZÓBIOS .....	23
2.3. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA .....	27
2.3.1. Extração de DNA dos isolados de rizóbio.....	27
2.3.2. BOX A1R-PCR.....	29
2.3.3. RFLP-PCR da região 16S rRNA .....	30
3. RESULTADOS .....	32
3.1. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFO-FISIOLÓGICA DOS RIZÓBIOS...32	
3.2. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS RIZÓBIOS POR <i>REP</i> -PCR .....	34
3.3. CARACTERIZAÇÃO DO GENE RIBOSSOMAL DA REGIÃO 16S .....	40

4. DISCUSSÃO .....	44
CONCLUSÕES.....	46
REFERÊNCIAS .....	48

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. A CULTURA DO FEIJOEIRO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é cultivado em todo o território nacional (Meireles *et al.*, 2000). Caracteriza-se, nutricionalmente, como uma fonte importante de proteínas para a população brasileira, destacando-se, ainda, pela presença de aminoácidos essenciais (Velasquez *et al.*, 1988) e de minerais como o Ca, Mg, P, Fe e Zn (Martín-Cabrejas *et al.*, 1997). É uma das leguminosas mais importantes na alimentação humana, sendo o seu consumo vantajoso por exercer efeito complementar às proteínas dos demais cereais, por exemplo, o arroz (Lajolo *et al.*, 1996).

A maior parte da área cultivada com feijoeiro no Brasil localiza-se em solos ácidos, pouco férteis e cultivados com baixo nível de tecnologia, resultando nos baixos rendimentos verificados na cultura. Nesse quadro, o fornecimento adequado de nutrientes, particularmente o N e o P, representa um dos fatores limitantes à obtenção de maiores rendimentos no Brasil (Araujo, 1994).

O cultivo dessa leguminosa no Brasil é difundido, principalmente, em pequenas propriedades. Nesse contexto, a agricultura familiar no Brasil representa 85,2% do total dos estabelecimentos, que ocupam 30,5% do território nacional e são responsáveis por 37,9% do valor bruto da produção agropecuária nacional (INCRA/FAO, 2000). Conforme o levantamento do INCRA/FAO (2000), do valor bruto da produção agropecuária nacional, 67% da cultura do feijão é produzido nos estabelecimentos da agricultura familiar. No estado de Santa Catarina a agricultura é tipicamente familiar, representando 90,5% do total dos

estabelecimentos. Os agricultores familiares de Santa Catarina possuem 60% da área agrícola e respondem por 71,3% do valor bruto da produção agropecuária catarinense (FETAESC, 2006).

## 1.2. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO

O N é um dos elementos mais abundantes da Terra, constituindo quase 80% dos gases atmosféricos. Nenhum animal ou planta, porém, é capaz de utilizá-lo como fonte protéica, pois o N encontra-se sob a forma gasosa de N<sub>2</sub>, uma molécula formada por dois átomos de N unidos por uma tripla ligação extremamente estável e que requer uma elevada energia de ativação para que venha a reagir com outros elementos (Araujo, 2006).

As principais formas de disponibilização de nitrogênio às plantas são: 1) o solo, através da decomposição da matéria orgânica, porém, este recurso é esgotado rapidamente após alguns cultivos; 2) os fertilizantes nitrogenados, representando a forma de assimilação mais fácil, mas a um elevado custo econômico e ambiental; 3) a fixação não-biológica, resultante de processos naturais, principalmente de descargas elétricas, combustão e vulcanismo; 4) a fixação biológica de N<sub>2</sub>, principal via de incorporação do N à biosfera (Hungria *et al.*, 2001).

A fixação biológica do N<sub>2</sub> (FBN) ocorre através da associação entre plantas hospedeiras e organismos fixadores de N<sub>2</sub>, que transformam o N<sub>2</sub> em formas assimiláveis para as plantas, através do complexo enzimático denominado de dinitrogenase, que é composto por duas unidades protéicas, a Fe-proteína e a Mo-Fe-proteína e que, auxiliadas pela ferridoxina, reduzem o N<sub>2</sub> a amônia (NH<sub>3</sub>) (Morgante, 2003).

A principal contribuição da FBN ocorre pela associação mais estreita entre a planta hospedeira e bactérias fixadoras de N<sub>2</sub>, denominada simbiose. Essa associação é caracterizada

pela formação de novos órgãos, usualmente nas raízes, denominados nódulos. No interior desses órgãos, formas diferenciadas de rizóbios fixam N<sub>2</sub> utilizando energia dos fotossintatos fornecidos pela planta hospedeira e produzem amônia (NH<sub>3</sub>), que é transformada em NH<sub>4</sub><sup>+</sup> e liberada para a planta hospedeira (Schultze & Kondorosi, 1998).

A simbiose inicia-se com a troca de sinais moleculares, ativando genes dos dois parceiros, liberando substâncias com propriedades quimiotáticas pelas raízes hospedeiras, atraindo e estimulando a multiplicação dessas bactérias na rizosfera e induzindo à transcrição dos genes essenciais à nodulação, *nod*, *nol* e *noe* (Hungria *et al.*, 1997). Esses genes codificam a produção dos fatores de nodulação, ou fatores Nod, que são oligossacarídeos lipoquitínicos secretados pelas bactérias simbióticas, relacionados aos estágios iniciais de nodulação. Os fatores Nod, mediante reconhecimento pela planta, induzem a uma intensa divisão celular no córtex da raiz (Morgante, 2003).

As bactérias colonizam a rizosfera, multiplicando-se ao redor dos pêlos radiculares, resultando na formação de raízes curtas e grossas, bem como no encurvamento e no aumento no número de pêlos radiculares. Em seguida, as bactérias degradam uma porção da parede celular na região encurvada dos pêlos radiculares e o plasmalema começa a invaginar. Com isso, ocorre a restauração da parede celular, resultando na formação de um canal, originando o cordão de infecção (Morgante, 2003; Hungria *et al.*, 1997; Hungria *et al.*, 1994). O cordão de infecção cresce em direção às células em divisão no córtex da raiz, até atingir o primórdio do nódulo, que se diferencia em nódulos maduros e as bactérias são liberadas dentro do citoplasma da planta hospedeira. A seguir, as bactérias são envoltas por uma membrana, no interior da qual param de se multiplicar, aumentam de tamanho e sofrem várias alterações bioquímicas, sendo diferenciados em bacterióides, formas capazes de fixar N<sub>2</sub> (Morgante, 2003; Schultze & Kondorosi, 1998; Hungria *et al.*, 1997).

Com esse mecanismo alternativo é possível economizar em fertilizantes nitrogenados, diminuir a poluição de rios, lagos e lençóis subterrâneos, além de aumentar a produtividade de muitas culturas (Drozdowicz, 1997; Hungria *et al.*, 1997).

### 1.3. CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE N<sub>2</sub> COM A CULTURA DO FEIJOEIRO

A taxonomia é, freqüentemente, usada como um sinônimo para sistemática e consiste na classificação, nomenclatura e identificação de um organismo (Cowan, 1968).

A classificação é o arranjo dos organismos em grupos (táxons), com base em similaridades, enquanto que a nomenclatura é a determinação de nomes para os grupos taxonômicos, de acordo com as regras internacionais descritas pelo “*International Code of Nomenclature of Bacteria*” (Sneath, 1992). Já a identificação é o uso prático da classificação, e determina a identidade de um isolado como membro, ou não, de uma unidade. A classificação bacteriana consiste de diversos níveis, o maior deles denominado de Domínio. Todos os procariotos estão posicionados em dois Domínios, *Archae* e *Bacteria*. Para cada Domínio são descritos os Filos, as Classes, as Ordens, as Famílias, os Gêneros, as Espécies e as subespécies.

Níveis mais altos, tais como Filo, Classe, Ordem, Família e Gênero, têm sido classificados com base nas seqüências de nucleotídeos do gene ribossomal 16S. A determinação de espécies, entretanto, permanece incerta, sendo que análises de similaridades entre DNA-DNA, seqüências de nucleotídeos do gene 16S RNAr e características fisiológicas vêm sendo utilizadas a fim de caracterizar uma dada espécie. Contudo, não há, até o presente momento, uma determinação precisa quanto à especiação em bactérias (Brenner *et al.*, 2000).

No caso das bactérias simbióticas fixadoras de N<sub>2</sub>, existem, hoje, vários gêneros descritos: *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Burkholderia* e *Methylobacterium*. Tradicionalmente, essas bactérias vêm sendo chamadas, coletivamente, de “rizóbios”.

A classificação taxonômica dos rizóbios foi, inicialmente, baseada em sua especificidade hospedeira. Como exemplo, as bactérias que nodulam o feijoeiro foram classificadas como *Rhizobium phaseoli*. A classificação posterior para os rizóbios, proposta por Jordan (1984), considerou as características morfo-fisiológicas, genéticas e a especificidade hospedeira. Piñero *et al.* (1988) sugeriram que uma classificação biologicamente mais representativa de *Rhizobium* spp. deveria ser baseada em critérios genéticos e evolucionários que refletissem a similaridade total das estirpes e suas prováveis linhas genealógicas de evolução.

Na classificação de Jordan (1984), o gênero *Rhizobium* é caracterizado como bactérias de crescimento rápido em meio de cultura específico e todas as estirpes de rizóbios isoladas do feijoeiro passaram a pertencer à espécie *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. No entanto, este novo arranjo taxonômico não foi totalmente aceito, havendo várias evidências de que deveriam existir novas espécies.

Foram, então, conduzidos estudos que levaram à separação das estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* em dois grupos, tipo I e tipo II (Martínez *et al.*, 1985). Logo a seguir, as estirpes do tipo II foram definidas como *R. tropici* (Martínez-Romero *et al.*, 1991), espécie que foi subdividida em IIA e IIB, com uma estirpe de referência do subgrupo IIA, a CFN 299 e, para o tipo IIB a estirpe tipo CIAT 899.

Em 1991, Segovia e colaboradores observaram que as estirpes americanas de sua coleção formavam um agrupamento separado de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, sugerindo, então, que todos os isolados americanos obtidos de nódulos de feijoeiro passassem a ser

denominados de *Rhizobium* sp. tipo I. A seguir, Segovia *et al.* (1993) sugeriram uma nova espécie, *Rhizobium etli*, tendo pelo menos um biovar, *Rhizobium etli* bv. *phaseoli*, com a estirpe tipo CFN 42 (USDA 9032). A partir de então, ficou determinado que a espécie *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* deveria ser usada somente para estirpes que estivessem estreitamente relacionadas aos genes cromossomais de outros biovars desta espécie (Hungria *et al.*, 1997).

Posteriormente, na França, estudos de diversidade de rizóbios microssimbiontes do feijoeiro levaram à descrição de novas espécies e biovars, *R. gallicum* bv. *gallicum* e bv. *phaseoli* e *R. giardinii* bv. *giardinii* e bv. *phaseoli* (Amarger *et al.*, 1997).

#### 1.4. ANÁLISES MOLECULARES PARA A DETERMINAÇÃO DA DIVERSIDADE DE RIZÓBIOS

Conforme discutido por Wang & Martínez-Romero (2000), uma poderosa ferramenta para a taxonomia de um determinado organismo é o estudo da filogenia, utilizada para determinar a relação existente entre os organismos, indicando seu possível grupo, suas relações com outros grupos e seu lugar nas famílias e reinos, bem como auxiliando no reconhecimento dos ancestrais. Nesse contexto, moléculas mais conservadas evolutivamente ajudam a comparar organismos relacionados distamente, enquanto que moléculas menos conservadas permitem identificar mudanças pequenas e recentes.

Os genes ribossomais (RNAr) codificam moléculas de RNA ribossomal, que são essenciais para a sobrevivência de todos os organismos e são altamente conservadas em bactérias e outros organismos, uma vez que todos realizam síntese de proteínas. Assim, a conservação desses genes, devido à reserva estrutural dos ribossomos, e à existência de

variabilidade em alguns domínios, torna as seqüências dos genes ribossomais (5S, 16S e 23S) boas escolhas para comparar organismos e inferir filogenias (Thórsson *et al.*, 2000).

A presença de domínios altamente conservados nas seqüências dos genes que codificam as regiões 16S RNAr permitem a construção de “primers” (oligonucleotídeos iniciadores) para a amplificação dos mesmos em diferentes tamanhos para a maioria dos procariotos. Os genes da região 16S RNAr de rizóbios podem ser amplificados utilizando-se, por exemplo, os “primers” fD1 e rD1 descritos por Weisburg *et al.* (1991). O seqüenciamento, parcial ou total, associada à RFLP (‘Restriction Fragment Length Polymorphism’) do gene 16S RNAr têm sido comumente utilizado para estimar a filogenia (Thies *et al.*, 2001).

A técnica de PCR associada ao RFLP (PCR-RFLP) possibilita que os organismos possam ser diferenciados pela análise de um segmento de DNA ou gene específico pela clivagem com enzimas de restrição. Assim, o segmento de DNA é fragmentado em diferentes comprimentos, evidenciando o polimorfismo no comprimento dos fragmentos obtidos, encontrado em organismos distintos.

Atualmente, a análise de PCR-RFLP e o seqüenciamento do gene que codifica a região 16S RNAr têm sido muito utilizados para inferir posições taxonômicas e diferenciar organismos simbióticos (Terefework *et al.*, 1998). As informações contidas na seqüência do gene 16S RNAr permitem inferir as relações evolutivas entre as bactérias simbióticas. (Doyle, 1998; Wang & Martínez-Romero, 2000). Com base na análise desse gene, inclusive, há indicação de várias espécies novas dentro da diversidade encontrada nos solos brasileiros (Menna *et al.*, 2006).

Seqüências dos genes ribossomais 5S, 23S e da região intergênica entre o 16S e o 23S RNAr (IGS) também têm sido utilizadas para estimar relações entre espécies de rizóbios. Como exemplo, a comparação parcial do gene 23S RNAr entre *Agrobacterium vitis*, *Rhizobium leguminosarum*, *R. etli* e *R. galegae* indicou que estes gêneros não estão tão

relacionados à *Agrobacterium* como quando se analisam seqüências do gene 16S RNAr. Esse fato indica que a taxa de mudanças nas seqüências do gene 23S RNAr, assim como também já foi constatado para os genes 5S RNAr e IGS RNAr, é mais rápida que a observada para o gene 16S RNAr, sendo assim, esses genes (23S e 5S e IGS) poderiam ser utilizados com o propósito de identificação e tipagem entre espécies, mais do que para inferir relações filogenéticas (Wang & Martínez-Romero, 2000).

Uma grande limitação nas análises filogenéticas das seqüências do operon RNAr (16S, 23S, 5S e IGS), porém, é o fato de que muitos gêneros de bactérias possuem múltiplas cópias do operon RNAr, e os alelos RNAr podem divergir em cada cópia, em maior ou em menor extensão, devido à recombinação intragênica localizada e à transferência lateral parcial, ou total, dos operons RNAr (Yap *et al.*, 1999). Para estirpes do gênero *Bradyrhizobium*, tal problema pode ser negligenciado, devido ao fato de que, até o presente momento, foi identificada apenas uma cópia do operon RNAr. Já para as estirpes dos gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Allorhizobium* e *Azorhizobium*, foram identificadas múltiplas cópias, no entanto, são cópias incompletas e possíveis de identificação em análises de gel de eletroforese, ou, ainda, são cópias idênticas, não alterando, assim, as análises (Willems *et al.*, 2001).

A metodologia de *rep*-PCR (repetitive-sequence-based-PCR) também tem sido utilizada para estimar diversidade e relações entre os organismos (Versalovic *et al.*, 1991). Essa técnica consiste no uso de “primers” específicos para amplificar elementos repetitivos e conservados dispersos no cromossomo bacteriano. Os marcadores *rep*-PCR permitem diferenciar espécies e estirpes. (Versalovic *et al.*, 1994; Selenka-Pobell *et al.*, 1996; Rademaker *et al.*, 1998).

Existem três famílias de elementos repetitivos para este tipo de análise, incluindo a seqüência REP (“Repetitive Extragenic Palindromic”) (35-40 pb), a seqüência ERIC

(“Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus”) (124-127 pb) e os elementos BOX: box A (54 pb), box B (43 pb) e box C (50 pb). Os elementos repetitivos estão localizados em distintas posições intergênicas no genoma, em ambas as orientações e os “primers” podem ser sintetizados a partir de repetições invertidas dos elementos REP, ERIC e da subunidade box A dos elementos BOX. Se as repetições estão distribuídas no genoma em orientação invertida, então um único “primer” pode ser suficiente para gerar polimorfismo de DNA (Versalovic *et al.*, 1994; Rademaker *et al.*, 1998).

Apesar dos avanços nas metodologias para a avaliação da biodiversidade, ainda pouco se conhece sobre as bactérias simbióticas fixadoras de N<sub>2</sub> no Brasil. Isso fica ainda mais evidenciado no caso da associação com o feijoeiro, cultura de grande importância para o Brasil e que pode se beneficiar fortemente pelo processo de fixação biológica de N<sub>2</sub>. Nesse contexto, este trabalho teve, por objetivo, determinar a diversidade de microssimbiontes diazotróficos da cultura do feijoeiro no Estado de Santa Catarina, contribuindo para o conhecimento da biodiversidade brasileira.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. ESTIRPES UTILIZADAS COMO REFERÊNCIAS

As estirpes utilizadas como referências foram: *Rhizobium tropici* tipo A CFN 299 (=USDA 9039, =LMG 9517), *Rhizobium tropici* tipo B CIAT 899<sup>T</sup> (=UMR 1899, =USDA 9030, =TAL 1797, HAMBI 1163, =SEMIA 4077, =ATCC 49672), *Rhizobium etli* CFN 42<sup>T</sup> (=USDA 9032), recebidas do Centro de Ciências Genômicas, Cuernavaca, México; *Rhizobium tropici* PRF 81 (=SEMIA 4080), coleção do banco de germoplasma da Embrapa Soja; *Rhizobium giardinii* bv. giardinii estirpe H152<sup>T</sup>, *Rhizobium gallicum* bv. gallicum estirpe R602<sup>T</sup>, fornecidos pelo INRA, Dijon France; *Rhizobium leguminosarum* bv phaseoli estirpe USDA 2671, proveniente do USDA, Beltsville, EUA.

### 2.2. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFO-FISIOLÓGICA DOS ISOLADOS DE RIZÓBIOS

Em novembro e dezembro de 2005 foram coletados, ao acaso, nódulos de raízes de feijoeiros e amostras de solo, em 33 áreas representativas do estado de Santa Catarina, localizadas no extremo oeste, meio oeste e no planalto sul, conforme indicado na figura 1. As características de zoneamento climático são apresentadas na Tabela 1. Os solos foram classificados conforme o mapa de classificação dos solos de Santa Catarina (Embrapa, 2006)

e as propriedades químicas foram determinadas segundo os métodos propostos por Tedesco et al. (1995). A caracterização química dos solos das áreas amostradas pode ser visualizada na Tabela 2.

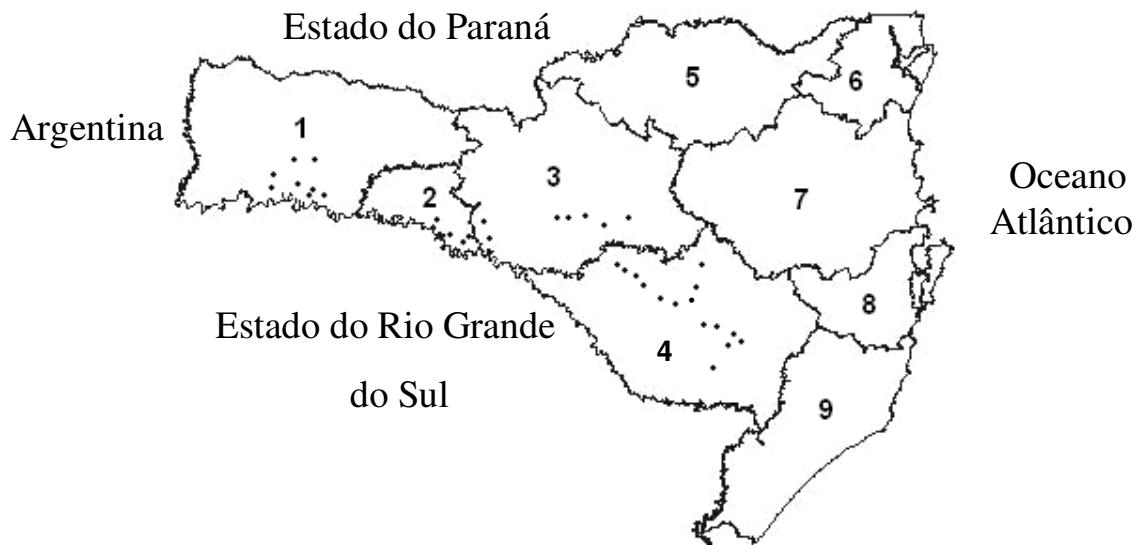


Figura 1 - Localização geográfica das áreas coletadas no estado de Santa Catarina

Região 1: Extremo Oeste – Chapecó

Região 2: Extremo Oeste – Concórdia

Região 3: Meio Oeste

Região 4: Planalto Sul

Região 5: Planalto Norte

Região 6: Nordeste

Região 7: Vale do Itajaí

Região 8: Grande Florianópolis

Região 9: Sul

Tabela 1 – Distribuição geográfica e dados climáticos dos locais de coleta, no ano de 2005 <sup>a</sup>

Região	Latitude	Longitude	Altitude (m)	Temperatura média mínima absoluta (°C)	Temperatura média máxima absoluta (°C)	Média da precipitação total mensal (mm)
Extremo Oeste – Chapecó <sup>b</sup>	27°05'26"S	52°38'02"W	679	8,1	32,0	181,6
Extremo Oeste – Concórdia <sup>c</sup>	27°18'47"S	51°59'32"W	585	7,2	32,5	142,8
Meio Oeste – Campos Novos <sup>d</sup>	27°23'00"S	51°12'56"W	964	5,5	29,3	196,1
Planalto Sul – Lages <sup>e</sup>	27°48'27"S	50°19'44"W	937	5,4	29,6	168,8

<sup>a</sup> Dados fornecidos pela EPAGRI

<sup>b</sup> Áreas correspondentes : Guatambu, Caxambu do Sul, Águas de Chapecó, Palmitos, Planaltina, Pinhalzinho e BR 282 km 546

<sup>c</sup> Áreas correspondentes: Nova Teutônia, Peritiba, Piratuba, Machadinho-Piratuba, Capinzal e Ouro

<sup>d</sup> Áreas correspondentes: Capinzal, Ouro, Campos Novos, Brunópolis e Curitibanos

<sup>e</sup> Áreas correspondentes: Lages, Painel, Urupema, São Joaquim, São José do Cerrito e Palmeira

Tabela 2 – Procedência, classificação e propriedades químicas dos solos do estado de Santa Catarina

Localização	Classificação do Solo	pH (H <sub>2</sub> O)	pH (KCl)	Ca*	Mg*	Al*	Na**	K**	P**	N**	% MO
Extremo Oeste - Chapecó											
1. Guatambu	Latossolo vermelho distroférico	7,02	6,47	14,34	2,81	0,30	18,00	244,00	288,53	8,00	3,51
2. Caxambu do Sul	Nitossolo vermelho eutrófico	5,03	4,36	5,28	0,53	0,50	12,00	335,50	69,86	10,00	3,48
3. (Dom José) Caxambu do Sul	Nitossolo vermelho eutrófico	6,03	5,20	6,72	2,22	0,25	16,50	800,00	464,55	185,00	3,18
4. Águas de Chapecó	Nitossolo vermelho eutrófico	5,24	4,51	5,70	1,54	0,40	10,00	72,00	39,83	180,00	3,10
5. Palmitos	Nitossolo vermelho eutrófico	6,53	5,65	15,30	5,57	0,10	21,50	878,50	1152,52	14,00	5,50
6. Planaltina	Nitossolo vermelho eutrófico	5,29	4,64	10,80	3,05	0,40	18,00	180,00	20,16	16,00	4,40
7. Pinhalzinho	Latossolo vermelho distroférico	5,25	4,56	6,00	1,78	0,20	16,00	392,50	33,55	10,00	3,22
8. BR 282 km 546	Latossolo vermelho distroférico	6,38	5,44	14,22	6,28	0,10	23,50	615,00	516,52	169,00	2,90
Extremo Oeste - Concórdia											
9. Nova Teutônia	Nitossolo vermelho eutrófico	5,61	4,65	13,38	7,14	0,10	25,00	151,00	492,05	184,00	3,17
10. Peritiba	Nitossolo vermelho eutrófico	5,59	4,70	12,24	2,61	0,35	11,50	603,00	82,86	16,00	3,36
11. Piratuba	Nitossolo vermelho eutrófico	5,71	5,09	7,32	1,30	0,25	17,00	169,50	46,24	321,00	5,53
12. (Usina Machadinho) Piratuba	Nitossolo vermelho eutrófico	7,19	6,72	14,22	4,56	0,35	130,50	335,50	1340,05	636,00	10,94
Meio Oeste – Campos Novos											
13. Capinzal	Nitossolo vermelho eutrófico	5,16	4,59	7,38	2,07	0,40	9,50	498,50	128,42	537,00	9,24
14. Ouro	Nitossolo vermelho eutrófico	5,89	5,87	8,10	3,26	0,20	24,50	345,50	82,29	12,00	3,16
15. Campos Novos	Latossolo vermelho distroférico	6,41	5,11	9,78	5,63	0,25	21,50	266,50	363,84	219,00	3,76
16. Campos Novos (Plantio direto)	Latossolo vermelho distroférico	5,83	5,10	9,66	5,04	0,25	15,00	415,50	105,65	15,00	4,62
17. BR 470 km 291	Latossolo vermelho distroférico	5,68	5,05	6,84	2,43	0,30	21,50	292,00	144,47	288,00	4,96
18. Brunópolis	Latossolo bruno distrófico	4,41	3,79	3,48	0,89	2,73	9,00	182,00	29,46	11,00	3,32
19. Curitibanos (sentido Brunópolis)	Latossolo bruno distrófico	5,49	4,56	3,90	1,07	0,45	4,50	42,00	87,56	8,00	2,83
Planalto Sul - Lages											
20. (Estação de Aquicultura) Lages	Cambissolo húmico textura média	6,52	5,88	9,54	3,38	0,20	6,00	44,50	656,24	11,00	7,11
21. Painel	Latossolo bruno distrófico	4,35	3,91	2,64	0,15	1,93	13,00	150,00	88,96	14,00	9,10
22. (Cedro) Urupema	Latossolo bruno distrófico	5,42	4,98	8,88	4,18	0,40	12,00	220,50	108,16	28,00	11,03
23. Urupema	Latossolo bruno distrófico	5,56	4,76	14,40	3,59	0,30	26,00	93,50	127,41	20,00	7,54
24. São Joaquim	Cambissolo húmico	6,68	6,23	14,22	5,57	0,30	28,00	615,50	357,81	593,00	10,20
25. São José do Cerrito	Nitossolo vermelho distrófico	5,98	5,51	6,48	3,85	0,15	11,00	121,00	24,24	25,00	8,72
26. (Sto Antonio dos Pinhos) São José do Cerrito	Nitossolo vermelho distrófico	6,06	5,21	12,06	4,74	0,30	17,00	505,50	217,89	14,00	7,49
27. (Toca da Onça) São José do Cerrito	Nitossolo vermelho distrófico	5,94	5,27	10,80	3,38	0,30	21,50	927,50	332,69	21,00	5,47
28. (Guaiabeira) São José do Cerrito	Nitossolo vermelho distrófico	5,14	4,57	7,38	3,35	0,40	15,00	451,00	25,82	21,00	5,65
29. ( Salto Rio Caveiras) Lages	Latossolo bruno distrófico	5,17	4,50	5,10	2,61	0,45	15,50	310,50	35,56	20,00	5,39
30. (Urupema) 1600 m altitude	Cambissolo húmico alumínico	5,25	4,53	8,16	3,73	0,99	24,00	290,50	837,46	46,00	6,51
31. (Cadeados) Lages	Cambissolo húmico alumínico	5,40	3,79	4,20	1,16	5,11	11,50	294,50	131,19	20,00	5,31
32. (Bela Vista) Lages	Cambissolo húmico alumínico	6,17	5,44	11,82	6,46	0,20	35,50	162,00	59,78	23,00	5,87
33. (Cerro Alto) Palmeira	Cambissolo húmico alumínico	5,15	4,54	5,16	4,50	0,35	18,00	286,50	439,74	22,00	5,05

\*Teores de Ca, Mg e Al no solo (cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>)\*\*Teores de Na, K, P e N no solo (mg dm<sup>-3</sup>)

No laboratório, dez nódulos de plantas coletadas em cada local, em amostragem correspondendo a uma área representativa de cada propriedade, foram retirados ao acaso, procedendo-se ao isolamento e obtenção de culturas puras de bactérias, de acordo com metodologia descrita por Vincent (1970). Para isso, os nódulos foram desinfestados superficialmente durante 1 minuto em álcool (95%), 5 minutos em hipoclorito de sódio comercial e lavados em água destilada e esterilizada por cinco vezes; em seguida, foram macerados com uma pinça flambada e, com uma alça de platina, repicados em meio de cultura contendo extrato de levedura e manitol (YM, Vincent, 1970) e o corante vermelho congo (Vincent, 1970). As placas foram incubadas a 28°C, no escuro, e verificadas diariamente. Todas as estirpes foram caracterizadas quanto à produção de muco, transparência, cor, tamanho, borda, elevação e crescimento, aos três e cinco dias de crescimento (Vincent, 1970). Também foi observada, a partir do quinto dia de crescimento, a acidificação ou alcalinização do meio YM contendo o indicador de pH azul de bromotimol. Foi formada uma coleção de trabalho, onde as bactérias foram mantidas em meio YMA inclinado, a 4°C e também, procedeu-se ao armazenamento em YM com 25% de glicerol, a -80°C.

### 2.3. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA

#### 2.3.1. Extração de DNA dos isolados de rizóbio

Para a extração de DNA, as bactérias foram incubadas em 15 mL de meio YM, durante 3 dias, a 28°C, com agitação de 80 rpm. Após a incubação, as suspensões bacterianas foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado transferido para um eppendorf de 1,5mL, lavado por três vezes com solução salina (NaCl a

0,85%), centrifugado e o sobrenadante foi descartado. Depois da 3<sup>a</sup> lavagem foi acrescentado 1 mL de solução salina, o precipitado foi homogeneizado e adicionado um volume de solução salina para obter uma concentração final de  $10^9$  células mL<sup>-1</sup>. Foram transferidos 1,4 mL da suspensão bacteriana para um outro tubo de microcentrífuga, centrifugados a 12.000 rpm durante 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, o precipitado foi ressuspensos em 400 µL de TE 50/20 (50 mM de Tris, pH 8; 20 mM de EDTA-Na<sub>2</sub> pH 8), adicionando-se 50 µL de SDS a 10% (10 g de sodium dodecyl sulphate em 100 mL de água), 10 µL de proteinase K (10 mg mL<sup>-1</sup> em água, mantida no congelador), 10 µL de lisozima (5 mg mL<sup>-1</sup> em água, mantida no congelador), 2 µL de RNase (10 mg mL<sup>-1</sup>, preparada em tampão com 10 mM de Tris HCl pH 8 e 15 mM de NaCl) e, então, incubado a 37°C por, aproximadamente, 1 hora (até clarear). Na seqüência, as amostras foram homogeneizadas com ponteiras de 1 mL, por três vezes, para retirar a viscosidade. A seguir, foram acrescentados NaCl 5 M para uma concentração final de 250 mM (30 µL), AcONa 3 M para uma concentração final de 300 mM (70 µL) e 28 µL de H<sub>2</sub>O milli Q. As amostras foram homogeneizadas e deixadas em repouso por 1 hora a 4°C, em seguida, foram centrifugadas a 12.000 rpm durante 15 minutos, recolhendo-se 300 µL do sobrenadante de cada amostra e adicionados, a estes, 600 µL de etanol absoluto gelado (aproximadamente -20°C) a 95% armazenando-se, então, de 12-18 horas, a -20°C. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm durante 15 minutos, o etanol 95% descartado, e adicionados 200 µL de etanol 70% (gelado). As amostras foram centrifugadas novamente a 12.000 rpm durante 5 minutos, o etanol foi descartado e os precipitados colocados para secar a temperatura ambiente. Finalmente, os precipitados foram ressuspensos em 50 µL de TE 10:1 (10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA, pH 8).

Para verificar a concentração e pureza do DNA, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose de 10 x 11 cm a 1,5% [0,6 g de agarose em 40 mL de TBE 1X (10,8 g de Tris-base; 5,5 g de ácido bórico; 4 mL de EDTA, 0,5 M, pH 8, para cada litro de

solução)], durante 40 minutos a 80 V. A concentração foi verificada por comparação com padrão de peso molecular conhecido, Lambda<sup>TM</sup> (Invitrogen<sup>TM</sup>). A pureza do DNA foi verificada após a coloração com brometo de etídio e a visualização em um transluminador TFX-35-M emitindo luz ultravioleta de comprimento de onda curta.

A concentração do DNA foi ajustada por comparação em gel com o peso molecular para 10 ng.  $\mu\text{L}^{-1}$ , usando água milli Q esterilizada como diluente, quando necessário.

### 2.3.2. BOX A1R-PCR

O DNA das bactérias foi amplificado pela técnica de PCR com o “primer” BOX A1R (5’-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3’), (Versalovic *et al.*, 1994), em um termociclador PTC-200<sup>TM</sup> MT-Research. O volume final da reação de amplificação da PCR foi de 25  $\mu\text{L}$ , contendo: dNTPs 1,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, tampão 10X, “primer” 50 pmol, DNA 20 ng, Taq polimerase 5 U e água milli Q esterilizada para completar o volume. A amplificação foi realizada utilizando os seguintes ciclos: 1 ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 7 min; 35 ciclos de desnaturação (1 min a 94°C), anelamento (1 min a 53°C) e extensão (8 min a 65°C); 1 ciclo de extensão final a 65°C por 16 min; manutenção a 4°C.

Após a amplificação, cada tubo recebeu 6  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra (0,25% de azul de bromofenol e 40% de sacarose ou 30% de glicerol). Foi preparado um gel de agarose de 20 X 25 cm a 1,5%, diluído em tampão TBE 1X (10,8 g de Trisma base, 5,5 g de ácido bórico e 4 mL de EDTA Na<sub>2</sub> 0,5 M pH 8 em 1 L de água destilada), e colocado em uma cuba Horizon<sup>R</sup> 20 x 25 cm. Nas canaletas do gel foram colocados 31  $\mu\text{L}$  de cada amostra, com exceção da primeira canaleta, da última e da central, nas quais foram colocados 5  $\mu\text{L}$ , por canaleta, do padrão de peso molecular de 1 kb plus DNA Ladder<sup>TM</sup> (Invitrogen<sup>TM</sup>). O DNA foi submetido à

eletroforese horizontal a 120 V por 6 horas. Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio e observado em um transluminador TFX-35-M com lâmpada UV e fotografado em uma câmera Kodak Digital Science 120. Os perfis de bandas obtidos foram analisados pelo programa Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica versão 1.50) e para a análise de agrupamento foi usado o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean) e o coeficiente de Jaccard. A tolerância das bandas foi estabelecida em 2%, no programa Bionumerics.

### 2.3.3. PCR-RFLP do gene ribossomal 16S RNAr

O gene ribossomal 16S foi amplificado com o uso dos “primers” fD1 (5'-CCGAATTCTCGACAACAGAGTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'-CCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3'), descritos por Weisburg *et al.*, (1991).

Para as amplificações por PCR foi preparada uma reação contendo, para cada amostra: dNTPs 1,5 mM, tampão para PCR (10X), MgCl<sub>2</sub> 50 mM, "primer" - fD1 e rD1 - 10 pmol, DMSO, Taq polimerase 5 U, DNA 40 ng e completado o volume final para 50 µL com água milli Q estéril. Os ciclos de amplificação foram os seguintes: 2 minutos a 95ºC; 15 segundos a 94ºC, 45 segundos a 93ºC, 45 segundos de 55º C, 2 minutos a 72º C; 29 ciclos de 15 segundos a 94º C, 2 minutos a 72º C, com manutenção final a 4ºC. Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose de 10 x 11 cm a 1,5% e comparados com padrão de peso molecular conhecido, Low DNA Mass<sup>TM</sup> Ladder (Invitrogen<sup>TM</sup>).

Para o RFLP, foi utilizada a metodologia descrita por Laguerre *et al.* (1994). O produto da amplificação com os “primers” fD1 e rD1 foi digerido com as seguintes enzimas de

restrição: *Hha*I (5' – GCG/C - 3'; 3' – C/GC – 5'), *Hpa*II (5' – C/CGG – 3'; 3' – GGC/C – 5') e *Rsa*I (5'- GT/AC – 3'; 3'- CA/TG – 5') (Invitrogen<sup>TM</sup>). Para cada reação de restrição foram utilizados 10 U de enzima, tampão específico para cada enzima (10X) conforme especificação do fabricante, 6 µL do produto de PCR e completado o volume final para 10 µL com água milli Q estéril. As reações foram incubadas a 37°C, por 2 horas, de acordo com instruções do fabricante (Invitrogen).

Em cada canaleta do gel foram colocados 10 µL de cada amostra e 4 µL do tampão de amostra, com exceção da primeira canaleta, da central e da última, nas quais foram colocados 5 µL, por canaleta, do padrão de peso molecular de 100 pb, (Invitrogen<sup>TM</sup>). Os fragmentos obtidos foram analisados por eletroforese em uma cuba Horizon<sup>R</sup>, 20 X 25 cm em gel horizontal (20 X 12 cm) com 3% de agarose, em TBE 0,5 X, a 120 V, durante 4 horas. Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio visualizado em um transluminador UV, e fotografado conforme descrito anteriormente. Os padrões de bandas obtidos foram analisados pelo programa Bionumerics e para o agrupamento foi usado o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard. A tolerância das bandas foi estabelecida em 3% no programa Bionumerics.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFO-FISIOLÓGICA DOS RIZÓBIOS

Os isolados foram obtidos de quatro diferentes regiões do estado de Santa Catarina, sendo o extremo oeste representado por 6 áreas, o meio oeste por quatro e o planalto sul com 13. Obtiveram-se 117 isolados, de 23 áreas investigadas (Tabela 3). Todos os isolados apresentaram crescimento rápido, sendo possível realizar a caracterização morfo-fisiológica em três dias. Os grupos predominantes foram aqueles que apresentaram colônias de cor branca opaca em YMA, borda lisa, elevação cupular e produção moderada de muco. Aproximadamente 97% dos isolados apresentaram reação ácida em meio YMA contendo azul de bromotimol (Tabela 4).

Os atributos morfo-fisiológicos (Tabela 4) não foram relacionados à distribuição geográfica (Tabela 1), ou com as propriedades químicas (Tabela 2), ou climáticas (Tabela 1).

Tabela 3 – Procedência e número de isolados no estado de Santa Catarina

Município	Número de isolados
Região 1: Extremo Oeste (Chapecó)	
1. Guatambu	3
2. Caxambu do Sul	2
3. Palmitos	1
4. Planaltina	2
5. Pinhalzinho	2
(Concórdia)	
6. Peritiba	2
Região 2: Meio Oeste – Campos Novos	
7. Ouro	1
8. Campos Novos (plantio direto)	2
9. Brunópolis	5
10. Curitibanos (sentido Brunópolis)	5
Região 3: Planalto Sul - Lages	
11. (Estação de Aquicultura) Lages	6
12. Painel	11
13. (Cedro) Urupema	1
14. Urupema	10
15. São José do Cerrito	8
16. (Sto Antonio dos Pinhos) São José do Cerrito	7
17. (Toca da Onça) São José do Cerrito	9
18. (Guaiabeira) São José do Cerrito	6
19. (Salto Rio Caveiras) Lages	7
20. (Urupema) 1600 m altitude	6
21. (Cadeados) Lages	5
22. (Bela Vista) Lages	7
23. (Cerro Alto) Palmeira	9
Total	117

Tabela 4 - Morfologia das colônias e pH em meio YMA de rizóbios microssimbiontes de feijoeiro do estado de Santa Catarina. Caracterização realizada aos três dias de crescimento

Cor	Transparência	Produção de Muco	Reação em meio YMA	Número de isolados	
Branca	Opaca	Abundante	Ácida	7	
		Moderada	Ácida	79	
			Básica	2	
		Pouca	Ácida	14	
	Translúcida		Básica	1	
			Neutra	1	
		Abundante	Ácida	1	
		Moderada	Ácida	9	
Rosa	Opaca	Pouca	Ácida	3	
		Total		117	

### 3.2. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS RIZÓBIOS POR *REP*-PCR

Constatou-se um grau elevado de polimorfismo de DNA entre as bactérias investigadas, com a obtenção de 107 perfis distintos pela técnica de *rep*-PCR, pela amplificação do DNA com o “primer” BOX A1R-PCR (Figura 2). A análise de agrupamento dos produtos de amplificação por *rep*-PCR resultou na união de todos os isolados e estirpes de referência em um nível de similaridade de apenas 27% (Figura 2). Vinte e quatro grupos puderam ser observados no dendrograma, quando considerado o nível de similaridade de 70% e, aproximadamente, 26% representando isolados únicos. Quatro grupos uniram bactérias com perfis idênticos do mesmo solo. Como exemplos, os isolados de Cerro Alto, Palmeira 111, 113, 115 e 110 no grupo IV; no agrupamento XIV os isolados 75 e 74 da localidade Toca da Onça no município de São José do Cerrito e de Bela Vista, Lages (102 e 103; 106 e 107). Outros agrupamentos incluíram bactérias de perfis idênticos, mas que apresentavam origens distintas: no grupo V (118 e 96; 95 e 87) e os isolados 63, 46 e 56 no grupo XVI (Figura 2). Foi possível observar os agrupamentos conforme as regiões, onde a região 4, correspondente ao planalto sul catarinense, reuniu 14 grupos em um nível de similaridade de 70%, sendo eles: I, II, III, V, VII, X, XIV, XV, XVII, XIX, XX, XXI, XXII e XXIII. Nos agrupamentos IV,

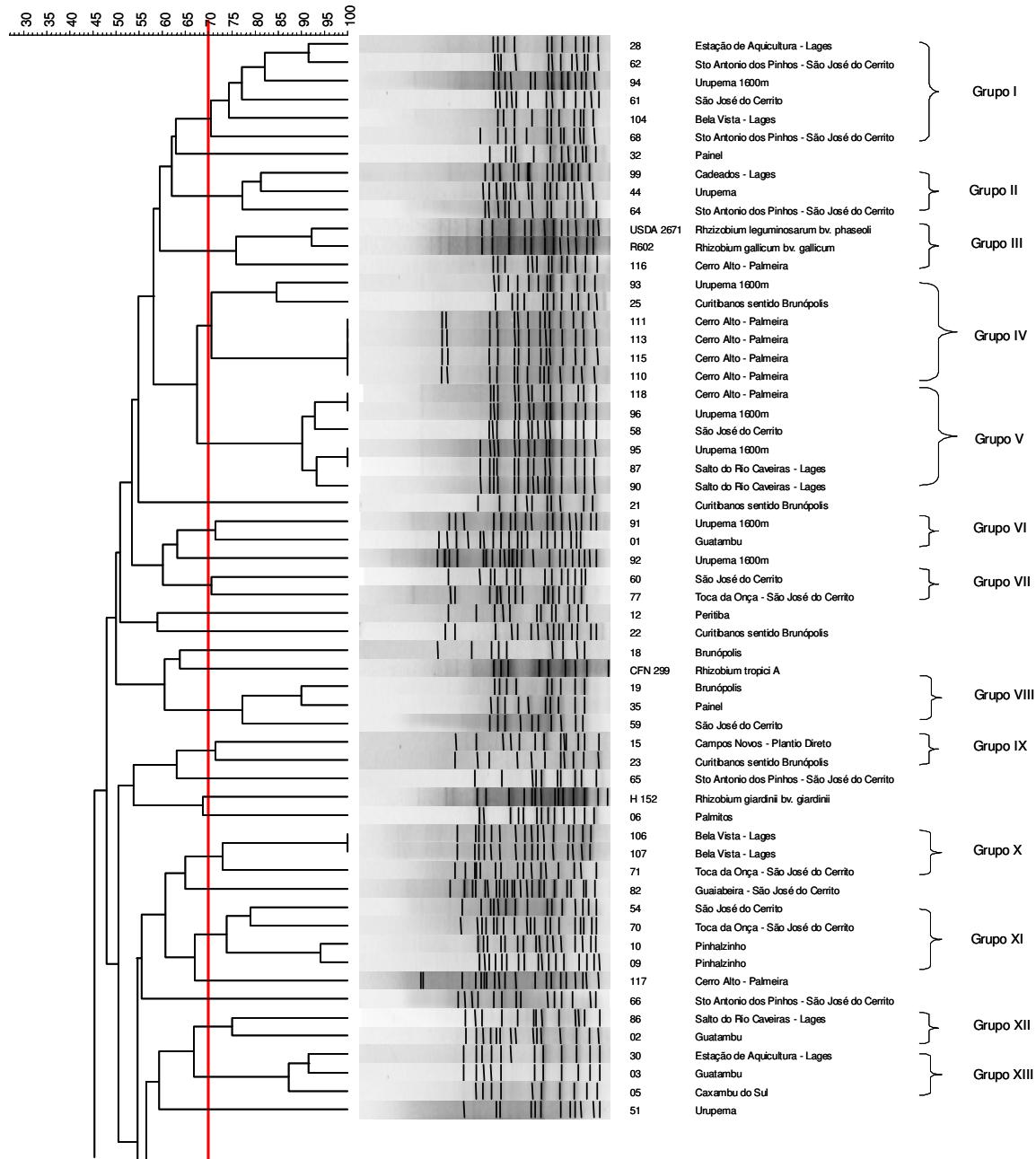
VII e XVI ocorreu o predomínio da região 4 e apenas os grupos IX e XXIV como representantes da região 3 (Figura 2).

As estirpes de referência apresentaram perfis bastante distintos em relação aos isolados de Santa Catarina. Somente uma estirpe, a 116, isolada de Cerro Alto, Palmeira, foi posicionada no mesmo grupo III com *R. leguminosarum* bv. phaseoli estirpe USDA 2671 e *R. gallicum* bv. gallicum R602 em um nível de similaridade de 76% (Figura 2).

A análise também foi conduzida considerando cada uma das regiões. Na região 1, correspondente ao extremo oeste incluindo Chapecó e Concórdia, foram agrupados doze isolados e esses uniram-se em um nível de similaridade de 24% (Figura 3). A região 2 agrupou 13 isolados com uma similaridade de 31% (Figura 4) e, finalmente, a região 3 reuniu, com 34% de similaridade, 92 isolados (Figura 5).

Não foi constatada correlação significativa entre nenhum dos índices de similaridade genética (Figura 2) com os atributos químicos do solo (Tabela 2), ou climáticos (Tabela 1).

Similaridade (%)



Continua

Continuação

Similaridade (%)

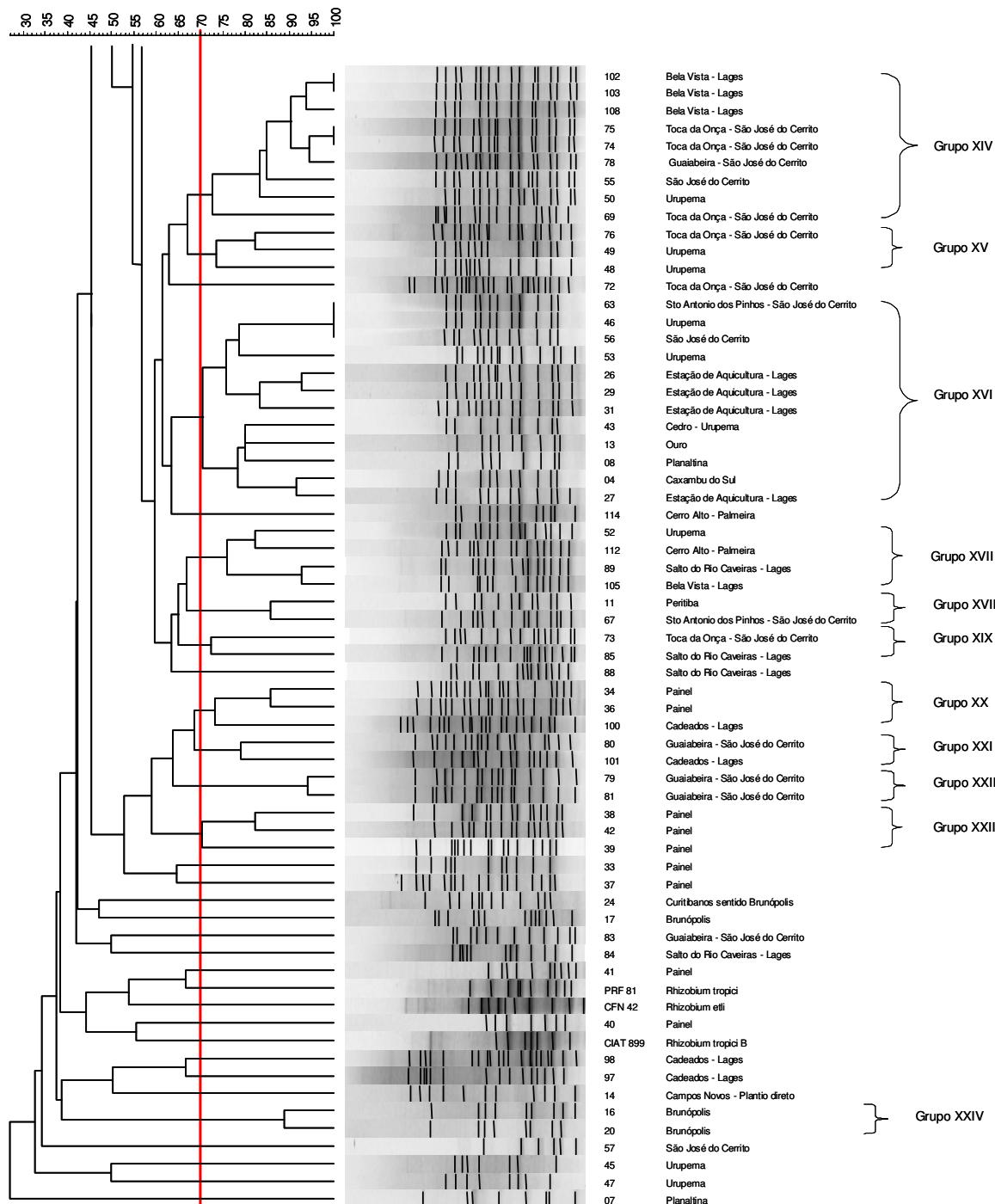


Figura 2 - Dendrograma obtido pela análise dos produtos de amplificação BOX A1R-PCR, com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J)

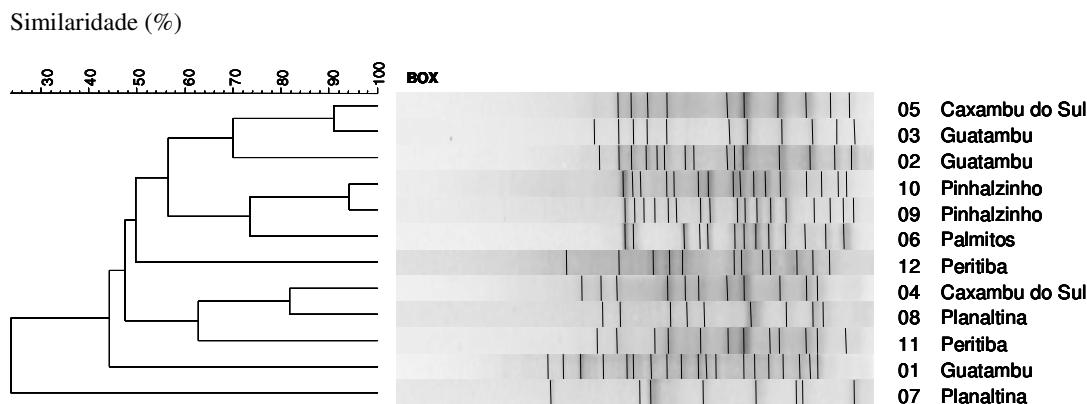


Figura 3 – Dendrograma obtido pela análise dos produtos de amplificação BOX A1R-PCR, com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J) de isolados de feijoeiro da região 1 do estado de Santa Catarina

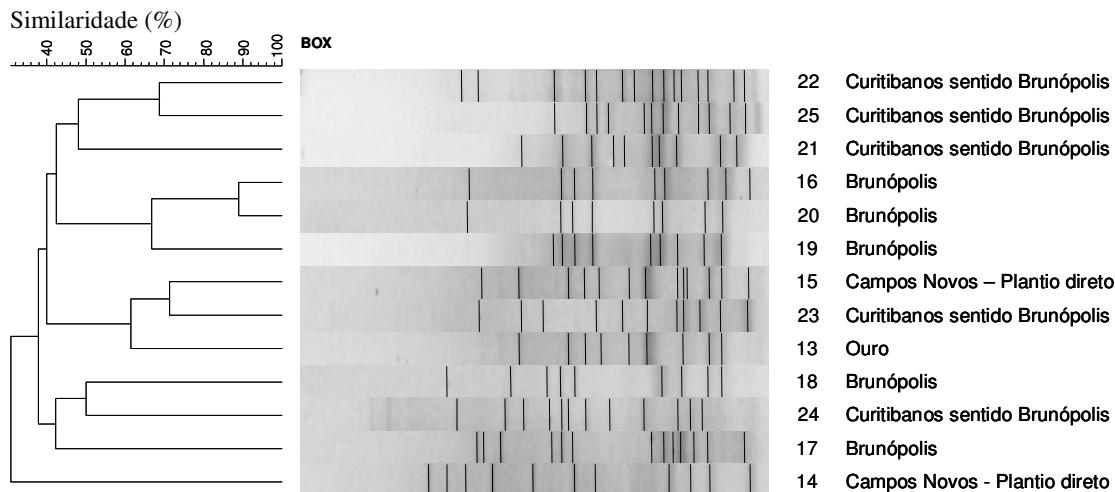


Figura 4 – Dendrograma obtido pela análise dos produtos de amplificação BOX A1R-PCR, com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J) de isolados de feijoeiro da região 2 do estado de Santa Catarina

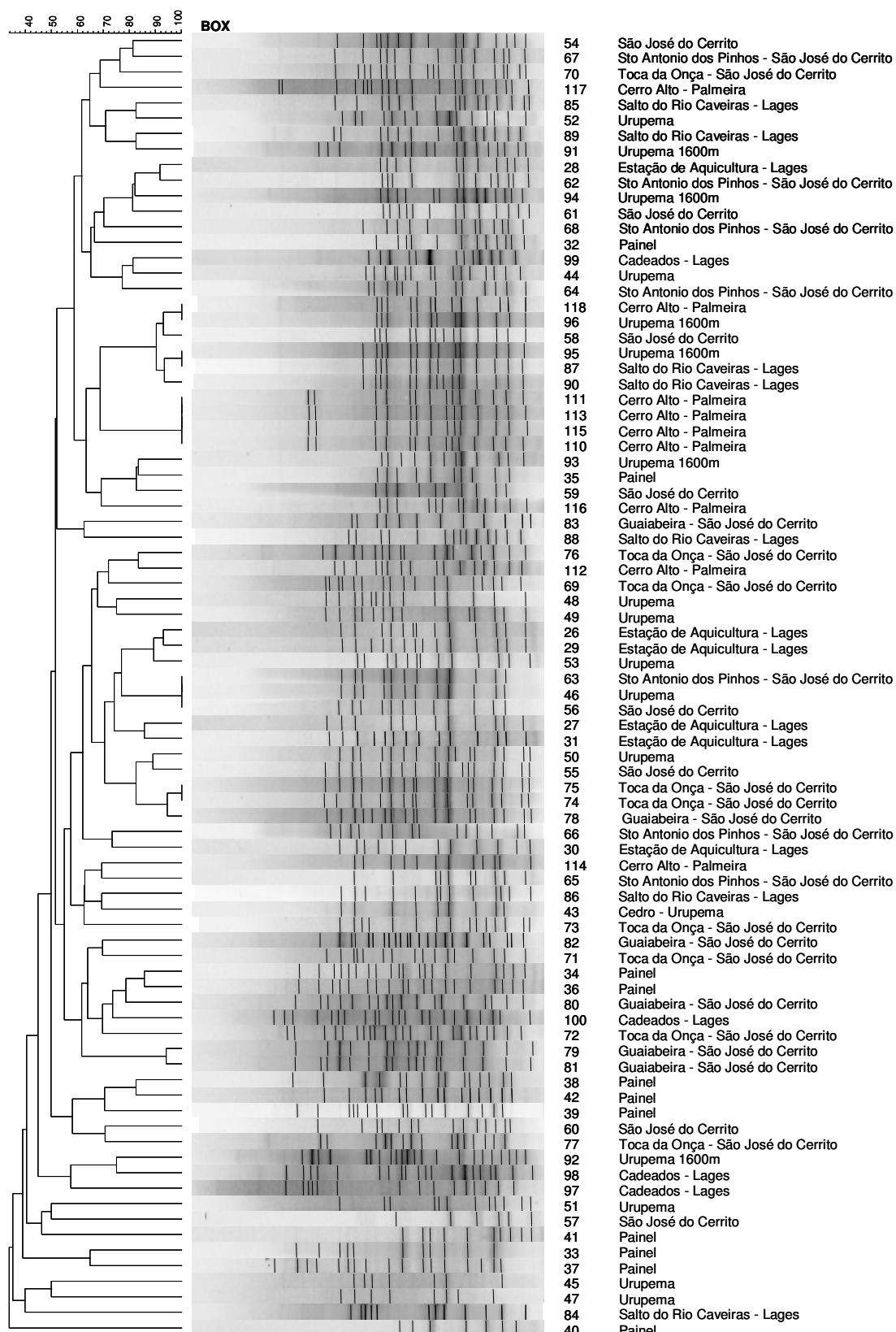


Figura 5 – Dendrograma obtido pela análise dos produtos de amplificação BOX A1R-PCR, com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J) de isolados de feijoeiro da região 3 do estado de Santa Catarina

### 3.3. PCR-RFLP DO GENE RIBOSSOMAL 16S

Os 117 isolados obtidos neste estudo também foram avaliados pela técnica PCR-RFLP do gene ribossomal 16S (Laguerre et al., 1994). Os produtos de PCR foram digeridos com as enzimas *Hha*I, *Hpa*II e *Rsa*I, respectivamente. No caso das restrições com a enzima *Rsa*I, em alguns isolados foram obtidos fragmentos que quando somados, resultaram em 2.200 a 2.400 pb, o que pode indicar a existência de mais de uma cópia do gene. A digestão com as demais enzimas de restrição, *Hha*I e *Hpa*II, resultou em fragmentos que, somados, resultaram em, aproximadamente, 1.500 pb.

O dendrograma obtido com os produtos de restrição mostra que os isolados agruparam em um nível final de similaridade bastante baixo, de 31% e 6 grupos principais puderam ser definidos, em adição a 5 isolados que ocuparam posições isoladas. (Figura 6).

O grupo I incluiu dois isolados com 100% de similaridade, o isolado 92 de Urupema (1.600m de altitude, com pastagem de inverno e, posteriormente, cultivado com feijão no sistema de plantio convencional) e o isolado 14 de Campos Novos (plantio direto), agruparam com a estirpe tipo *R. giardinii* bv. *giardinii* H152 em um nível de similaridade de 94% (Figura 6).

No grupo II reuniu 19 isolados e mostrou 100% de identidade com as estirpes de referências *R. tropici* PRF 81, *R. tropici* tipo B CIAT 899<sup>T</sup>. Já o isolado 12, do extremo oeste, de Peritiba, foi o único que agrupou com a estirpe *R. tropici* tipo A estirpe CFN 299, com uma similaridade de 93,3%, formando o grupo III (Figura 6).

Cinco isolados foram unidos em um nível final de similaridade de 94,4% no grupo IV, com dois subgrupos, o primeiro com dois isolados com semelhança total, 106 e 107, ambos de Bela Vista, Lages, e o segundo com três isolados de perfis idênticos, dois do extremo oeste e um do planalto sul catarinense (Figura 6).

O grupo V reuniu com 100% de similaridade entre si, 38 isolados com *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA 2671 e, também, com *R. gallicum* bv. *gallicum* R602<sup>T</sup>. A seguir, dois isolados, 116 e 105 diferiram do grupo V ocupando posições isoladas (Figura 6).

O grupo VI foi o que incluiu o maior número de isolados, 42, mostrando 100% de similaridade com a estirpe tipo da espécie *R. etli* CFN 42<sup>T</sup>.

Nenhuma estirpe de referência foi agrupada no grupo VII, apenas dois isolados de Pinhalzinho e um de Palmitos, unidos em um nível final de similaridade de 100%.

As estirpes 99, 23, 24, 98 e 97 apresentaram perfis bastante distintos dos demais, com nível de similaridade inferior a 60%.

Também não houve correlação significativa entre os índices de diversidade genética por PCR-RFLP (Figura 6) e os atributos químicos do solo (Tabela 2), ou com os dados climáticos (Tabela1).

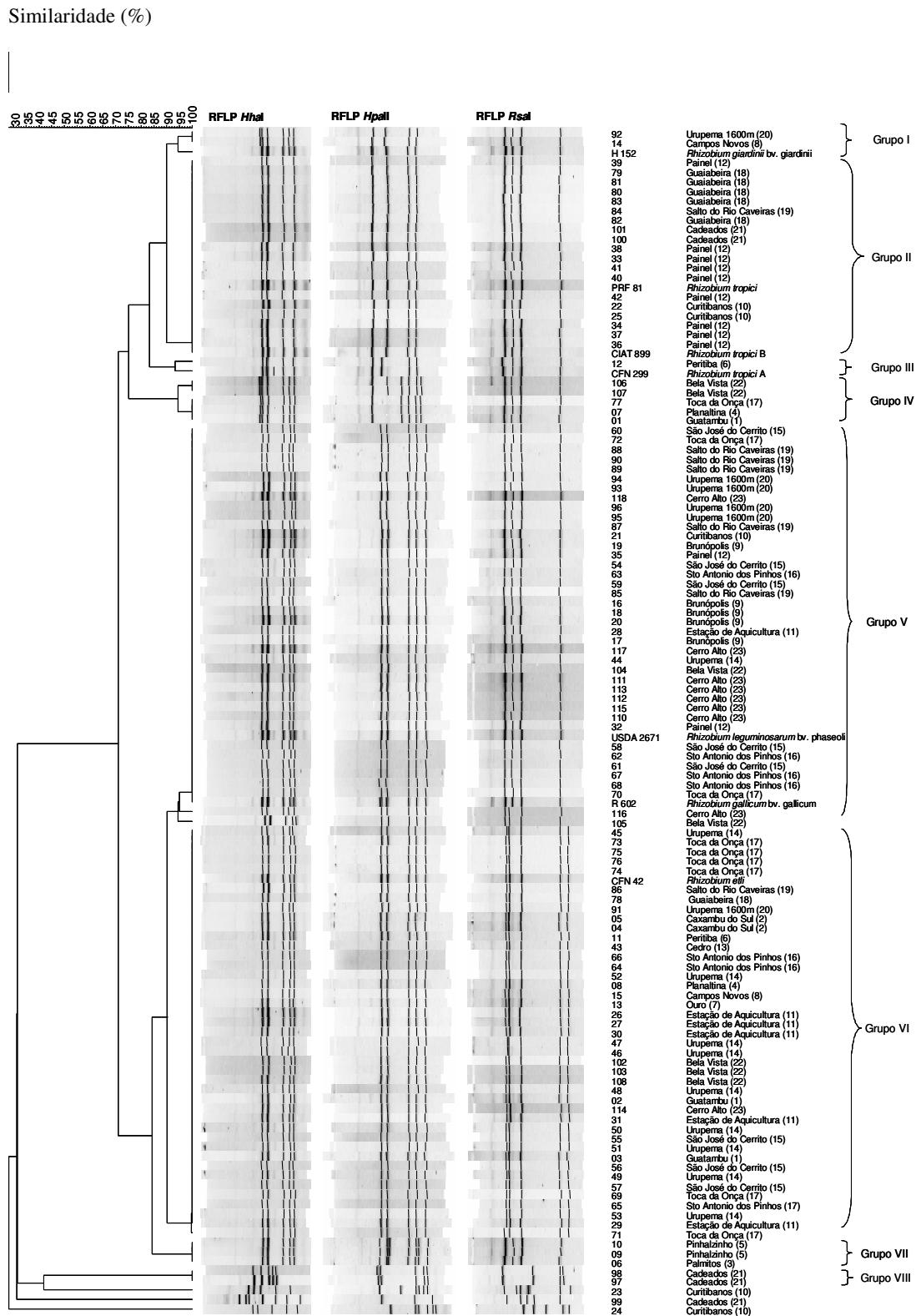


Figura 6 – Dendrograma obtido pela análise por RFLP-PCR da região 16S rRNA com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J)

O agrupamento produzido para cada enzima também foi representado por uma letra minúscula (Tabela 5), sendo possível comparar os isolados com todas as enzimas e agrupar as que apresentaram perfis enzimáticos semelhantes. Das três enzimas estudadas, nenhuma conseguiu diferenciar, isoladamente, as espécies, porém, individualmente, para as enzimas *HhaI* e *HpaII* foi possível diferenciar a espécie tipo *R. tropici* tipo A CFN 299 das demais. A enzima *RsaI* produziu perfil semelhante com todas as espécies, exceto para *R. etli* CFN 42<sup>T</sup>. De acordo com a Tabela 5, 35,9% dos isolados analisados apresentaram perfil semelhante à espécie *R. etli*, e a ocorrência dessas bactérias foi generalizada em todos as regiões. Foram obtidos oito perfis distintos com a enzima *HhaI*, dez com a enzima *HpaII* e sete com a *RsaI*. Considerando as três enzimas de restrição, os isolados de Santa Catarina foram classificados em 13 combinações distintas de perfis.

Tabela 5 - Perfis de PCR-RFLP da região 16S rRNA em isolados de rizóbios de feijoeiro do estado de Santa Catarina

<i>HhaI</i>	<i>HpaII</i>	<i>RsaI</i>	Estirpes	% Total
a	a	a	01, 07, 77	2,56
a	d	a	14, 92	1,71
a	e	a	106, 107	1,71
b	b	a	16, 17, 18, 19, 20, 21, 28, 32, 35, 44, 54, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 67, 68, 70, 72, 85, 87, 88, 89, 90, 93, 94, 95, 96, 104, 105, 110, 111, 112, 113, 115, 116, 117, 118, USDA 2671, R602	32,5
b	b	b	02, 03, 04, 05, 08, 11, 13, 15, 26, 27, 29, 30, 31, 43, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 55, 56, 57, 64, 65, 66, 69, 71, 73, 74, 75, 76, 78, 86, 91, 102, 103, 108, 114, CFN 42	35,9
b	c	a	06, 09, 10	2,56
b	d	a	H 152	0,85
b	b	c	105, 116	1,71
c	d	a	22, 25, 33, 34, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 100, 101, PRF 81, CIAT 899	16,23
c	j	a	12	0,85
d	f	d	97, 98	1,71
e	g	e	24	0,85
f	h	f	23	0,85
g	j	g	99	0,85
h	j	a	CFN 299	0,85

#### 4. DISCUSSÃO

É possível que os isolados de rizóbios obtidos de nódulos de feijoeiro sejam nativos, pois nenhuma das áreas consideradas tem histórico de inoculação. Contudo, há tradição de cultivo do feijoeiro na maioria das regiões estudadas no estado de Santa Catarina, podendo o rizóbio ter vindo nas sementes, que podem carregar várias células viáveis, conforme relatado por Pérez-Ramirez e colaboradores (1998).

Em relação à distribuição das espécies de rizóbios do feijoeiro no mundo, tem sido argumentado que, nos locais onde a leguminosa foi introduzida pela região Mesoamericana, ou do norte da Argentina, as sementes devem ter carregado *R. etli*; posteriormente, a colonização européia e o comércio com Europa e África poderiam explicar a presença dessa espécie na Espanha, Senegal e Áustria (Aguilar *et al.*, 1998; Pérez-Ramirez *et al.*, 1998). De modo semelhante, *R. tropici* parece ser nativa da região tropical da América do Sul (Martínez-Romero *et al.*, 1991) e, como a espécie também tem sido encontrada em algumas regiões da África e diversos locais da França, também pode ter sido introduzida nesses locais por vias comerciais (Amarger *et al.*, 1993, 1994, 1995; Anyango *et al.*, 1995).

Das 33 coletas realizadas, em dez áreas não foi obtido nenhum isolado, o que pode estar relacionado com os teores de N no solo superiores a 169,00 mg dm<sup>-3</sup> encontrados nestes locais, indicando a aplicação de adubos nitrogenados. Apesar do feijoeiro ser uma planta com grande capacidade de aproveitamento do N disponível no solo, sabe-se que a associação simbiótica é muito sensível à presença do N mineral e tende a afetar negativamente o processo de FBN (Straliotto *et al.*, 2006).

Observando os grupos formados com os isolados pela técnica de PCR-RFLP do gene ribossomal 16S no grupo I, no qual se encontram as estirpes de *R. tropici* PRF 81, CIAT 899<sup>T</sup> (tipo B) e CFN 299 (tipo A), somente isolados das regiões 3 e 4 foram agrupados, e, os solos dessas regiões são caracterizados por valores de pH inferiores aos das demais regiões, sendo o valor médio de pH de  $4,9 \pm 0,5$ . Anyango e colaboradores (1995) mostraram que, no Quênia, *R. tropici* é a espécie dominante em pH 4,5, enquanto que, em pH alcalino, havia dominância de *R. etli*. De modo semelhante, nos Cerrados brasileiros, 98% da população em solo com pH 4,8 foi constituída de *R. tropici*, decrescendo para 80% quando o pH foi incrementado, por calagem, para 5,5 (Hungria *et al.*, 1997). Além disso, houve uma tendência de predominância de *R. giardinii* bv. *giardinii*, em pH  $5,7 \pm 0,1$ , de *R. etli* em pH  $5,9 \pm 0,5$  e de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e *R. gallicum* bv. *gallicum* em pH de  $5,4 \pm 0,6$ .

A análise das estirpes pela técnica de RFLP não detectou diferenças genéticas entre as espécies *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA 2671 e *R. gallicum* bv. *gallicum* R602. É provável, porém, que as estirpes pertençam à espécie *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, que já foi isolada de vários locais do Brasil (Mercante *et al.*, 1998; Straliotto *et al.*, 1999; Mostasso *et al.*, 2002; Giongo *et al.*, 2006). Até o presente momento, de todas as espécies nodulantes do feijoeiro, somente *R. gallicum* bv. *gallicum* ainda não foi encontrada nos solos brasileiros (Mostasso *et al.*, 2002). O fato de não ocorrer diferenciação entre estas duas espécies comprometeu a identificação de 40 isolados nativos neste estudo. Por exemplo, os isolados 111, 113, 115 e 110, da localidade de Cerro Alto, são idênticos, tanto pela análise de RFLP, quanto pela análise por BOX A1R-PCR. A diferenciação dessas espécies poderá ser possível pelo uso de uma outra enzima de restrição, ou pelo seqüenciamento do gene 16S rRNA.

Por outro lado, 42 isolados nativos foram agrupados com *R. etli* CFN 42<sup>T</sup>. Embora diversos estudos no Brasil tenham identificado *R. tropici* como a espécie predominante (Mercante *et al.*, 1998; Straliotto *et al.*, 1999; Hungria *et al.*, 2000; Mostasso *et al.*, 2002), a

maioria dos isolados desses estudos são provenientes da região dos Cerrados. Essa região apresenta algumas peculiaridades quando comparada às demais regiões brasileiras, como longos períodos de seca, temperaturas freqüentemente acima de 40°C e solos extremamente ácidos (Hungria & Vargas, 2000). Além disso, estudos recentes mostram que *R. etli* pode ocorrer de modo abundante em solos brasileiros (Grange & Hungria, 2004), quando isolado a partir de diluições de solo. Conforme já comentado, *R. etli* predomina na região noroeste da Argentina (Aguilar *et al.*, 2006) e essa pode ter sido a via de introdução da espécie em Santa Catarina. Os isolados identificados como *R. etli* foram posicionados, pela análise de BOX A1R-PCR, nos agrupamentos XII, XIII, XIV, XV e XVI, em um nível final de similaridade de 61%.

Os isolados 01, 06, 07, 09, 10, 23, 24, 77, 97, 98, 99, 105, 106, 107 e 116 não formaram agrupamento com nenhuma das cinco espécies já descritas de rizóbios microssimbiontes do feijoeiro, de modo que podem representar novas espécies de rizóbios.

## CONCLUSÕES

Esse estudo é um dos primeiros realizados no estado de Santa Catarina e contribui para o conhecimento da biodiversidade brasileira de rizóbios associados à cultura do feijoeiro. Considerando a análise de RFLP-PCR do gene 16S rRNA, houve indicação de que devem estar presentes, nos solos de Santa Catarina, 13 espécies capazes de nodular o feijoeiro. A população nos solos das três regiões produtoras de Santa Catarina, capturada a campo com feijoeiro e investigada neste estudo, consistiu de 17,1% de *R. tropici*, 35,9% de *R. etli*, 32,5% de *R. leguminosarum*, 1,7% com *R. giardinii* e 12,8% dos isolados não foram classificados em nenhuma das espécies descritas como simbiontes do feijoeiro. Como, até o presente momento, existem apenas cinco espécies descritas como microssimbiontes dessa leguminosa, os resultados indicam que novas espécies de rizóbios devem ser descritas a partir dos isolados obtidos em Santa Catarina. Além disso, deve-se destacar a diversidade genética intraespecífica elevada, que foi evidenciada pela análise por BOX A1R-PCR, uma vez que 107 perfis distintos foram obtidos na análise dos 117 isolados disponíveis. Essa diversidade genética elevada pode representar uma fonte importante de genes para a agricultura e para o meio ambiente, bem como de estirpes com maior capacidade de fixação biológica do N<sub>2</sub>.

## REFERÊNCIAS

AGUILAR, O.M.; LÓPEZ, M.V.; DONATO, M.; MORÓN, B.; SORIA-DIAZ, M.E.; MATEOS, C.; GIL-SERRANO, A.; SOUSA, C.; MEGÍAS, M. Phylogeny and nodulation signal molecule of rhizobial populations able to nodulate common beans-other than predominant species *Rhizobium etli*-present in soils from the northwest of Argentina. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, p. 573-586, 2006.

AGUILAR, O.M.; LÓPEZ, M.V.; RICCILLO, P.M.; GONZÁLEZ, R.A.; PAGANO, M.; GRASSO, D.H.; PÜHLER, A.; FAVELUKES, G. Prevalence of the *Rhizobium etli*-like allele in genes coding for 16S rRNA among the indigenous rhizobial populations found associated with beans from the Southern Andes in Argentina. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 3520-3524, 1998.

AMARGER, N.; MAZURIER, S.I.; GENIAUX, E.; LAGUERRE, G. Indigenous populations of *Rhizobium* nodulating *Phaseolus vulgaris*. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W.E. (Eds.) **New horizons in nitrogen fixation**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1993. p. 593.

AMARGER, N.; BOURS, M.; REVOY, M.R.; LAGUERRE, G. *Rhizobium tropici* nodulates field-grown *Phaseolus vulgaris* in France. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 161 p. 147-156, 1994.

AMARGER, N.; GENIAUX, E.; LAGUERRE, G. *Rhizobium* associated with field-grown *Phaseolus vulgaris*. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MICROBIAL ECOLOGY, 7., 1995, Santos. **Abstracts**. São Paulo: SBM, 1995.

AMARGER, N., MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov. from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 996-1006, 1997.

ANYANGO, B.; WILSON, K. J.; BEYNON, J.L.; GILLER, K. E. Diversity of rhizobia *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pHs. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, p. 4015-4021, 1995.

ARAUJO, R.S. Fixação biológica do nitrogênio em feijão. In: ARAÚJO, R.S.; HUNGRIA, M. (Eds.) **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: Embrapa-CNPAF, 1994. p. 91-120.

ARAUJO, S.C. A inoculação de leguminosas: Aumento da produtividade com a fixação biológica de nitrogênio. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. Disponível em: <<http://www.bioteecnologia.com.br>>. Acesso: 22 ago. 2006.

BRENNER, D.J.; STALEY, J.T.; KRIEG, N.R. Classification of prokaryotic organisms and the concept of bacterial speciation. In: BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W.; GARRITY, M.

G.M. (Eds.) **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Springer-Verlag, New York, 2000. p. 27-31.

COWAN, S.T. **A dictionary of microbial taxonomic usage**. Edinburgh: Oliver & Boyd, 1968.

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

DOYLE, J.J. Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. **Trends in Plant Science**, v. 3, p. 473-478, 1998.

DROZDOWICZ, A. Bactérias do solo. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. (Eds.) **Biologia dos solos do cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p. 17-67.

EMBRAPA. (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). **Mapa de Solos do Estado de Santa Catarina**. Disponível em:

<[http://mapserver.cnps.embrapa.br/website/pub/Santa\\_Catarina/viewer.htm](http://mapserver.cnps.embrapa.br/website/pub/Santa_Catarina/viewer.htm)>. Acesso: 25 abr. 2006.

FETAESC (Federação dos Trabalhadores na Agricultura do Estado de Santa Catarina). **Plano de reordenação sustentável da agricultura familiar em Santa Catarina**. Disponível em:

<<http://www.fetaesc.org.br/gtb/2006/plano.pdf>>. Acesso: 08 set. 2006.

GIONGO, A.; PASSAGLIA, L.M.P.; FREIRE, J.R.J.; de SÁ, E.L.S. Genetic diversity and symbiotic efficiency of population of rhizobia of *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. **Biology and Fertility of Soils** (DOI 10.1007/s00374-006-0128-z).

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

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; CHUEIRE, L.M.O.; PROBANZA, A.; GUTTIERREZ-MANERO, J.; MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia strains. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.32, p. 1515-1528, 2000

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **A fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja.** Londrina: Embrapa Soja, 2001. 48 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica, 35 / Embrapa Cerrados. Circular Técnica, 13).

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

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; ARAUJO, R.S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. (Eds.) **Biologia dos solos dos cerrados.** Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p. 189-294.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; CAMPO, R.J.; SUHET, A.R.; PERES, J.R.R. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: ARAUJO, R.S.; HUNGRIA, M. (ed.). **Microrganismos de importância agrícola.** Brasília: EMBRAPA - SPI, 1994. p. 9-89.

INCRA/FAO **Novo retrato da agricultura familiar: o Brasil redescoberto**. Editora: Brasília, 2000. 74 p.

JORDAN, D.C. *Rhizobiaceae* Conn 1938. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J.G. (ed.) **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore/London: Williams & Wilkins, 1984. p. 235-244.

LAGUERRE, G.; ALLARD, M.R.; REVOY, F.; AMARGER, N. Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 56-63, 1994.

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

MAPA do Estado de Santa Catarina: vista ampliada. Mapa das microrregiões de Santa Catarina. Escala indeterminável. Disponível em: < [http://www.fecomerciosc.org.br/novo/arquivos/pesquisas/microregioes/mapa\\_microregioes\\_SC.htm](http://www.fecomerciosc.org.br/novo/arquivos/pesquisas/microregioes/mapa_microregioes_SC.htm) > Acesso: 09 nov. 2006.

MARTÍNEZ, E.; PARDO, M.A.; PALACIOS, R.; CEVALLOS, M.A. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. **Journal of General Microbiology**, v. 131, p. 1779-1786, 1985.

MARTÍN-CABREJAS, M.A.; ESTEBAN, R.M.; PEREZ, P.; MAINA, G.; WALDRON, K.W. Change in physicochemical properties of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) during long-term storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 3223-3227, 1997.

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**, v. 41, p. 417-426, 1991.

MEIRELES, E.J.L.; VIEIRA, E.H.N.; SILVA, S.D. da. Clima e produção de sementes. In: VIEIRA, E.H.N.; RAVA, C.A. (Eds.) **Sementes de feijão: produção e tecnologia**. Embrapa Arroz e Feijão: Santo Antônio de Goiás, 2000. 270 p.

MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F.G.; BANGEL, E.V.; HESS, P.N.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 315-332, 2006.

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

MOSTASSO, L.; MOSTASSO, F.L.; DIAS, B.G.; VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.73, p. 121-132, 2002.

MORGANTE, P.G. Fixação biológica e assimilação de nitrogênio. Disponível em: <<http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp/FisioVegGrad/NetNitro.htm>>. Acesso: 08 set. 2006.

PÉREZ-RAMÍREZ, N.O.; ROGEL, M.A.; WANG, E.; CASTELLANOS, J.Z; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Seeds of *Phaseolus vulgaris* bean carry *Rhizobium etli*. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 26, p. 289-296, 1998.

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

RADEMAKER, J.L.W.; LOUWS, F.J.; de BRUIJN, F.J. Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. In: AKKERMANS, A.D.L; VAN ELSAS, J.D.; DE BRUIJN, F. J. (Eds.) **Molecular microbial ecology manual**. Dordrecht: Kluwer, 1998. p. 1-26.

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

SEGOVIA, L.; PIÑERO, D.; PALACIOS, R.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 426-433, 1991.

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

SELENSKA-POBELL, S.; EVGUENIEVA-HACKENBERG, E.; RADEVA, G.; SQUARTINI, A. Characterization of *Rhizobium 'hedysari'* by RFLP of PCR amplified rRNA and by fingerprinting. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 80, p. 517-528, 1996.

SNEATH, P.H.A. **International code of nomenclature of bacteria (1990 Revision)**. American Society for Microbiology: Washington, DC, 1992.

STRALIOTTO, R.; TEIXEIRA, M.G.; MERCANTE, F.M. **Fixação biológica de nitrogênio**. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/CultivodoFeijoeiro/fbnitrogenio.htm>. Acesso em: 03 nov. 2006.

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

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N.G. **Aplicação e evolução dos métodos moleculares para o estudo da biodiversidade do rizóbio**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1999. 58 p. (Embrapa Agrobiologia. Documento, 93).

TEDESCO, J.M.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.A.; VOLKWEISS, S.J. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 174p.

TEREFWORK, Z.; NICK, G.; SUOMALAINEN, S.; PAULIN, L.; LINDSTRÖM, K. Phylogeny of *Rhizobium galegae* with respect to other rhizobia and agrobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 349-356, 1998.

THIES, J.E.; HOLMES, E.M.; VACHOT, A. Application of molecular techniques to studies in *Rhizobium* ecology: a review. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 31, p. 229-319, 2001.

THÓRSSON, A.E., SVERRISSON, H., ANAMTHAWAT-JÓNSSON, K. Genotyping icelandic isolates of rhizobia based on rDNA-RFLP. **Icelandic Agricultural Science**, v. 13, p. 17-25, 2000.

van BERKUM, P. Short sequence repeats in microbial pathogenesis and evolution. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 56, p. 729-734, 1999.

VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; De VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, v. 60, p. 407-438, 1996.

VELASQUEZ, Y.A.; KLUSON, R.A.; SCRÖDER, E.C. *Rhizobium* inoculation of *Phaseolus vulgaris* in Lajas, Puerto Rico. **Journal of Agriculture of University of Puerto Rico**, v. 72, p. 427-436, 1988.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, London, v. 19, p. 6823-6831, 1991.

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

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

WANG, E.T.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Phylogeny of root- and stem-nodule bacteria associated with legumes. In: TRIPPLETT, E. W. (Eds.) **Prokaryotic nitrogen fixation**: a model system for analysis of a biological process. Horizon Scientific Press: Madison, 2000. p. 177-186.

WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p. 697-703, 1991.

WILLEMS, A.; COOPMAN, R.; GILLIS, M. Comparison of sequence analysis of 16S-23S rRNA spacer regions, AFLP analysis and DNA-DNA hybridization in *Bradyrhizobium*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 623-632, 2001.

YAP, W.H., ZHANG, Z., WANG, Y. Distinct types of RNAr operons exist in the genome of the actinomycete *Thermomonospora chromogena* and evidence for transfer of an entire rRNA operon. **Journal of Bacteriology**, v. 181, p. 5201-5209, 1999.