



Ministério da Educação e Desporto
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
Programa de Pós-Graduação em Genética

**A ANÁLISE POLIFÁSICA NA RECLASSIFICAÇÃO
FILOGENÉTICA DE *RHIZOBIUM ETLI* E O ESTUDO DA
DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DOS CERRADOS
BRASILEIROS**

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM GENÉTICA – ÁREA DE
CONCENTRAÇÃO EM GENÉTICA DE
MICROORGANISMOS, DEPARTAMENTO
DE GENÉTICA, DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ- UFPR, COMO
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO
DO GRAU DE DOUTORA EM GENÉTICA.

CURITIBA
2005

LUCIANA GRANGE

**A ANÁLISE POLIFÁSICA NA RECLASSIFICAÇÃO
FILOGENÉTICA DE *RHIZOBIUM ETLI* E O ESTUDO DA
DIVERSIDADE GENÉTICA DE ISOLADOS DOS CERRADOS
BRASILEIROS**

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM GENÉTICA- ÁREA DE
CONCENTRAÇÃO EM GENÉTICA DE
MICROORGANISMOS, DEPARTAMENTO
DE GENÉTICA, DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DO PARANÁ- UFPR, COMO
REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO
DO GRAU DE DOUTORA EM GENÉTICA.

Orientadora: Dra. Mariangela Hungria

**CURITIBA
2005**

Orientadora:

Dra. Mariangela Hungria

Membros da banca:

Dra. Ligia Vitoria Galli Terasawa

Dr. Galdino Andrade

Dra. Chirlei Gleinke de Blanco

Dra. Maria Bernice Sttefens

Dr. Fernando Gomes Barcellos

Dra. Marina Isabel Mateus de Almeida

DEDICO

A quem mais poderia dedicar esta tese se não àquela que se tornou, ao longo desses anos, a pessoa mais importante da minha vida. Mariangela, obrigada por me fazer melhor como ser humano, como mulher e como cientista. Nunca me sentirei merecedora do grande privilégio de estar ao seu lado, mas humildemente agradeço aos “céus” por um “anjo da guarda” tão real. Dedico a você, assim como dediquei, um dia, a minha querida mãe, um pouco do que a poesia brasileira têm de mais rico:

Rosa

*Tu és divina e graciosa, estátua majestosa, do amor
Por Deus esculpurada e formada com o ardor
Da alma da mais linda flor, de mais ativo olor
Que na vida é preferida pelo beija-flor.
Se Deus, me fora tão clemente, aqui neste ambiente
De luz formada numa tela, deslumbrante e bela
O teu coração, junto ao meu, lanceado, pregado
E crucificado sobre a rósea cruz do arfante peito teu.
Tu és a forma ideal, estátua magistral
Oh ! alma perenal do meu primeiro amor, sublime amor
Tu és, de Deus a soberana flor
Tu és , de Deus a criação, que em todo o coração
Sepultas o amor, o riso, a fé e a dor em sândalos olentes
Cheios de sabor, em vozes tão dolentes como um sonho em flor
És Láctea estrela , és mãe da realeza.
És tudo enfim que tem de belo
Em todo resplendor da santa natureza (...)*

(Pichinguiha)

AGRADEÇO

Ao Departamento de Pós-Graduação em Genética da UFPR por oferecer um curso de alto nível e à Universidade Federal do Paraná pela oportunidade de buscar novos horizontes para meus conhecimentos científicos. Agradeço em especial as Professoras Dras. Margarete e Chirlei pela atenção dedicada ao curso e a formação de seus alunos. Agradeço também a amiga Marli que me auxiliou nas questões burocráticas mas sempre com uma palavra amiga de conforto e paciência.

Agradeço ao CNPq pela bolsa de doutorado concedida, à Embrapa soja por possibilitar a realização deste trabalho e aos funcionários e amigos desta empresa pela colaboração e apoio recebido. Em especial ao querido Ademir pelas referências bibliográficas e a Dra. Marisa por ter me incentivado nos momentos difíceis.

Agradeço a todos os professores que participaram da minha formação, em especial ao professor Dr. João e a professora Dra. Marina pela compreensão diante de minhas limitações. Agradeço a professora Dra. Ligia por colaborar para a realização da minha disciplina de docência.

Aos queridos membros da banca: Dras. Ligia, Berenice, Chirlei e Marina e, Drs. Galdino e Fernando, pela paciência diante de todos os percalços neste final de tese. Quero registrar aqui minha eterna gratidão, pois sei que todos exercitaram sua compreensão e paciência afim de contribuir com o sucesso deste trabalho. Sei que a perfeição não foi atingida mas confesso ter dado o melhor de mim neste momento.

Aos meus colegas do laboratório dedido este trabalho com todo o carinho. Nenhuma palavra pode resumir o meu eterno agradecimento. Divido esta vitória com os amigos: Ligia, que sempre me amparou nas dúvidas estando ao meu lado nos momentos de perda. As amigas Pâmela e Fabiana pelas correções dos resultados, pela disponibilidade em ajudar e pelo profissionalismo com que assumiram essa empreitada em busca do meu doutorado. Aos amigos Fabinho e Alan, sempre apostos no bionumeric para auxiliar nos detalhes dos dendrogramas. Em especial ao amigo Fábio por me aturar diante das dúvidas, sejam elas profissionais ou não, obrigado pela segurança em poder contar contigo nas horas de desespero diante do computador. A amiga Jesi, de quem tive a oportunidade de me aproximar nos últimos tempos e quem revisou minhas referências para que eu ganhasse tempo nas últimas correções. Agradeço a amiga Lilian, pelas suas palavras de otimismo,

pelo seu bom humor e pela sua rara capacidade de elogiar as pessoas. Ao amigo Fernando agradeço pelas eternas discussões diante das dificuldades em otimizar as técnicas, mas agradeço mesmo as suas palavras de fé e confiança. Ao amigo Rinaldo por sua presença constante nos trabalhos em casa de vegetação. Agradeço a amiga Maria por me fazer compreender que as dificuldades não são maiores do que nossa capacidade de superá-las. Também agradeço o apoio: do Leandro, nos relaxamentos; da amiga Daisy e Eliane, pela calma transmitida; da Eriana pelas risadas com sotaque especial e; dos amigos Rodriguinho, Michele, Adrian, Mirian, Lucas.

Agradeço também aos antigos amigos do laboratório, que mesmo distantes, sempre estiveram em meu coração: Magda, Osvaldino, Ulisses, Luciano, Fernanda, Juninho, Everson, Manezinho, Taila. Em especial um grande abraço a amiga Dra. Marisa pela grande amizade, pelas trocas de informações e por me fazer acreditar na integridade do verdadeiro cientista. Quero deixar também um abraço especial aos estagiários de outros laboratórios que sempre dividiram comigo suas alegrias e angústias: Lizandra, minha conterrânea, de quem me orgulho muito; Angélica, Tati e Rose.

Agradeço pela amizade e carinho dos amigos Sabine, Silmar, Sonia e Lia com quem dividi meus trabalhos disciplinares e minhas horas de almoço no dia a dia da aulas. Obrigado por me ouvirem nas horas de solidão e agonia.

Aos amigos do Flamenco agradeço os momentos de prazer e felicidade dividindo comigo minha paixão pela arte andaluz. Um beijo grande ao meu professor Michel Cássin, de quem me orgulho e a quem agradeço por me fazer parte dessa grande família. Agradeço aos amigos Marlon, Glauber, André e Marcelo por estarem ao meu lado, mesmo sabendo que nem sempre estava certa. A amiga Flávia meu eterno agradecimento pela oportunidade de começar minha carreira acadêmica e de me oferecer a chance de acreditar que é no caminho da docência que devo seguir. Aos amigos Carol e Gui que, infelizmente pelo sofrimento, me ajudaram a reencontrar a minha fé e o meu amor próprio. A todas as bailarinas que passaram a acreditar no nosso grupo de oração como uma forma de ajudarmos uns aos outros.

Agradeço pela eterna presença dos velhos amigos: Iris, Liciania, Celiana, Carla, Ana Paula, Elaine, Silvia, Liliane, Marcio, Roberta, Andreia, Marcia, Abadia, Rony, Paulo, Flávio, Marcio pediatra, Licurgo. Em especial ao meu grande amigo Rodrigo, que mesmo diante das minhas falhas como parceira, nunca me abandonou e sempre prezou pelo contato. Obrigada por me fazer confiar na sua eterna amizade, obrigada por sempre ter acreditado no meu potencial. Um beijo especial a amiga Melissa que hoje sem encontra

distante, mas feliz por ter encontrado sua verdadeira pátria e a amiga Gisele em quem eu confio e com quem divido minhas angústias mais íntimas, mas também minhas verdades mais imperfeitas. Ao amigo Ed que hoje é mais que um amigo, que ajudou a mim e a minha família a superar um dos momentos mais difíceis que já passamos.

Aos amigos da bioética, com quem dividi o grande prazer de enveredar pelos conhecimentos da filosofia: Ogle, Mack, Fabi, Lauana, Alda, Lázara, Tânia. Em especial a professora Dra. Olivia por acreditar na minha capacidade de escrita e por lutar ao meu lado em busca de novas conquistas. Ao professor Dr. José Eduardo pelo convite em dividir comigo o mérito de estar ao seu lado na edição do primeiro livro em que participo. Espero que essa nova empreitada nos guie em busca de uma ciência mais justa e igualitária.

A minha querida amiga e companheira Glaciela, por quem já tinha grande apreço e que, devido as circunstâncias da vida, pude estreitar meus laços de amizade e admiração. Obrigada por tudo o que fez por mim, obrigada por me despertar todas as manhãs me lembrando da importância do meu compromisso. Obrigada por se preocupar comigo e por estar ao meu lado mesmo conhecendo muitos de meus defeitos e limitações.

Agradeço em especial ao meu irmão João Carlos por ter apostado na minha especialização em bioética e por me incentivar neste novo caminho em busca de mim mesma e, a minha irmã Terezinha, pelo seu eterno papel maternal salvando-me naquelas horas que somente uma mãe poderia participar. Um forte abraço aos meus queridos sobrinhos Betinho e Romeu e aos meus novos sobrinhos Felipe, Flávia e Murilo. Também sou grata pela torcida dos meus cunhados Betão, Denise, Irene, Fernando, Cássia, Joni. Um agradecimento especial vai para a D. Neusa, por sua preocupação, seu carinho e dedicação em melhorar minha qualidade de vida.

Ao meu companheiro Bays peço desculpas pelos sucessivos rompantes diante das dificuldades. Agradeço sua calma, seu carinho, seu amor e sua dedicação. Obrigada por sempre acreditar em mim, pelo orgulho com que fala de meus feitos e por nunca podar minha incessante participação em várias atividades sociais, negligenciando, muitas vezes, minha presença em sua vida. Aos meus gatinhos Lolo e Lilo pelo amor incondicional.

Finalmente ofereço aos meus pais não só este trabalho, mais tudo o que tenho de melhor, pois são nas minhas melhores qualidades que vejo a presença constante dos valores que me ensinaram durante toda a vida. "Mãe e Pai, eu amo muito vocês, sou grata por quem sou e por tudo o que me tornei. Sou grata pelas minhas conquistas e pela oportunidade que me deram para que eu buscasse o conhecimento como forma de conquistar meus sonhos e de me tornar uma verdadeira cidadã. Sinto a falta de vocês, de

saber que mesmo que eu queira não posso mais encontrá-los para dar-lhes um abraço. Mas uma ponta de felicidade aparece, ainda timidamente, quando percebo que agora, finalmente, posso ser eu mesma diante dos seus olhos”.

“O Senhor é o meu pastor; nada me faltará. Deitar-me faz em verdes pastos, guia-me mansamente a águas tranquilas. Refrigera a minha alma; guia-me pelas veredas da justiça pelo amor do seu nome. Ainda que eu andasse pelo vale da sombra da morte, não temeria mal algum porque tu estás comigo; a tua vara e o teu cajado me consolam. Preparas uma mesa perante mim na presença dos meus inimigos, unges a minha cabeça com óleo, o meu cálice transborda. Certamente que a bondade e a misericórdia me seguirão todos os dias da minha vida; e habitarei na casa do senhor por longos dias.”

SALMO 23.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE FIGURAS	15
RESUMO	17
ABSTRACT	18
INTRODUÇÃO	19
I. Revisão Bibliográfica	21
1. A cultura do feijoeiro (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	21
2. A importância do nitrogênio	25
3. A taxonomia dos rizóbios	28
4. A estrutura genética do rizóbio	32
4.1. A transferência horizontal (ou lateral) de gene (HGT ou LGT)	35
5. Processo de infecção e nodulação das raízes de feijoeiro	37
5.1. Atividades biológicas da molécula sinal	41
5.2. Genes envolvidos na biossíntese da molécula sinal (fator Nod)	43
5.1.1. Os genes <i>nodM</i> e <i>nodN</i>	46
5.1.2. O gene <i>nodC</i>	47
5.1.3. O gene <i>nodB</i>	47
5.1.4. O gene <i>nodA</i>	48
5.1.5. A regulação dos genes <i>nod</i>	49
6. Fixação biológica do nitrogênio	49
6.1. Genes implicados na síntese e regulação da nitrogenase	51
6.1.1. O gene <i>nifH</i>	53
7. Métodos empregados em estudos de diversidade de bactérias da família Rhizobiaceae	54
8. Distribuição geográfica do rizóbio	61
9. Estudo de diversidade do microssimbionte do feijoeiro no Brasil	65
9.1. Estudo de diversidade do microssimbionte do feijoeiro nas regiões do Cerrado	67
II. Material e Métodos	69
1. Bactérias	69
1.1. Diversidade de bactérias capazes de nodular o feijoeiro nos Cerrados brasileiros	69

1.1.1. Isolamento das bactérias dos Cerrados	69
1.2. Estudo de genes de nodulação e fixação de N₂ de <i>Rhizobium etli</i>	72
1.2.1. Estirpes de rizóbios utilizadas como referência	72
2. Caracterização dos isolados	75
2.1. Caracterização dos isolados capazes de nodular o feijoeiro provenientes dos Cerrados	75
2.1.1. Perfis de lipopolissacarídeos (LPS) dos isolados dos Cerrados	75
2.1.1.1. Índices de diversidade com base nos perfis de LPS	76
2.1.2. Caracterização genética dos isolados dos Cerrados	77
2.1.2.1. Extração do DNA total	77
2.1.2.2. Amplificação do DNA pela reação de PCR (Polymerase Chain Reaction) com o “primer” específico BOX (<i>rep</i>-PCR)	78
2.1.2.3. Análise de agrupamento dos produtos obtidos na análise de <i>rep</i>-PCR	79
2.1.2.4. Índices de diversidade com base na análise de <i>rep</i>-PCR	79
2.1.2.5. Amplificação do DNA pela reação de PCR com “primers” que codificam o gene 16S rRNA	80
2.1.2.6. Seqüenciamento da região do DNA que codifica o gene 16S rRNA	80
2.1.2.7. Análise de agrupamento das seqüências do gene ribossomal 16S rRNA	81
2.1.3. Caracterização simbiótica dos isolados dos Cerrados	82
2.1.3.1. Avaliação da capacidade de nodulação e fixação de N₂ dos isolados em casa de vegetação	82
2.2. Caracterização dos genes de nodulação e fixação de N₂ de <i>Rhizobium etli</i>	83
2.2.1. Caracterização genética das estirpes de <i>R. etli</i>	83
2.2.1.1. Extração do DNA total	83
2.2.1.2. Reação de PCR com “primers” que codificam a região plasmidial (<i>pSym</i>) contendo o genes <i>nodA</i>, <i>nodB</i>, <i>nodC</i> e <i>nifH</i>	83
2.2.1.3. Perfil de RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism) dos genes <i>nodA</i>, <i>nodB</i>, <i>nodC</i> e <i>nifH</i>	85
2.2.1.4. Análise de agrupamento dos produtos obtidos na análise de RFLP-PCR dos genes de <i>nod</i> e <i>nif</i>	86
III. Resultados	87
Estudo 1	87
1. Diversidade de bactérias capazes de nodular o feijoeiro nos Cerrados	87
1.1. Perfis de lipopolissacarídeos (LPS) dos isolados dos Cerrados	87
1.2. Análise de agrupamento dos produtos obtidos por <i>rep</i>-PCR	90

1.3. Índices de diversidade obtidos para as populações dos Cerrados	94
1.4. Seqüenciamento, nos isolados dos Cerrados, da região do DNA que codifica o gene 16S rRNA	96
1.5. Capacidade de nodulação e fixação de N₂ dos isolados dos Cerrados	99
Estudo 2	101
2. Estudo de genes de nodulação e fixação de N₂ de <i>R. etli</i>	101
2.1. Análise polifásica do perfil de PCR-RFLP da região que codifica o gene <i>nodA</i>	103
2.2. Análise polifásica do perfil de PCR-RFLP da região que codifica o gene <i>nodB</i>	96
2.3. Análise polifásica do perfil de PCR-RFLP da região que codifica o gene <i>nodC</i>	105
2.4. Análise polifásica do perfil de PCR-RFLP das regiões que codificam os genes <i>nodA</i>, <i>nodB</i> e <i>nodC</i>	108
2.5. Análise polifásica do perfil de PCR-RFLP da região que codifica o gene <i>nifH</i>	110
2.6. Análise polifásica do perfil de PCR-RFLP da região que codifica os genes <i>nodA</i>, <i>nodB</i>, <i>nodC</i> e <i>nifH</i>	110
IV. Discussão	114
Estudo 1	114
Diversidade de bactérias capazes de nodular o feijoeiro nos Cerrados	114
Estudo 2	121
Genes de nodulação e fixação de N₂ de <i>Rhizobium etli</i>	121
V. CONCLUSÃO	126
Estudo 1	126
Estudo 2	127
VI. REFERÊNCIAS	129

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Isolados de nódulos do feijoeiro provenientes de solos dos Cerrados do Distrito Federal obtidos e utilizados neste estudo. Nas coleções de culturas da Embrapa Soja e Embrapa Cerrados esses isolados receberam a denominação “H”.....	60
TABELA 2. Características dos tipos de vegetação dos Cerrados.....	61
TABELA 3. Origem das 43 estirpes de feijoeiro obtidas de solos de Pernambuco e do Paraná e classificadas como <i>Rhizobium etli</i> no estudo de Grange & Hungria (2004)1.....	63
TABELA 4. Estirpes utilizadas como referência nos estudos de rizóbios microssimbiontes do feijoeiro.....	64
TABELA 5. Perfis de lipopolissacarídeos (LPS) e posicionamento em grande grupos (GG) na análise de rep-PCR de isolados de nódulos de feijoeiro inoculado com diluições de solos provenientes de áreas cultivadas e não cultivadas dos Cerrados.....	79
TABELA 6. Distribuição dos isolados dos Cerrados, provenientes de áreas cultivadas ou não cultivadas anteriormente, segundo a distribuição em grandes grupos (GG) no dendrograma obtido na análise dos produtos de BOX-PCR.....	83
TABELA 7. Índices de diversidade, estimados pelos perfis de lipopolissacarídeos, de isolados dos Cerrados provenientes de áreas sob manejos distintos.....	85
TABELA 8. Índices de diversidade, estimados pelos perfis de BOX-PCR, de isolados dos Cerrados provenientes de áreas sob manejos distintos.....	85
TABELA 9. Coeficientes de similaridade, não ajustados e ajustados, entre as populações de microssimbiontes do feijoeiro isolados de áreas dos Cerrados sob três manejos distintos: não cultivadas, cultivadas com leguminosas mas não com feijoeiro e cultivadas com não leguminosas.....	87
TABELA 10. Nodulação (número, NN e massa de nódulos secos, MNS), biomassa de planta (massa da parte aérea seca, MPAS) e N total acumulado na parte aérea (NTPA) de feijoeiro,	

cultivar Carioca, inoculado com 93 isolados de áreas cultivadas e não cultivadas dos Cerrados1. Ensaio conduzido em condições axênicas de casa de vegetação, cada estirpe foi inoculada individualmente, com três repetições e as plantas foram coletadas no florescimento.....90

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Ciclo do nitrogênio: O nitrogênio atmosférico é reduzido e incorporado aos compostos orgânicos dos seres vivos. Além da fixação biológica, os principais processos envolvidos no ciclo do nitrogênio são os da amonificação, nitrificação e desnitrificação (Fonte: Manyani et al., 2001). 25

FIGURA 2. Sinais específicos entre o *R. tropici*, por exemplo, e sua leguminosa hospedeira. *pSym*, plasmídeo simbiótico, gene da nodulação; proteína Nod; proteína reguladora NodD UDP-GlcNAc, precursor do esqueleto oligosacarídico da molécula sinal (Fonte: Manyani et al., 2001).

FIGURA 3. Pêlo radicular sendo infectado por *Rhizobium* (Foto cedida por Marisa F. Nicolas).

FIGURA 4. Formação dos bacteróides (Foto cedida por Marisa F. Nicolas).

FIGURA 5. Nódulos de raiz infectados (Fonte: Hungria, 1994b).

FIGURA 6. Simbiose estabelecida. À esquerda: nódulos de raiz; à direita: planta infectada e não infectada (Hungria, 1994b).

FIGURA 7. Rota biossintética da estrutura básica de um fator de nodulação. (Fonte: Downie, 1998)

FIGURA 8. Distribuição geográfica da Região dos Cerrados. (Fonte: Mostasso et al., 2002).

FIGURA 9. Perfis de lipopolissacarídeos encontrados em 93 isolados de nódulos de feijoeiro inoculado com diluições de solos provenientes de áreas cultivadas e não cultivadas dos Cerrados.

FIGURA 10. Dendrograma construído com 73 isolados dos Cerrados e com estirpes utilizadas como referência, obtido pela análise de agrupamento dos produtos de amplificação da reação por BOX-PCR, com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard

FIGURA 11. Dendrograma construído utilizando o algoritmo UPGMA e as seqüências alinhadas do gene 16S rRNA de 45 estirpes microssimbiontes do feijoeiro isoladas de solos dos Cerrados e de estirpes utilizadas como referência

FIGURA 12. Produtos de PCR correspondents ao gene *nodA* de algumas estirpes brasileiras de *R. etli*.

FIGURA 13. Produtos de PCR correspondents ao gene *nodB* de algumas estirpes brasileiras de *R. etli*.

FIGURA 14. Produtos de PCR correspondents ao gene *nodC* de algumas estirpes brasileiras de *R. etli*.

FIGURA 15. Produtos de PCR correspondents ao gene *nifH* de algumas estirpes brasileiras de *R. etli*.

FIGURA 16. Dendrograma obtido pela análise por RFLP-PCR da região gênica do *nodA* com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J)

FIGURA 17. Dendrograma obtido pela análise por RFLP-PCR da região gênica do *nodB* com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J).

FIGURA 18. Dendrograma obtido pela análise por RFLP-PCR da região gênica do *nodC* com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J).

FIGURA 19. Dendrograma obtido pela análise por RFLP-PCR das regiões gênicas dos *nodA*, *nodB* e *nodC* com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J).

FIGURA 20. Dendrograma obtido pela análise por RFLP-PCR da região do *nifH* com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J).

FIGURA 21. Dendrograma obtido pela análise por RFLP-PCR das regiões gênicas dos *nodA*, *nodB*, *nodC* e *nifH* com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J).

RESUMO

Depois da água, o nitrogênio (N) é o principal elemento nutricional limitante para a produção vegetal nos diferentes ecossistemas. O fertilizante nitrogenado se tornou então, um produto essencial para o manejo de culturas comerciais mas de alto custo, dificultando o acesso por parte de pequenos produtores, como é o caso dos plantadores de feijão. Neste contexto, a fixação biológica do nitrogênio (FBN) representa uma alternativa para satisfazer a demanda deste importante nutriente, tanto para ecossistemas agrícolas como para naturais. Conhecer todos os fatores implicados na manutenção desta prática se torna de suma importância, pois, além de colaborar para uma agricultura sustentável, auxilia nas investigações a cerca da diversidade de espécies que podem representar a veracidade das características da microbiota dos solos brasileiros. Nesta investigação foram conduzidos dois estudos de caracterização genética bacteriana. No primeiro, quatro avaliações foram aplicadas (perfil de lipopolissacaródeo-LPS, análise de agrupamento dos produtos obtidos por *rep*-PCR, sequenciamento do gene ribossomal 16S e capacidade de nodulação e fixação de N₂) em 93 isolados para analisar a diversidade de bactérias capazes de nodular o feijoeiro sob distintos manejos de solo (áreas cultivada com leguminosas, áreas cultivadas sem leguminosas e áreas de solo coberto com vegetação natural) em 20 diferentes áreas dos Cerrados. Neste trabalho foi possível verificar, através do cálculo dos índices de diversidade e riqueza genética, que a diversidade genética bacteriana dos solos dos Cerrados em equilíbrio altera rapidamente em função das práticas de manejo de solo. Pelo sequenciamento de 16S rRNA, foi confirmado que bactérias pertencentes à subclasse beta são capazes de nodular o feijoeiro, pois diversas estirpes apresentaram maior similaridade de bases com o gênero *Burkholderia*. Portanto, este estudo demonstrou que o uso do solo nos Cerrados promoveu mudanças quantitativas e qualitativas na diversidade de bactérias capazes de nodular e fixar N₂ com o feijoeiro. No segundo estudo conduzido por esta investigação, bactérias classificadas em *Rhizobium etli* por sequenciamento do 16S rRNA, foram comparadas pela análise de RFLP-PCR dos genes de nodulação e fixação. Uma análise polifásica também foi construída com os resultados obtidos para cada gene digerido com seis diferentes enzimas (*Msp* I, *Hinf* I, *Rsa* I, *Hha* I, *Nde* III e *Mbo* II). Pela análise de RFLP-PCR dos genes *nodA*, *nodB*, *nodC* e *nifH* foi possível verificar que as estirpes brasileiras de *R. etli* sempre formaram um grupo distinto, ainda que com variabilidade intra-específica. Na análise polifásica incluindo os genes *nodA*, *nodB*, *nodC* e *nifH*, os grupos referentes às diferentes espécies foram evidenciados. As estirpes de *R. tropici* e *Rhizobium* sp. formaram um agrupamento bastante heterogêneo, com um nível final de similaridade de apenas 40,7%. As estirpes brasileiras de *R. etli* foram agrupadas com 64,1% de similaridade e *R. etli* CFN 42 se uniu a esse grupo em 53,7%. Já o grupo de *R. etli* isolado da Espanha foi bastante distinto. Os resultados indicam que a população estabelecida nos solos de Cerrados foi caracterizada pela diversidade elevada quanto às propriedades fisiológicas, simbióticas e genéticas e que; os *R. etli* brasileiros precisam se mais profundamente avaliados, pois pode representar uma nova sub-espécie num futuro próximo.

Palavras-chave: Feijoeiro, Diversidade, *Rhizobium etli*, *Burkholderia*, Cerrados, FBN, evolução, população.

ABSTRACT

Water is the most limiting factor in agriculture, usually followed by nitrogen (N). N-fertilizer has thus become essential for the management of commercial crops, but its high cost often implicates in a low usage by small farmers, as those growing common bean (*Phaseolus vulgaris*). In this context, biological nitrogen fixation (BNF) represents an alternative source to supply N at a low cost. However, the maximization of BNF depends on short, medium and long-time research, and studies aiming at increasing the knowledge about the community of microsymbionts in the soils fit into this last category. The main objective of this work was to perform two studies aiming at the characterization of rhizobia associated with the common bean crop in Brazilian soils. In the first study, the diversity of 93 common bean microsymbionts from the Cerrados soils was evaluated using four methodologies: profiles of lipopolysaccharides (LPS), DNA amplification by *rep*-PCR (polymerase chain reaction) with the BOX “primer”, sequencing of bases of the ribosomal 16S gene and capacity of nodulation and BNF. Common bean plants were used to trap the isolates from ten areas covered with natural vegetation, from five areas cropped with non-legumes and from five areas growing legumes, but none with bean. The sequencing analysis indicated that bacteria belonging to the genus *Burkholderia* are capable of nodulating beans and in this study they represented the majority of the isolates in undisturbed areas, while rhizobia predominated in cropped areas. Using the BNF process as a model, a high level of diversity was shown in all areas, however, diversity and richness indices drastically decreased with crop introduction, particularly when growing legumes. Contrarily, cropping resulted in a fast selection of microsymbionts with higher capacity of BNF, especially in the presence of legumes. Three important points were highlighted in this study: 1) a need of maintaining undisturbed areas to preserve the biodiversity of the Cerrados; 2) that when the ecosystem equilibrium is broken there is an immediate process of selection and adaptation of the bacteria aiming at, within the potential of the community, the crop sustainability; 3) that biodiversity is not necessarily associated with the sustainability of commercial crops. In the second study, nodulation (*nodA*, *nodB* e *nodC*) and N₂ fixation (*nifH*) genes of Brazilian strains of *Rhizobium etli* were analysed by RFLP (restriction fragment length polymorphism)-PCR with six restriction enzymes. The Brazilian strains of *R. etli* were clustered in a group isolated from other bean rhizobia species, but with high intra-species variability. The group of Brazilian strains showed higher similarity, although at low levels, with type-strain CFN 42 from Mexico, being considerably different from *R. etli* from Spanish soils. A hypothesis was proposed that *R. etli* was introduced in Brazil via seeds from indigenous populations of Mesoamerica, before European colonization. Later, *R. tropici* was introduced via migration from center-south Andes and due to its higher adaptability to the environmental conditions in Brazil it has become the preferential symbiont of common bean; however, *R. etli* persists in Brazilian soils.

Key-words: Bacteria evolution, Biodiversity, Biological nitrogen fixation, *Burkholderia*, Cerrados, Common bean, *Rhizobium etli*, *Phaseolus vulgaris*.

INTRODUÇÃO

O feijoeiro se constitui numa importante cultura de subsistência e principal fonte de proteínas na dieta humana de populações pobres, especialmente na América Latina e alguns países africanos (CIAT, 1990). O feijão possui de 20 a 25% de proteínas ricas em aminoácidos como a lisina e treonina, exercendo assim efeito complementar na dieta, uma vez que estes são deficientes nos cereais (Hungria et al., 1997). No Brasil, segundo maior produtor mundial, é cultivado em vastas áreas embora com níveis baixos de produtividade média, cerca de 732 kg/ha (FAO, 2005), uma vez que grande parte da produção está ligada a pequenas e médias propriedades, geralmente utilizando baixo nível tecnológico. Grandes áreas irrigadas com utilização de insumos destacam-se nos Cerrados (Goiás e Minas Gerais) e nos Estados da Bahia (região de Barreiras, Santa Maria e Bom Jesus da Lapa) e Espírito Santo (Yokoyama et al., 1996). Estas regiões apresentam produtividades médias bem mais elevadas, 1.225 kg/ha, nos chamados plantios da terceira safra ou de “inverno”, que respondem por 11% da produção nacional total, segundo dados compilados por Yokoyama et al. (1996).

Enquanto alguns agricultores escolhem suas melhores áreas ainda dispondo de matéria orgânica em níveis razoáveis para o sustento da cultura, dados levantados pelo CIAT (1990) mostram que 40% das áreas plantadas com esta cultura na América Latina e 60% na África, são deficientes em nitrogênio. Considerando-se o custo dos fertilizantes nitrogenados e o seu impacto sobre o meio ambiente, estudos visando a utilização da inoculação com o rizóbio se constituem numa alternativa para o fornecimento do nitrogênio necessário à cultura, perfeitamente adequado ao sistema produtivo dominante destes países. Portanto, novas linhas de pesquisa têm resultado num melhor conhecimento desta simbiose e novas abordagens do problema têm buscado melhorar esta interação visando aumentar a produtividade da cultura sob condições simbióticas e sua adequação ao clima tropical.

O processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN) consiste na conversão do N_2 atmosférico em NH_3 . Essa reação é catalizada pela enzima nitrogenase que é encontrada em todos os organismos fixadores de N_2 . Esse processo é realizado pela associação estreita, também chamada de simbiose, entre diversas leguminosas e bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, denominadas popularmente de rizóbio (Vargas et al., 2002). Esta relação

biológica é chamada de simbiose porque a planta hospedeira beneficia a bactéria pelo fornecimento de carboidratos e a bactéria beneficia a planta através da produção de amônia (Vargas e tal., 2002). Na simbiose entre leguminosa e bactérias do gênero *Rhizobium*, a reação da FBN ocorre no interior de estruturas que se formam nas raízes da planta hospedeira chamadas de nódulos. A formação dos nódulos é iniciada a partir de um mecanismo complexo de sinais entre a leguminosa hospedeira e o rizóbio (Vargas et al., 2002). Esse processo inicial se torna primordial, pois desencadeia uma série de reações que resultam na penetração do rizóbio específico em relação a leguminosa escolhida garantindo o sucesso da FBN.

Portanto, estudos que buscam investigar os fatores fisiológicos, morfológicos e genéticos implicados nessa primeira etapa do processo de FBN, se tornaram, nos últimos anos, de suma importância não só para estabelecer a uma relação simbiótica mais eficiente do ponto de vista agrônomo, mas também contribuem de forma consistente no reconhecimento taxonômico de novas espécies de fixadores de leguminosa. O estudo da biodiversidade dentro destas espécies, especialmente em regiões tropicais, além de buscar entender suas complexas relações ecológicas e evolucionárias, envolve a procura de genótipos tolerantes aos diferentes estresses ambientais presentes nestas áreas e limitantes à esta simbiose, visando o manejo mais eficiente desta interação (Straliotto & Rumjanek, 1999)

É neste contexto, que este trabalho visa investigar as bactérias fixadoras de nitrogênio presentes nos trópicos brasileiros em relação a cultura do feijoeiro. Dois experimentos foram conduzidos em busca de novos parâmetros genéticos que pudessem contribuir para o reconhecimento taxonômico dos rizóbios em relação a diferentes ecossistemas brasileiros. No primeiro, isolados provenientes dos Cerrados foram analisados em relação a diferentes manejos do solo. Esta investigação teve o objetivo de reconhecer o comportamento genético destas estirpes nativas quando submetidas a áreas de cultivo. No segundo, espécies anteriormente classificadas como *R. etli* através da técnica de sequenciamento do gene ribossomal 16S, foram avaliadas em relação a regiões gênicas plasmidiais utilizadas como marcadores moleculares. O objetivo deste experimento foi reavaliar a classificação estabelecida para esses isolados questionando o real estabelecimento destas espécies nos trópicos brasileiros.

I. Revisão Bibliográfica

1. A cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é considerado uma fonte protéica vegetal relevante bem como, de aminoácidos essenciais, tornando-se assim a leguminosa mais importante para a nutrição humana (Velazquez et al., 1988). Participa da alimentação de cerca de 500 milhões de pessoas na América Latina, no leste e sul da África e representa a única fonte protéica para cerca de 100 milhões de consumidores empobrecidos, cuja dieta é baseada em amido (Mariot, 1989; CIAT, 1990). No Brasil, esta leguminosa tem importância social e econômica, por ser responsável pelo suprimento de grande parte das necessidades alimentares da população de baixo poder aquisitivo, que ainda tem apresentado taxas de crescimento relativamente altas e também, pelo contingente de pequenos produtores que se dedicam à cultura.

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

Os feijões estão entre os alimentos mais antigos da civilização, remontando aos primeiros registros da história da humanidade (Embrapa, 2005). Eram cultivados no antigo Egito e na Grécia, sendo também cultuados como símbolo da vida. Os antigos romanos

usavam extensivamente feijões nas suas festas gastronômicas, utilizando-os até mesmo como pagamento de apostas. Foram encontradas referências aos feijões na Idade do Bronze, na Suíça e entre os hebraicos, há cerca de 1.000 a.C. As ruínas da antiga Tróia revelam evidências de que o feijão era o prato favorito dos robustos 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 (Embrapa, 2005).

Para o ser humano, o consumo do feijão sempre representou grandes vantagens do ponto de vista nutricional, primeiramente, pelo conteúdo protéico relativamente elevado e o alto teor de lisina, que exerce efeito complementar às proteínas dos cereais (Lajolo et al., 1996). As fibras dietéticas têm implicações terapêuticas importantes em certas condições de saúde, como diabetes e hiperglicemia e são também relacionadas como componentes preventivos em outras, como hipertensão arterial, doenças cardiovasculares e distúrbios intestinais (Costa & Vieira, 2000). Além de apresentar alto conteúdo de carboidratos componentes da fibra (celulose, hemicelulose e lignina) e digeríveis (amido e sacarose), encontram-se no feijão alguns oligossacarídeos (rafinose, estaquiose, verbascose). O feijão também é uma fonte importante de vitaminas hidrossolúveis, como a tiamina, a riboflavina, a niacina e a folacina, que são vitaminas do complexo B envolvidas na prevenção de certos defeitos fetais, cardiovasculares e certos tipos de câncer) (Costa & Vieira, 2000). Assim, o feijão sempre teve papel importante na dieta das populações, contribuindo de forma positiva para a manutenção da saúde humana.

Apesar de o Brasil ser o maior consumidor de feijão do mundo, o consumo per capita ao longo dos últimos 40 anos apresentou uma tendência decrescente da ordem de 1,3% ao ano, enquanto a população cresceu 2,2% (Ferreira et al., 2002). Esse decréscimo não ocorreu de forma contínua, existindo oscilações anuais. Nos primeiros dez anos, Junqueira et al. (1971) mostraram que a queda no consumo estava associada a questões de clima, pragas e doenças e de outros problemas agrônômicos, além dos problemas de política agrícola, que afetavam a oferta do produto. Alguns estudos mostram que o processo de urbanização e a perda do poder aquisitivo da população menos favorecida explicam mais da metade da redução no consumo no período compreendido entre meados da década 70 e final dos anos 80 (Hoffmann, 2000).

Posteriormente, essa queda ocorreu devido a mudanças nos hábitos alimentares da população e as novas alternativas de alimentação mais rápida e rica em proteínas que substituíram o feijão (Yokoyama et al., 1996). De acordo com o censo 2000, cerca de 81% da população brasileira está concentrada nas cidades, o que corresponde a 137 milhões de pessoas. Esta rápida urbanização associada à crescente inserção da mulher no mercado de trabalho provocou um efeito acentuado nas mudanças do hábito alimentar da população e originaram novas demandas quanto à qualidade, apresentação, facilidade e menor tempo de preparo alimentos (Ferreira et al., 2002). Num panorama decrescente, enquanto na década de 70 o consumo chegou a alcançar patamares de 23-24 kg/habitante/ano, em 2001 o consumo per capita no Brasil situou-se em 14,9 kg/habitante/ano (Embrapa, 2005).

Considerando todos os gêneros e espécies de feijão englobados nas estatísticas da CONAB (2004), a produção mundial de feijão situou-se em torno de 18,9 milhões de toneladas, ocupando uma área de 23,2 milhões de hectares e envolvendo cerca de 107 países produtores em todo o mundo. Cerca de 65,1% da produção foram oriundos de apenas sete países, sendo a Índia responsável por 15,3% e o Brasil 14,6%. Apesar do pequeno volume de produção mundial de feijão, cerca de 14% são produzidos para exportação. Em 2000, cinco países foram responsáveis por 80,2% dessa exportação: Myanmar, 26,9%; China, 18,5%; Estados Unidos, 14,5%; Argentina, 11,0%; e Canadá, 9,3%, movimentando cerca de 1 bilhão de dólares com a transação deste produto (FAO, 2005).

A produção do feijão no Brasil apresenta três safras: a primeira é cultivada principalmente nas regiões Sul e Sudeste e na Região de Irecê, na Bahia, cuja colheita está concentrada nos meses de dezembro a março. A colheita da segunda safra ocorre entre os meses de abril e julho e a terceira safra, em que predomina o cultivo irrigado, está concentrada nos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Distrito Federal e oeste da Bahia, sendo ofertada no mercado entre julho e outubro (Embrapa, 2005).

Em relação ao ano agrícola de 2004, o cultivo de feijão foi inferior ao ano anterior em 568,8 mil hectares, ou seja, passou de 4.287,4 mil hectares para 3.718,6 mil hectares, com a safra de 2005, observa-se uma redução de 25,0%, ou seja, em termos absolutos, de 343,2 mil hectares (CONAB, 2004). A segunda safra apresenta uma redução de 9,6%, ou seja, 195,3 mil hectares em termos absolutos. Para a terceira safra a redução estimada é de 3,4%, ou seja, 30,3

mil hectares. Esta redução na área plantada se deve, principalmente, às perdas nas regiões Norte e Nordeste, com 7,6% e Centro-Sul com 12,9% (Ferreira et al., 2002).

Considerando somente o *Phaseolus vulgaris*, o Brasil é o maior produtor, seguido do México. Entretanto, a produção brasileira de feijão tem sido insuficiente para abastecer o mercado interno, devido à redução na área plantada, da ordem de 35%, nos últimos 17 anos (Yokoyama & Stone, 2000). A produtividade média brasileira também se encontra abaixo das expectativas e, atualmente, apresenta uma média de 757 kg ha⁻¹ (FAO, 2005), considerando uma produtividade média mundial de 695 kg ha⁻¹. Outros países produtores apresentam as seguintes produtividades: Myanmar, 865 kg ha⁻¹; China, 1.667 kg ha⁻¹ Estados Unidos, 1676 kg ha⁻¹, Argentina, 1.162 kg ha⁻¹ e Canadá, 1812 kg ha⁻¹ (FAO, 2005).

Por fim, a falta de tecnologia e o cultivo em solos marginais, devido ao baixo retorno econômico da cultura, contribuem, decisivamente, para baixa produtividade do feijoeiro e nesse quadro, o fornecimento adequado de nutrientes, particularmente o nitrogênio (N) e o fósforo (P), representam um dos fatores limitantes à obtenção de maiores rendimentos no Brasil (Araújo, 1994).

A maioria dos solos onde o feijoeiro é cultivado é composta de oxissolos com baixa fertilidade. Como exemplo, os valores médios das propriedades químicas dos solos dos Cerrados em estado natural são: pH 5,2; P 2 mg kg⁻¹; K < 50 mg kg⁻¹; Ca < 1,5 cmolc kg⁻¹; Mg < 1 cmolc kg⁻¹, Zn e Cu em torno de 1 mg kg⁻¹, matéria orgânica na faixa de 15 a 25 g kg⁻¹ e saturação por bases < 25%. Com base nestes dados pode-se concluir que os solos dos Cerrados, em geral, são ácidos e de baixa fertilidade. Portanto, o manejo da fertilidade é um dos aspectos mais importantes na produção das culturas nesses solos (Fageria & Baligar, 2001).

Calcula-se que 40% da área plantada com feijoeiro na América Latina e 60 % das áreas no Oriente Médio e África apresentam deficiência de nitrogênio (N) (CIAT, 1990). Os teores de N nos solos do Brasil, de um modo geral, não são elevados e com a intensificação da agricultura, as exigências nutricionais de N, bem como a sua remoção são ampliadas. Conseqüentemente, se o N do solo retirado pela planta não for repostado o teor desse nutriente decrescerá rapidamente. Nesse contexto, assume grande importância o processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN) que, além de ser uma tecnologia de baixo custo, também

contribui para a preservação da fertilidade do solo e para a preservação ambiental de rios, lagos e lençóis freáticos pelo menor uso de fertilizantes nitrogenados (Hungria et al., 1997).

Considerando que o feijoeiro é cultivado principalmente por pequenos agricultores, em solos muitas vezes deficientes em N mineral, esforços para a melhoria do processo de simbiose da cultura com os rizóbios inoculados nas sementes podem corresponder a aumentos significativos no rendimento de grãos. Essa via biológica se torna ainda mais importante quando se leva em consideração os custos elevados do N mineral, limitando a sua utilização, principalmente pelos pequenos agricultores.

2. A importância do nitrogênio

Depois do carbono (C) e do hidrogênio (H), o N é o elemento mais importante na constituição da matéria orgânica, representando de 8 a 16% do total. O N participa da formação de moléculas fundamentais em diversos processos biológicos, tais como a produção de ácidos nucleicos e proteínas. Apesar de sua abundância na atmosfera na forma de N_2 (79%), o N constitui junto com água, o principal fator limitante da produção agrícola mundial, pois nenhum animal ou planta é capaz de utilizá-lo diretamente, devido à tripla ligação que existe entre os dois átomos do N_2 , que é uma das mais fortes de que se tem conhecimento na natureza (Manyani et al., 2001).

As principais fontes fornecedoras do nitrogênio necessário ao crescimento das plantas são: **1)** nitrogênio do solo, proveniente da decomposição da matéria orgânica e das rochas; **2)** nitrogênio fornecido por fertilizantes; **3)** nitrogênio fornecido pelo processo da fixação biológica do nitrogênio atmosférico (N_2). Existe, também, uma pequena contribuição pela reação de descargas elétricas com N_2 , resultando em nitrato, que é adicionado ao solo e representa cerca de 4% das entradas positivas no balanço de N na Terra. O fornecimento, utilização e perdas do N formam um ciclo complexo, denominado “ciclo do N” (Hungria et al., 2001) (FIGURA 1).

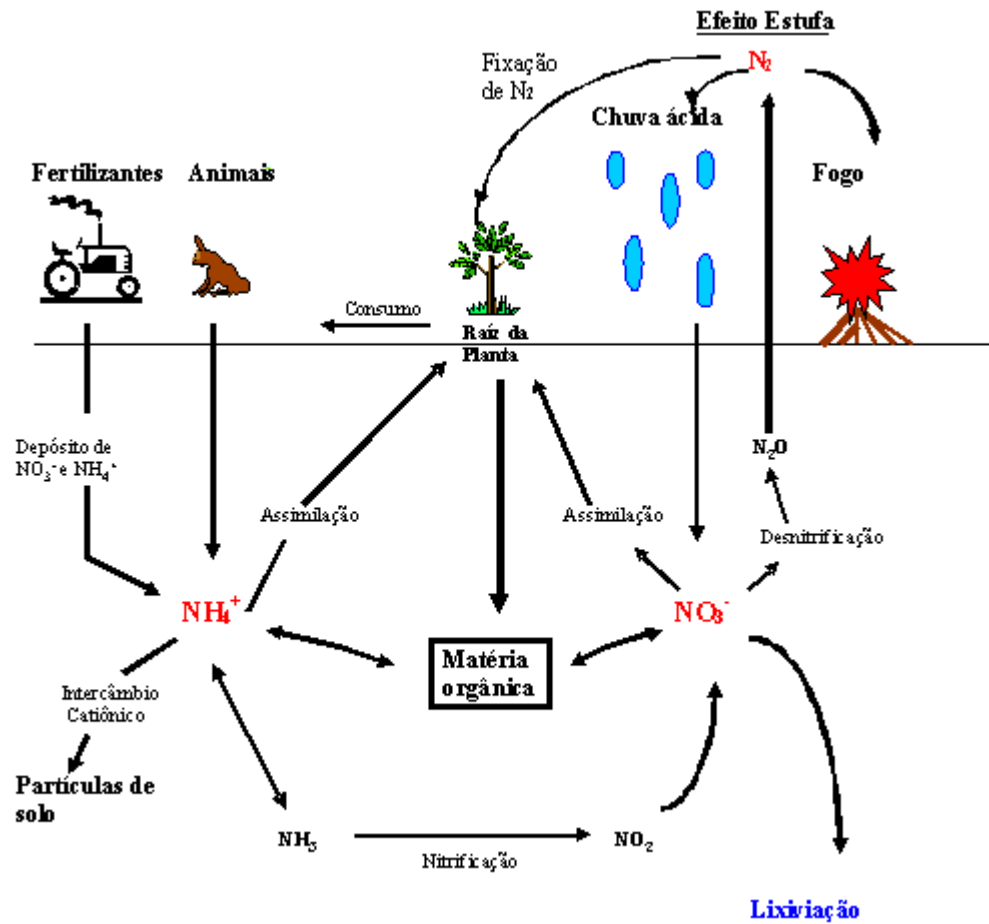


FIGURA 1. Ciclo do nitrogênio: O nitrogênio atmosférico é reduzido e incorporado aos compostos orgânicos dos seres vivos. Além da fixação biológica, os principais processos envolvidos no ciclo do nitrogênio são os da amonificação, nitrificação e desnitrificação (Fonte: Manyani et al., 2001).

A síntese de fertilizantes nitrogenados iniciou na primeira década do século XX, quando Fritz Haber e Carl Bosch descobriram o processo que transforma N_2 atmosférico em amônia. As necessidades para essa síntese química são: **1)** hidrogênio (derivado de gás de petróleo); **2)** catalizador contendo ferro; **3)** altas temperaturas (300°C a 600°C); **4)** altas pressões (200 atm a 800 atm) (Hungria et al., 1997). Conseqüentemente, o custo econômico para a síntese química de fertilizantes nitrogenados é elevado e, resultante principalmente, da necessidade de gasto de fontes de petróleo, ou seja, energia não renovável. Calcula-se que, para a síntese de uma tonelada de amônia, sejam necessários seis barris de petróleo. Práticas

alternativas para diminuir esses custos precisam ser procuradas, principalmente no Brasil, que importa fertilizante nitrogenado para satisfazer à demanda interna (Hungria et al., 2001).

Um outro agravante na utilização de fertilizantes nitrogenados reside na baixa eficiência de sua utilização pelas plantas, raramente ultrapassando 50%. Deve-se considerar ainda, que o uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados resulta em poluição ambiental, pois a lixiviação do N e o escoamento desse nutriente pela superfície do solo resultam em acúmulo de formas nitrogenadas nas águas dos rios, lagos e lençóis de água subterrâneos, podendo atingir níveis tóxicos a peixes e ao homem (Hungria et al., 2001).

Bactérias da ordem *Rhizobiales* formam estruturas altamente específicas, os nódulos, onde ocorre a conversão do N₂ atmosférico a amônia, que é então incorporada em diversas formas de N orgânico para a utilização por algumas plantas, principalmente da família *Leguminosae*. Essas bactérias conseguem quebrar a tripla ligação do N₂ pela ação de um complexo enzimático, chamado dinitrogenase; este processo é denominado de fixação biológica do N₂ (Morgante, 2003). Com esse mecanismo alternativo é possível economizar milhões em dólares de petróleo e gás natural (fontes energéticas não renováveis), contribuindo para reverter o quadro de queda de produção e produtividade do país aumentando a média nacional sem o uso de adubos nitrogenados (Vargas & Hungria, 1997) e diminuindo a poluição de rios e lagos. Em termos globais, estima-se que a FBN contribua com 65% da entrada anual de N na Terra, enquanto que a produção industrial contribui com 24% e a fixação não-biológica com cerca de 10% (Hungria et al., 2001).

Considerando-se o baixo custo do inoculante e a aplicação de uma dose de inoculante por hectare, os custos de implantação de uma cultura poderiam diminuir em milhões de dólares, representando uma grande economia de divisas, que poderiam ser direcionadas para outros aspectos da melhoria da produtividade agrícola, como por exemplo, outros insumos importantes para a cultura do feijoeiro (Araújo, 1994).

3. A taxonomia dos rizóbios

Atualmente, os rizóbios estão classificados como pertencentes a: Domínio: *Bacteria*; Filo: *Proteobacteria*; Classe: *Alfaproteobacteria*; Ordem: *Rhizobiales*; e distribuídos nas Famílias *Rhizobiaceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Bradyrhizobiaceae* e *Hiphomicrobiaceae* (Garrity & Holt, 2001). Além disso, algumas bactérias capazes de nodular e fixar N₂ em simbiose com leguminosas foram, recentemente, identificadas como pertencentes à Classe das *Betaproteobacteria*; Ordem: *Burkholderiales*; Família: *Burkholderiaceae*; Gênero: *Burkholderia* (Moulin et al., 2001) e, também pertencentes à Classe das *Alfaproteobacterias*; Ordem: *Rhizobiales*; Família: *Methylobacteriaceae*; Gênero: *Methylobacterium* (Sy et al., 2001).

O agrupamento dos rizóbios foi inicialmente baseado em características fenotípicas, principalmente na habilidade de nodular algumas leguminosas, dando origem ao conceito de “grupos de inoculação cruzada”. A taxonomia do rizóbio, baseada na especificidade hospedeira, foi sendo substituída pela taxonomia numérica, que se apoia nas características bioquímicas, fisiológicas, sorológicas e moleculares (Hungria et al., 1997).

Primeiramente, a família *Rhizobiaceae* era representada apenas pelo gênero *Rhizobium*, o qual era constituído por bactérias capazes de nodular e fixar nitrogênio em relações simbióticas com plantas da família *Leguminosae*. As espécies simbióticas eram *Rhizobium leguminosarum* (espécie tipo), *Rhizobium japonicum*, *Rhizobium lupini*, *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium phaseoli* e *Rhizobium trifoli*. Espécies de *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Agrobacterium rubi* e espécies de *Phyllobacterium myrsinacearum* e *Phyllobacterium rubiacearum*, todas causando hipertrofia em plantas, foram também incluídas na família *Rhizobiaceae* (Skerman et al., 1980). A classificação das espécies, nesse período, tinha como base, principalmente, a leguminosa hospedeira com as quais fossem capazes de formar nódulos e fixar nitrogênio. Desse modo, *Rhizobium phaseoli* nodula feijoeiro; *R. japonicum*, a soja; *R. meliloti*, a alfafa (*Medicago sativa*); *R. lupini*, *Lupinus spp.* e *R. trifolii*, o trevo (*Trifolium repens*) (Coutinho, 2003).

O conceito de planta hospedeira, porém, foi modificado após a observação de muitas reações cruzadas entre as plantas hospedeiras e as bactérias simbióticas, pois uma única

leguminosa, por exemplo, *Acácia*, *Glycine max* ou *Leucaena* poderia abrigar diferentes simbioses (Terefework et al., 2000). A *Acácia*, por exemplo, é nodulada por *Bradyrhizobium* spp. (Dupuy & Dreyfus, 1992), *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* (Lajudie et al., 1992) e *R. huakuii* (Martínez–Romero, 1994). Já o feijoeiro é nodulado por uma grande diversidade de rizóbios e, em adição a *R. tropici*, *R. etli*, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. giardinii* e *R. gallicum*, provavelmente há novas espécies ainda não descritas (Mostasso et al., 2002; Grange & Hungria, 2004).

Os estudos de taxonomia rizobiana foram impulsionados com o advento de metodologias avançadas, tais como a sistemática molecular e quimiotaixonômica, para a caracterização de microrganismos. Bactérias de crescimento rápido e lento foram, então, separadas em dois gêneros, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (Jordan, 1984) e, posteriormente, mais quatro novos gêneros foram incluídos: *Sinorhizobium* (Chen et al., 1998; Lajudie et al., 1994), *Azorhizobium* (Dreyfus et al., 1988), *Mesorhizobium* (Jordan, 1984; Jarvis et al., 1982; Nour et al., 1994; Lindström et al., 1995) e *Allorhizobium* (Lajudie et al., 1998). De acordo com Piñero et al. (1988) a grande diversidade e a ampla distribuição geográfica podem ser interpretadas como uma evidência de que *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e outros rizóbios, sejam estirpes antigas e com uma longa história evolutiva.

As análises da diversidade desses microrganismos têm revelado estreita relação filogenética entre bactérias que, aparentemente, não estariam relacionadas. Além disso, esses novos estudos estão permitindo uma melhor compreensão dos mecanismos que atuam na evolução das bactérias simbióticas. De acordo com essa ampla diversidade de estirpes, vários grupos de pesquisa têm se empenhado na descoberta e tentativa de classificar tais microrganismos (Martínez–Romero, 1994).

As bactérias que nodulam o feijoeiro foram classificadas inicialmente como *Rhizobium phaseoli*, porém, com uma melhor caracterização fisiológica, bioquímica e genética, essas bactérias foram reclassificadas, após 50 anos, na espécie *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (Jordan, 1984). Com o estudo de outros isolados e o avanço nas técnicas de biologia molecular, em um curto período de tempo foi constatado que as bactérias que nodulavam o feijoeiro apresentavam claramente características fisiológicas e genéticas distintas, permitindo a sua separação em dois grupos, denominadas Tipo I e Tipo II (Martínez et al., 1985; Quinto et al., 1985; Brom et al., 1988).

Essas e outras diferenças levaram, em 1991, à definição de uma nova espécie, *R. tropici* (tro' pi. ci. Gr. n. tropikos, trópicos), que incluiria as estirpes do Tipo II, que foi subdividido em IIA e IIB (Martinez-Romero et al., 1991). As bactérias dessa nova espécie foram descritas como aeróbias, Gram–negativas, com pH ótimo para crescimento variando entre 5 e 7, crescendo em temperatura de até 40°C. As estirpes estudadas foram isoladas de regiões tropicais, nodulam e fixam N₂ com *P. vulgaris*, *Leucaena esculenta* e *L. leucocephala*. A estirpe IIB CIAT 899 (= ATCC 49672, = UMR 1899, = SEMIA 4077) foi designada como estirpe padrão (“type strain”) e a estirpe representativa do grupo IIA é a CFN 299. A estirpe CIAT 899, assim como as outras do Tipo IIB, também é resistente a metais pesados e aos antibióticos clorofenicol, espectinomcina, 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; Mercante et al., 2002). Somente as estirpes do Tipo IIB crescem em meio LB (Martínez-Romero et al., 1991). Alguns estudos têm descrito diferenças entre os Tipos IIA e IIB, incluindo análise de PCR com seqüências repetitivas (van Berkum et al., 1996) e a presença de megaplasmídeos (Geniaux et al., 1995).

Após a definição da espécie *R. tropici* ficou decidido, pelo subcomitê internacional de taxonomia de *Agrobacterium* e *Rhizobium*, que a designação *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).

Quando as estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, isoladas no México, foram comparadas com os isolados da Europa, encontraram–se diferenças entre os dois grupos no perfil enzimático de eletroforese (Segovia et al., 1991), diversidade genética (Piñero et al., 1988), baixo nível de hibridização com estirpes-referência de *R. leguminosarum* bv. *viciae* e bv. *trifolii* (Segovia et al., 1991) e diferenças na seqüência de nucleotídeos de um fragmento do gene 16S rDNA (Eardly et al., 1992). Foi sugerido, então, que todos os isolados americanos obtidos de nódulos de feijoeiro passassem a ser denominados de *Rhizobium* sp. Tipo I (Eardly et al., 1992). A seguir, a análise de seqüências de nucleotídeos do gene 16S rDNA de isolados americanos levou Segovia et al. (1993) a sugerirem uma nova espécie para essas estirpes, *Rhizobium etli*, tendo pelo menos um biovar, *Rhizobium etli* bv. *phaseoli*.

Essa nova espécie de bactéria foi descrita como sendo aeróbia, Gram–negativa, com temperatura máxima de crescimento de 35°C. Essas bactérias não crescem em meio LB e

também não apresentam colônias em meio PY na presença de cálcio, carbenicilina, espectinomomicina, cloranfenicol ou rifampicina (Segovia et al., 1993). Crescem em meio mínimo contendo malato como fonte de C, mas não com arginina, hipoxantina ou sorbitol. Todas as estirpes são resistentes ao ácido nalidíxico e são distinguíveis das outras espécies em nível molecular pelos resultados de teste de hibridização do DNA total, perfis enzimáticos de eletroforese e seqüências de genes ribossomais. Segundo a descrição da espécie, as estirpes nodulam exclusivamente *Phaseolus vulgaris* L. A estirpe padrão é a CFN 42 (= USDA 9032) (Segovia et al., 1993).

Dados de levantamento de espécies de rizóbio nodulando o feijoeiro na Europa mostram uma ampla diversidade, incluindo a presença significativa de isolados de *R. etli*, *R. tropici* e mais recentemente, duas novas espécies, compreendendo principalmente estirpes isoladas de nódulos de feijoeiro na França (Laguerre et al., 1993; Amarger et al., 1994), *R. gallicum* e *R. giardinii* (Amarger, et al., 1997). Espécies de *R. gallicum* possuem genes *nifH* que compartilham o mesmo ancestral dos genes de *R. etli* bv. *phaseoli*. Esta espécie, apresenta um subgrupo de especificidade simbiótica com *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e *R. etli* bv. *phaseoli* e outro subgrupo com características fenotípicas e genotípicas próprias, podendo ser dividido em dois biovars: *R. gallicum* bv. *gallicum* e *R. gallicum* bv. *phaseoli*. Graham & Vance (2000) encontraram rizóbios isolados de *Dalea purpurea* e *Dalea candida*, em lavouras de leguminosas de Minnesota, nos Estados Unidos, apresentando perfis simbióticos e similaridade quanto a ácidos graxos metilados com cepas de *R. gallicum* procedentes da França.

Wang et al. (2000) encontraram grupos genômicos de rizóbio isolados em *Leucena leucocephala* no México, que se relacionaram estreitamente com *R. giardinii* através de padrões de amplificação de PCR dos genes de 16S rRNA. Esta espécie também foi dividida em dois biovars de acordo com sua afinidade simbiótica com os biovars de *R. leguminosarum* e *R. etli*, respectivamente conhecidos por *R. giardinii* bv. *giardinii* e *R. giardinii* bv. *phaseoli*.

Descobertas recentes (Estrada de los Santos et al, 2001) apontam bactérias do Gênero *Burkholderia* nodulando leguminosas. Essas bactérias pertencentes à classe das *Betaproteobacteria* foram, inicialmente, encontradas em associação com plantas de milho e café e, de acordo com perfis de restrição e seqüências do gene 16S rDNA, se apresentaram

estritamente relacionadas a espécies fixadoras nitrogênio. A capacidade de fixar N_2 foi descrita somente para duas espécies: *B. vietnamiensis* (Gillis et al., 1995) e *B. hururiensis* (Estrada de los Santos et al., 2001). Recentemente, Reis (2002) sugeriu *B. tropicalis* como sendo uma nova espécie simbiótica. Estes novos dados mostram que a capacidade de fixação do nitrogênio em simbiose com as leguminosas é muito mais difundida entre as bactérias que se supunha até o presente.

Com tantas diferenças já relatadas e com o constante avanço das técnicas de biologia molecular, será possível, em breve, identificar novas espécies. É fundamental, portanto, estar atualizado com as novas correntes taxonômicas e atentar para o fato de que, certamente, a cada ano, novos gêneros e espécies são descritos e/ou reclassificados, seguindo uma tendência lógica, desde que se calcula que somente 12% das espécies de bactérias são conhecidas. Atualmente, na definição de novas espécies, recomenda-se o uso da “taxonomia polifásica”, a qual procura integrar diferentes tipos de informações fenotípicas, genotípicas e filogenéticas dos microrganismos, buscando uma classificação de consenso (Lajudie et al., 1994; Vandamme et al., 1996).

4. A estrutura genética do rizóbio

As bactérias, de modo geral, apresentam genomas extremamente dinâmicos, de aquisição rápida, perda e rearranjo de informações genéticas pertinentes (Bendich & Drlica, 2000). O genoma dos rizóbios apresenta um cromossomo e pode conter um número variável de plasmídeos. Os genes estruturais da nitrogenase redutase *nifH* e os genes determinantes de várias etapas da nodulação, *nod*, *noe* e *nol*, estão contidos em um único plasmídeo simbiótico (*pSym*) (Hughes, 2000). Os demais plasmídeos são chamados de crípticos. Algumas funções já foram demonstradas para esses plasmídeos crípticos, como a capacidade de sobrevivência no solo (Amaral et al., 1995), a biossíntese de polissacarídeos da superfície celular, processos metabólicos e utilização de exsudatos da planta e compostos aromáticos, bem como a nodulação e capacidade competitiva (Brom et al., 2002). Já nas estirpes dos gêneros

Bradyrhizobium e *Azorhizobium*, as informações, de modo geral, estão encerradas somente no DNA cromossomal (Noti et al., 1985), embora algumas estirpes de *B. japonicum* provavelmente possam apresentar megaplasmídeos (Martínez–Romero, 1994).

As estirpes de *Rhizobium*, normalmente apresentam de um a seis plasmídeos, que podem representar até 25% do genoma total da bactéria (Brom et al., 2002). Eckhardt (1978) desenvolveu uma técnica para separação de plasmídeos por eletroforese em gel de agarose e esta vem sendo adaptada por diversos autores. A estirpe de *R. etli* CFN 42 contém seis plasmídeos (p42a – p42f) variando de 150 a 600 kb e é utilizada em muitos estudos, por exemplo, por Brom et al. (2002). O plasmídeo p42d (390 kb) corresponde ao plasmídeo *pSym*, o p42b contém seqüências requeridas para a biossíntese de lipossacarídeos e para o estabelecimento da simbiose; o p42a é um plasmídeo autotransferível, indispensável para a mobilização do plasmídeo *pSym* e o p42f, contém os genes *fixL* e *fixNOQP* (Brom et al., 2002).

O reconhecimento das características estruturais do genoma rizobiano foi facilitado pela observação de que ferramentas disponíveis aos estudos com *Escherichia coli* poderiam ser aplicadas ao rizóbio. Isso levou à identificação dos genes *nif*, bem como a sua localização aproximada no cromossomo (Hungria et al., 1997). Hoje, estão descritos diversos genes, que são classificados em três categorias: genes de nodulação (*nod*, *nol* e *noe*), responsáveis pelos passos iniciais da nodulação; genes *nif* (nitrogen fixation), ligados à síntese e regulação da nitrogenase, todos homólogos a genes encontrados em *Klebsiella pneumoniae* e os genes *fix*, com a mesma função dos *nif*, mas sem homologia com os genes de *K. pneumoniae* (Hungria, 1994a). Existem, ainda, outras categorias de genes, envolvidos com a superfície das bactérias e que afetam a nodulação, *exo* (exopolysaccharides), *lps* (lipopolysaccharides) e *ndv* (1,2- β -glucans, nodule development), além dos genes *hem* (heme), relacionados com síntese de hemoglobina, *dct* (dicarboxylic transport), *gln* (glutamine synthetase) e *hup* (hydrogenase uptake) (Hungria et al., 1997).

Uma característica importante do genoma de *Rhizobium* é a presença de elementos repetitivos e conservados difundidos no DNA (Hughes, 2000). Estas seqüências se encontram em locais característicos do genoma procariótico e, quando associadas à amplificação do DNA pela técnica de PCR, geram marcadores moleculares e genômicos altamente específicos, diferenciando espécies e até mesmo estirpes com ótima precisão (Rademaker et al., 1998). Os

genes que codificam para o rRNA (operons do rRNA – *rrn*) têm sido extensivamente estudados para muitas espécies bacterianas, sendo que o número de operons varia de um (em micoplasmas) a doze cópias (em bacilos) por cromossomo (Rosado et al., 1998). Em rizóbio, uma a três cópias têm sido detectadas: uma em *B. japonicum* e em *R. tropici*, três em *S. meliloti*, *R. galegae*, *R. leguminosarum* e *R. etli* (Haukka, 1997). Assim como outros genes que ocorrem em múltiplas cópias no genoma, os genes ribossomais estão sujeitos à um processo de homogeneização o que significa que todas as cópias tendem a ser similares umas às outras (Hughes, 2000). No entanto, estudos recentes têm detectado que pequenas variações podem existir entre as cópias destes genes, sendo relatadas a presença de variações alélicas, ou microheterogeneidade, entre os genes do rRNA 16S de várias espécies bacterianas, inclusive rizóbio (Haukka et al., 1996). Neste limite, a quantidade de seqüências úteis diminui, e a ocorrência de transferência horizontal e recombinação genética entre estas cópias heterogêneas interrompem o padrão filogenético (Haukka et al., 1996). Três famílias de seqüências repetitivas têm sido estudadas em maiores detalhes, correspondendo a 35–40 pb na seqüência REP; 124–127 pb para a ERIC e 154 pb no elemento BOX, o qual consiste de três subunidades (boxA, boxB e boxC).

Outra característica típica do genoma de rizóbio é a presença de seqüências reiteradas de DNA. Num mapa físico completo do *pSym* de *R. etli* CNF 42, com aproximadamente 390 kb, foram encontrados cerca de 700 elementos reiterados pertencentes a 200 famílias (Girard et al., 1991; Palacios et al., 1995). Essas cópias são normalmente necessárias para a expressão e efetividade do processo de FBN (Romero et al., 1988), mas também representam sítios de recombinação, onde ocorrem rearranjos genômicos.

Esses rearranjos significam a base da variabilidade e também, das perdas das propriedades simbióticas nessas estirpes (Martínez et al., 1990, Martínez–Romero, 1994), podendo ser a explicação para a ocorrência freqüente da perda da habilidade de nodular e fixar N_2 de diversas estirpes. Como consequência da recombinação, são detectadas amplificações, deleções e co-integrações de plasmídeos (Hungria et al., 1997). Duas grandes classes de mecanismos podem ser invocadas para explicar esta dinâmica genética do genoma rizobiano: as modificações internas na informação genética com transmissão vertical de genes que normalmente acontecem por acumulação de mutação (Whittam, 1996) e recombinação homóloga inter–genômica e; a aquisição ou perda de grupos específicos de genes de outras

espécies pelo processo de transferência horizontal ou lateral de gene (HGT, “horizontal gene transference” ou LGT, “lateral gene transference”) (Dutta & Pan, 2002).

4.1. A transferência horizontal (ou lateral) de gene (HGT ou LGT)

A transferência horizontal de genes parece ser um evento comum entre bactérias, provavelmente devido ao papel importante na organização da arquitetura de genomas microbianos, além de conferir novas capacidades metabólicas modernas ao genoma do receptor, permitindo a exploração de novos nichos ecológicos (Dutta & Pan, 2002). Nos procariontes, a transferência lateral de genes pode ser mediada por plasmídeos, fagos, elementos transponíveis e outros elementos acessórios do DNA (Hughes, 2000). Entretanto, a importância de tal transferência continua largamente inexplorada em ambientes nativos (Wernegreen & Riley, 1999).

Até recentemente, a maioria dos estudos em evolução microbiana focalizou, principalmente, a transmissão vertical de informação genética. Foi prestada pouca atenção à importância da HGT moldando genomas bacterianos. O recente avanço do número de genomas seqüenciados fornece uma oportunidade única para obter mais informações sobre esse processo (Snel & Huynen, 1999).

Mutações de ponto podem conduzir modificações “lentas”, mas continuamente existentes. Elas podem ser responsáveis pela diversificação e classificação de microorganismos em uma escala temporal evolutiva. Por outro lado, a HGT resulta em alterações abruptas na estrutura e organização de genomas, sendo capaz de gerar novas estirpes bacterianas devido ao número de “saltos genéticos” (Falkow, 1996). A transferência horizontal de gene tem a capacidade de introduzir, imediatamente após a integração, características fisiológicas completamente diferentes na bactéria receptora. Por exemplo, acredita-se que as estirpes resistentes a antibióticos das espécies *Mycobacterium tuberculosis* e *Streptococcus pneumoniae*, tenham emergido por eventos de macro evolução mediados por HGT (Achtman & Hakenbeck, 1992; Hacker et al., 1997). Além disso, existem evidências de que a HGT pode ocorrer mesmo em grupo filogeneticamente distantes, como de bactérias para

eucariontes (Doolittle, 1998), de eucariontes para bactérias, ou de bactérias para arqueobactérias (Nelson et al., 1999).

Apesar de existir a possibilidade de HGT entre procariontes e eucariontes, nem todos os genes são passíveis de serem transferidos. Para que uma HGT ocorra com sucesso, os genes adquiridos têm que persistir no cromossomo do organismo receptor e neste, promover algum benefício seletivo (Lawrence, 1999). Genes essenciais, presentes em todos os organismos, como aqueles codificando operons de *rRNA*, são menos prováveis de sofrerem transferência lateral.

De acordo com a hipótese de complexidade (Jain et al., 1999), genes que participam em transcrição, tradução e processos relacionados (informacional) raramente são transferidos porque eles estão, em geral, presentes em sistemas complexos, cujos produtos são menos prováveis de funcionar efetivamente em um citoplasma estranho. Genes operacionais (“constitutivos”) (Rivera et al., 1998), por outro lado, são tipicamente encontrados em grupo de poucos genes e, por isso, podem sofrer transferência horizontal mais frequentemente.

Os genes, cujos produtos catalisam passos em um único caminho e que provêm funções fracamente selecionadas, frequentemente tendem a se juntar em operons (até mesmo quando seus produtos não interagem fisicamente), provavelmente para facilitar a transferência horizontal de tais genes formando o novo genoma (Lawrence & Roth, 1996). Quando integrado ao genoma, um operon recém-adquirido pode promover uma nova função metabólica que permite ao seu receptor explorar efetivamente um novo nicho ecológico (Lawrence, 1997; Lawrence & Roth, 1998). A proximidade física dos genes em um operon, porém, não resulta em nenhum benefício seletivo ao organismo individual, mas aumenta a aptidão do próprio operon permitindo uma eficiente transferência horizontal de seus genes constituintes caso contrário, poderiam ocorrer sucessivas perdas através de movimento genético. Com base nisto, considera-se que a organização de operon seja uma propriedade “egoísta” dos genes constituintes (Lawrence, 1997). A transferência horizontal de genes de baixa seleção pode beneficiar de maneira considerável linhagens que não contêm qualquer ortologia funcional destes genes (Lawrence, 1999).

5. Processo de infecção e nodulação das raízes de feijoeiro

Bactérias denominadas, coletivamente, de rizóbios, possuem genes de nodulação que possibilitam a infecção dos pêlos radiculares de espécies de leguminosas que por sua vez, as abrigam em estruturas especiais chamadas nódulos. Esta associação planta – bactéria é tida como simbiótica, uma vez que o nitrogênio fixado pelos microrganismos é assimilado pelas plantas, enquanto estas fornecem esqueletos de C para o simbionte. Esta simbiose pode ser altamente específica, da parte de ambos os simbiontes (Straliotto & Teixeira, 2000).

A formação de nódulos é um processo complexo, que ocorre em várias etapas, envolvendo mudanças fisiológicas e morfológicas tanto na célula hospedeira, como na bactéria. As mudanças na bactéria visam, principalmente, o recebimento de fontes de C da planta hospedeira, para prover o ATP e o poder redutor necessários para o processo de FBN. As mudanças na planta hospedeira visam assimilar a amônia produzida pelas bactérias (Hungria et al., 1994). Para que ocorra o processo de nodulação, ambos, bactérias simbióticas e planta hospedeira, desenvolveram um complexo sistema de integração mantendo, assim, uma comunicação molecular. Esse sistema faz com que bactérias simbióticas vivendo saprofiticamente no solo, percebam sinais químicos sintetizados pela planta hospedeira. A planta hospedeira libera compostos que fazem com que as bactérias simbióticas sejam atraídas em direção às raízes, por quimiotactismo (Drozdowicz, 1991).

As bactérias aderem aos pêlos radiculares das plantas, em um processo relativamente estável e irreversível, que ocorre em duas etapas: inicialmente, as células isoladas aderem à superfície radicular, provavelmente a sítios específicos e, em seguida, outras bactérias aderem às que já estão presas aos pêlos radiculares (Hungria et al, 1997). Neste momento, alguns compostos, em geral, atuam como sinais moleculares e induzem a transcrição de genes de nodulação (*nod*, *noe*, *nol*) nas bactérias, conduzindo à síntese dos fatores Nod.

Os fatores Nod são lipo–quitinooligossacarídeos responsáveis, principalmente, pelo reconhecimento entre bactéria e planta hospedeira e pela indução de uma intensa divisão celular no córtex da raiz. As bactérias, então, são atraídas por quimiotactismo à rizosfera, onde vão se multiplicar, colonizando os tricomas (pêlos radiculares). Os tricomas enrolam-se, envolvendo grupos de bactérias que, em seguida, degradam uma porção da parede celular

levando à invaginação do plasmalema. A seguir, as bactérias invadem o tricoma, utilizando o canal formado pela invaginação do plasmalema, dando origem ao cordão de infecção (Morgante, 2003) (FIGURAS 2 e 3).

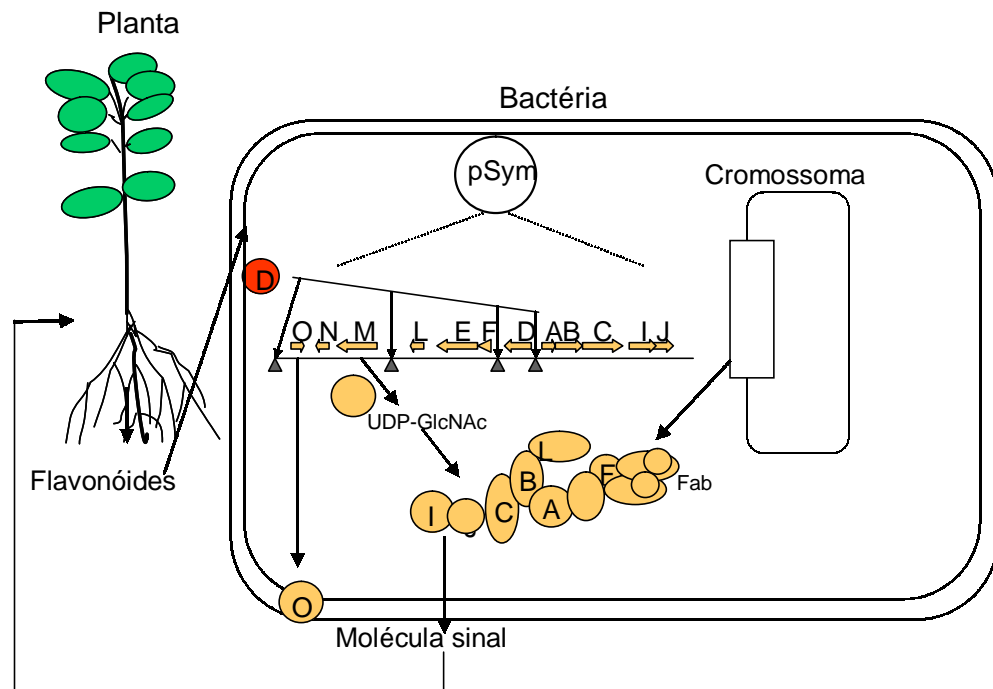


FIGURA 2. Sinais específicos entre o *R. tropici*, por exemplo, e sua leguminosa hospedeira. *pSym*, plasmídeo simbiótico, gene da nodulação; proteína Nod; **D** proteína reguladora NodD UDP-GlcNAc, precursor do esqueleto oligossacarídico da molécula sinal (Fonte: Manyani et al., 2001).

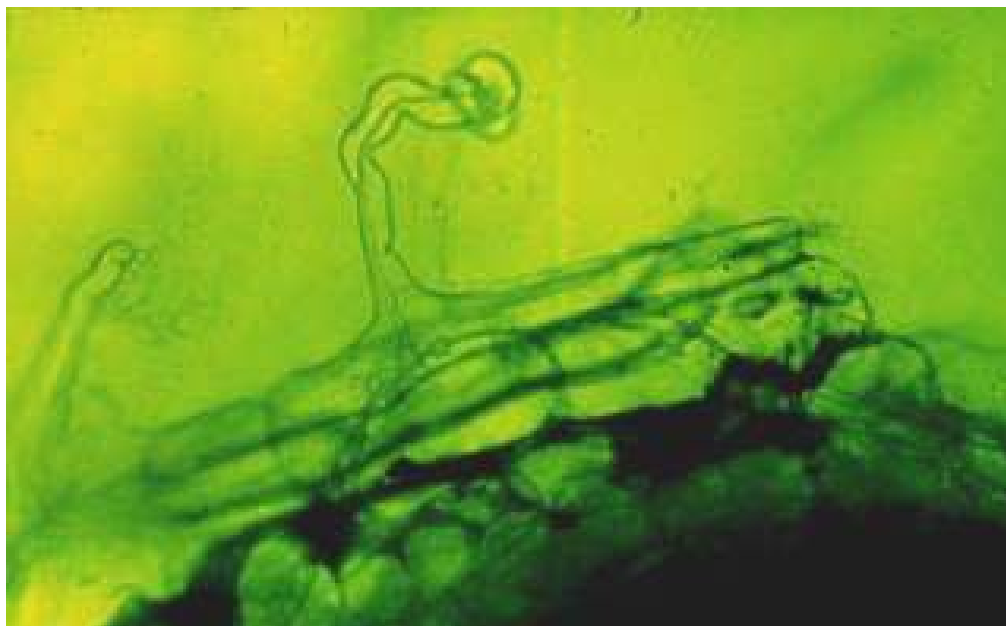


FIGURA 3. Pêlo radicular sendo infectado por *Rhizobium* (Foto cedida por Marisa F. Nicolas).

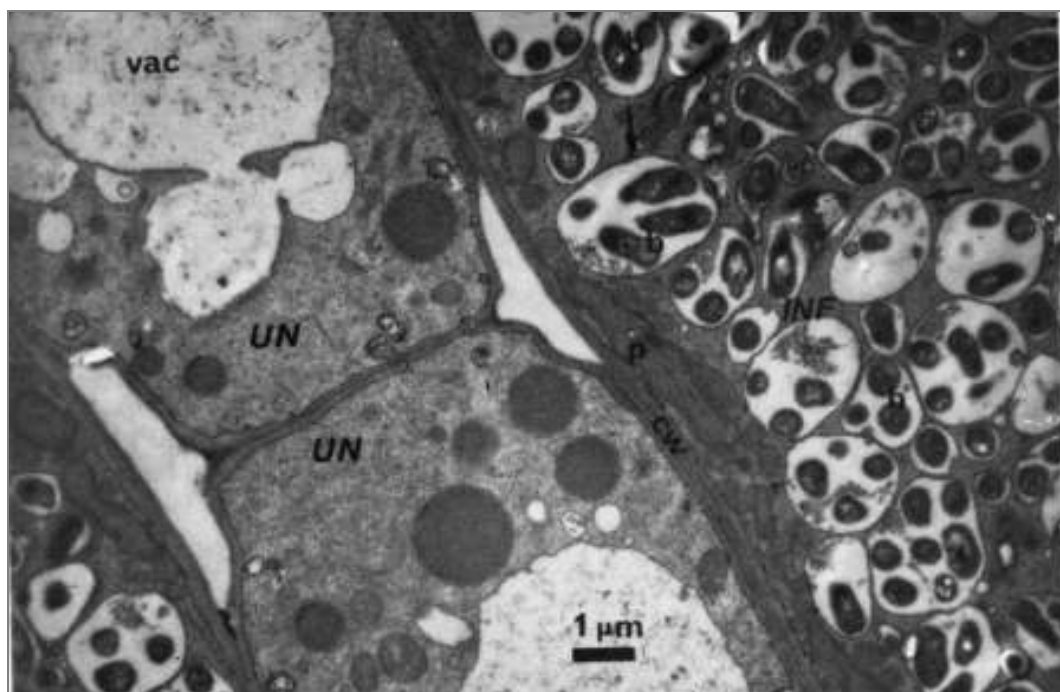


FIGURA 4. Formação dos bacteróides (Foto cedida por Marisa F. Nicolas).

O cordão de infecção alonga-se, então, em direção às células em divisão no córtex da raiz da planta, que recebem o nome de nódulo primário; nessa etapa, as bactérias presentes no interior do cordão de infecção continuam se multiplicando. Ao chegar às proximidades do nódulo primário, o cordão de infecção se ramifica para invadir as células vegetais. Pequenos grupos de bactérias contidas no interior de vesículas membranosas são liberados dentro do citoplasma das células vegetais do nódulo primário (FIGURA 4, 5, 6). A partir do estabelecimento do nódulo radicular, as bactérias que se encontram dentro das células radiculares hospedeiras param de se multiplicar, aumentam de tamanho e sofrem várias alterações bioquímicas para se transformarem em bactérias especializadas na FBN fixação do nitrogênio, os bacteróides (Morgante, 2003).



FIGURA 5. Nódulos de raiz infectados (Fonte: Hungria, 1994b).

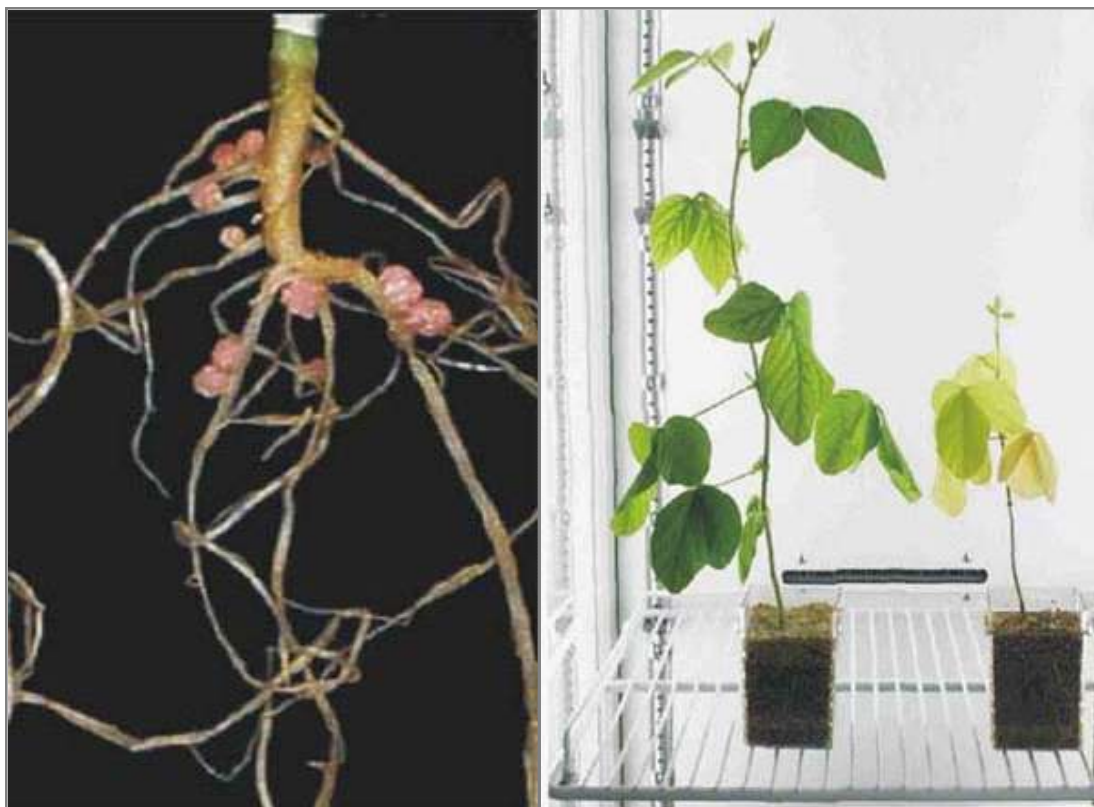


FIGURA 6. Simbiose estabelecida. À esquerda: nódulos de raíz; à direita: planta infectada e não infectada (Hungria, 1994b).

5.1. Atividades biológicas da molécula sinal

O fator de nodulação (Nod) representa a chave para os sinais moleculares envolvidos no início do desenvolvimento nodular e na invasão bacteriana (Broughton et al., 2000). Os diferentes fatores são produzidos por rizóbios incluindo *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*. Recentemente foi descoberto que as espécies de *Methylobacterium* sp. (Sy et al., 2001) e *Burkholderia* sp., pertencentes as subclasses α e β de *Proteobacterias*, também são capazes de realizar o processo de nodulação (Moulin et al., 2001).

Os fatores Nod consistem de um complexo oligomérico constituído por resíduos de β -1-4 ligados à N-acetil-D-glucosamina, N-acetilado no terminal não redutor (Kamst et al., 1998) e desta maneira, são lipochitoligossacarídeos (LCOs) (Dénarié et al., 1996). Os rizóbios

sintetizam os fatores Nod que consistem de 2 (no caso do *R. etli* CFN 42; Poupot et al., 1995) até aproximadamente 60 (no caso do *R. galegae* HAMBII207; Yang et al. 1999) diferentes tipos. Os aspectos qualitativos e quantitativos dos fatores Nod são estirpe-específico. A estrutura dos fatores Nod diferem no número de resíduos de GlcNAc presentes nos complexos chitoligossacarídeos, na natureza dos grupos acil-graxos, e, nos substitutos dos terminais redutor e não redutor (Haeze & Holsters, 2002). Em poucos casos os substitutos dos fatores Nod depende da expressão dos genes de nodulação (*nod*), compreendendo os genes *nod*, *nol* e *noe* (Haeze & Holsters, 2002). Recentemente foram descobertos em *Methylobacterium* sp. (Sy et al., 2001) e *Burkholderia* sp. (Moulin et al., 2001) genes ortólogos ao gene *nodA*, um dos genes fundamentais para a codificação da acil-transferase.

Os fatores Nod atuam em pequenas concentrações, de 10^{-12} a 10^{-9} M, sendo capazes de induzir respostas muito similares às produzidas pelas bactérias durante as primeiras etapas da simbiose (Espanhak & Lugtenberg, 1994). As respostas são:

- Deformação dos pêlos radiculares (Lerouge et al., 1990);
- Despolarização transitória da membrana dos pêlos radiculares (Felle et al., 1995);
- Formação dos primórdios nodulares (Espanhak & Lugtenberg, 1994);
- Formação de nódulos vazios, não fixadores de nitrogênio atmosférico, na raiz da planta hospedeira (Lerouge et al., 1990).

Apesar do fator Nod purificado não induzir à formação do “cajado de pastor” (deformação típica que acontece nos pêlos radiculares com o aparecimento dos sítios de infecção) (FIGURA 3) e nem à formação do cordão de infecção, certos efeitos indiretos podem implicar no processo de infecção (Nap & Bisseling, 1990). Experimentos demonstraram que a presença do fator Nod purificado em bactérias hospedeiras pode induzir à formação das nodulinas do cordão de infecção (Journet et al., 1994) bem como, pode induzir à produção e excreção de novos flavonóides nas raízes de plantas hospedeiras (Dakora et al., 1993).

A atividade biológica do fator Nod pode ser determinada por enzimas envolvidas no seu metabolismo, como são as quitinases e as hidrolases. Neste sentido, Staehelin et al. (1994) demonstraram na rizosfera de alfafa que os fatores Nod se desativam rapidamente na presença das quitinases da planta. Esta desativação está relacionada com as distintas modificações sofridas por cada fator Nod, tanto em seu extremo redutor, como em seu extremo não redutor.

5.2. Genes envolvidos na biossíntese da molécula sinal (fator Nod)

Os estudos dos sinais químicos entre as bactérias e as plantas hospedeiras demonstraram que a molécula bacteriana implicada nesta interação é um oligossacarídeo lipo–quitínico (LCO), chamado fator Nod ou molécula sinal, cuja síntese e exportação estão codificadas pelos genes de nodulação (FIGURA 7). A produção dos fatores Nod começa pela síntese do esqueleto básico, constituído por 3–5 N–acetilglucosamina e 1-4 β -glucosamina, codificadas pelos genes de nodulação denominados “genes comuns” (FIGURA 7.). Posteriormente, esta estrutura básica é modificada tanto em seu extremo redutor como em seu extremo não redutor, mediante a várias proteínas codificadas pelos genes de nodulação conhecidos como “genes específicos” (Manyani et al., 2001) (FIGURA 7.). Até o momento, já se encontram identificados mais de 50 genes envolvidos no processo de nodulação, estando a maioria deles localizados em plasmídeos simbióticos (pSym) os quais não são necessários para a viabilidade, no entanto em alguns rizóbios como *A. caulinodans*, *B. japonicum*, *S. fredii* e *M. loti*, estes genes se encontram no cromossoma (Downie, 1998).

Long et al. (1982) conseguiram isolar os genes *nod*, essenciais à nodulação, em *Rhizobium meliloti*. Nos relatos feitos até o momento, o número de genes *nod* descritos para cada espécie de *Rhizobium* é relativamente constante e pequeno, sendo determinados na sua maioria, por estudos que utilizam técnicas de seqüenciamento de DNA ou então, mutagênese via transposons (Hungria, 1994a).

Apesar de ainda existirem várias controvérsias, os genes de nodulação podem ser incluídos basicamente nas seguintes categorias: Os genes considerados “comuns” como os *nodA*, *nodB*, *nodC*, *nodM*, *nodN*, essenciais à síntese da estrutura básica da molécula sinal, apresentando grau elevado de homologia entre estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*; o gene regulatório *nodD*; os genes *nod* específicos do hospedeiro (*hsn*, host specific nodulation) que não apresentam homologia entre biovares e espécies de *Rhizobium/Bradyrhizobium*; e os genes *nod* GNS (Genotypic Specific Nodulation) relacionados com infecção específica de alguns genótipos de plantas por determinadas estirpes (Hungria, 1994a).

Os genes *nod* essenciais à nodulação, compartilham um grau elevado de homologia, podendo ser trocados entre espécies de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, sem que percam suas propriedades funcionais (Fisher et al., 1985), sendo por isso, chamados de genes *nod* “comuns” (Horvath et al., 1987). Os genes *nodA*, *nodB* e *nodC*, são considerados essenciais à nodulação, pois os mutantes em um desses três genes apresentam o fenótipo Nod⁻, isto é, não formam nódulos. A falta de nodulação, porém, pode ser corrigida pela introdução de genes correspondentes de outra espécie de rizóbio (Marvel et al., 1985). Diz-se que os genes *nodA*, *nodB* e *nodC* são induzíveis porque não são expressos constitutivamente, precisando de um indutor (Mulligan & Long, 1985). A transcrição desses genes é essencial aos estádios de pré-infecção, notadamente para a divisão celular do córtex e para a deformação dos pêlos radiculares (Dudley et al., 1987).

Em muitas espécies de rizóbio, como em *R. meliloti*, esses genes estão no mesmo operon, *nodABC* (Long, 1989). No cromossomo de *Bradyrhizobium* sp. (Parasponia) (Scott, 1986) e em *B. japonicum* (Banfalvi et al., 1988) novos genes foram detectados, *nodK* e *nodY*, que são co-regulados com *nodABC*, formando os operons *nodKABC* e *nodYABC*, respectivamente. Uma exceção ocorre com *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, em que o *nodA* está separado de *nodBC* por 20 kb (Vásquez et al., 1991).

Uma segunda categoria compreende genes *nod* tais como *nodIJ* e *nodFE*, que são induzíveis, apresentando sequências nucleotídeas altamente conservadas entre as espécies ou biovars, podendo ser trocados entre elas, mas cujos efeitos dependem da planta hospedeira (Hungria, 1994a). Alguns autores classificam esses genes na categoria (Schlaman et al., 1992) de genes comuns, outros como genes *hsn* (Phillips, 1992) e outros ainda consideram numa categoria separada (Long, 1992). A controvérsia surge justamente pelas respostas diferenciais em relação ao hospedeiro. Como exemplo, temos que os genes *nodIJ* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* não são essenciais à nodulação de ervilha (*Pisum*), mas sim de ervilhaca (*Vicia*) (Canter Cremers et al., 1990). Mutações nesses genes também não apresentaram nenhum efeito na simbiose de *B. japonicum* (Gottfert et al., 1990).

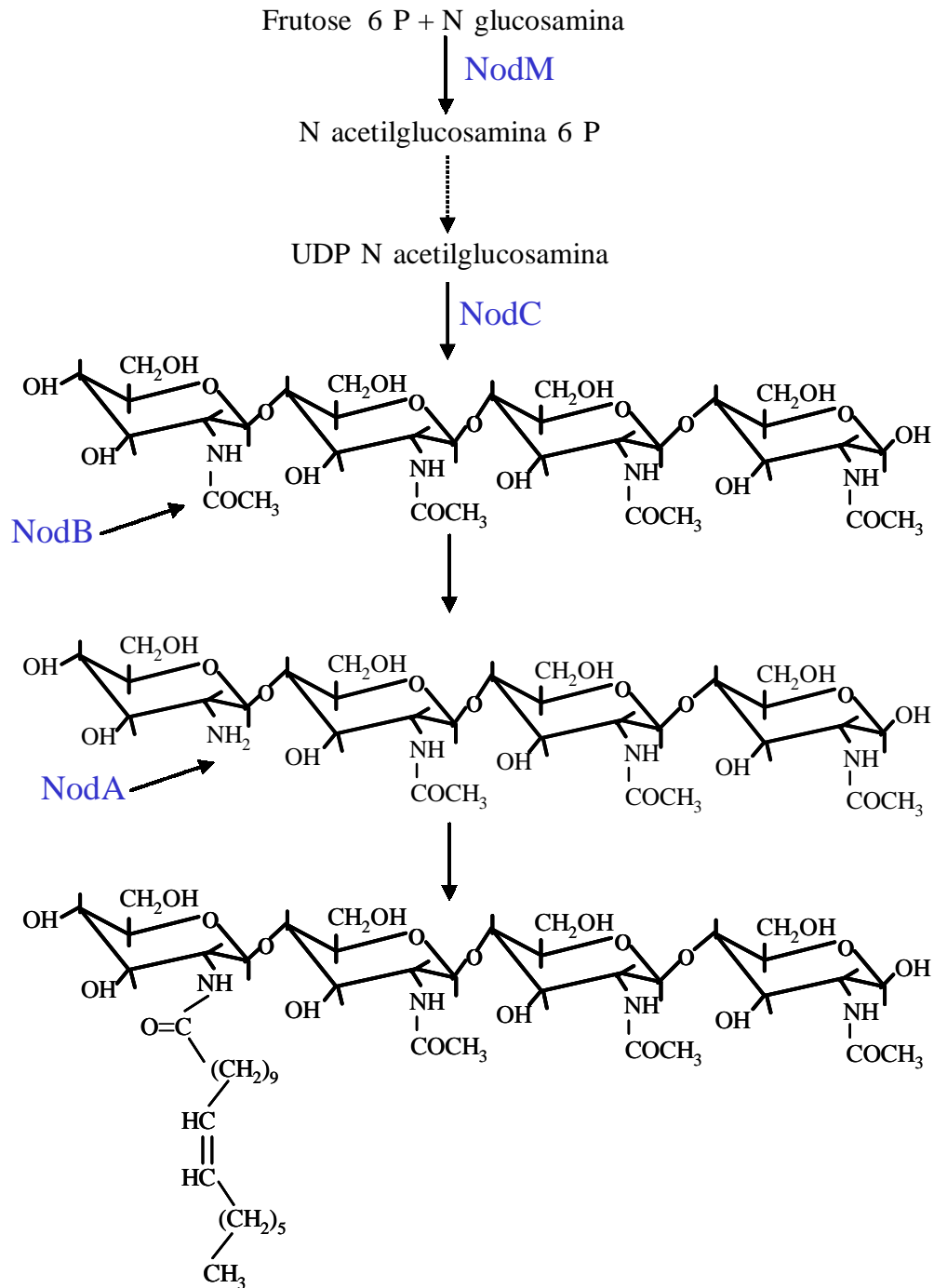


FIGURA. 7. Rota biossintética da estrutura básica de um fator de nodulação. (Fonte: Downie, 1998)

Estudos filogenéticos baseados na seqüência dos genes *nod* são, freqüentemente, não congruentes com estudos baseados em seqüências do gene ribossomal 16S, e em geral apresentam correlação com o tipo de planta hospedeira (Laguerre et al., 2001). A classificação baseada em genes conservados como o 16S rDNA pode, portanto, diferir substancialmente da classificação baseada nos genes *nod*, *nif* e *fix*. É possível afirmar que, os genes plasmidiais podem sofrer transferência horizontal entre espécies de rizóbio (Eardly et al., 1992). Por isso, é importante distinguir entre a história evolutiva dos plasmídeos e a história evolutiva do cromossomo.

Isso implica em um conhecimento mais abrangente da diversidade genética, que não pode estar baseado somente em uma única seqüência conhecida entre os rizóbios, pois outras regiões de grande importância em diversos processos bacterianos podem servir de ferramenta para classificar taxonomicamente uma estirpe, diferenciar o seu potencial hospedeiro e avaliar a sua capacidade simbiótica.

5.2.1. Os genes *nodM* e *nodN*

Os genes *nodMN* estão descritos na maioria dos rizóbios e são considerados genes “comuns”. O gene *nodM* codifica uma glucosamina-sintetase (Baev et al., 1991) e apresenta alta homologia com o gene *glmS* de *Escherichia coli*, com capacidade para codificar a proteína que catalisa a formação da 6-P-glucosamina a partir da 6-P-frutose e da glutamina. Estudos prévios realizados mediante hibridização em *R. leguminosarum* demonstraram a presença, no cromossomo, de um gene homólogo ao gene *nodM* capaz de substituir sua atividade. A mutação da cópia simbiótica do gene *nodM* afeta a eficiência do fator Nod mas não sua estrutura química, já que os monômeros da N-acetilglucosamina são sintetizados mediante a atividade da cópia cromossomal. Os mutantes dos genes *nodM* e *nodN* apresentam uma diminuição no número de pêlos radiculares formados e um atraso significativo na nodulação em *Medicago sativa* (Baev et al., 1991). Os bacteróides derivados da mutação no gene *nodM* apresentam um desenvolvimento incompleto e alterações fisiológicas, afetando a fixação do nitrogênio e o peso seco da planta (Manyani et al., 2001).

5.2.2. O gene *nodC*

As moléculas de N-acetilglucosamina sintetizadas pelas proteínas NodM ou por outras proteínas homólogas envolvidas no metabolismo natural das bactérias são polimerizadas em tri-, tetra- e pentassacarídeos mediante a atividade da N-acetilglucosamina transferase produzida pela proteína NodC (Barney & Downie, 1993) (FIGURA 7). A localização da atividade N-acetilglucosamina transferase na membrana citoplasmática combina com a localização subcelular desta proteína, já que se tem demonstrado que está associada a membrana interna (Johnson et al., 1989). A ausência de proteínas codificadas pelos genes *nod* evidencia a importância do gene *nodC* no controle do comprimento da cadeia do oligossacarídeo lipo-quitínico (LCO), fator determinante no reconhecimento entre bactérias e planta hospedeira. Kamst et al. (1997) também demonstraram que a concentração do precursor UDP-N-acetilglucosamina não influencia no comprimento da cadeia de LCO, exceto na presença de alta quantidade de proteína NodC. Apesar de ser considerado um gene “comum”, o gene *nodC* possui um papel importante na especificidade uma vez que, em estudos realizados com *S. meliloti*, participa da determinação do tipo de hospedeiro (Kamst et al., 1997). Essencial à nodulação e presente em todos os rizóbios investigados até o momento, este gene é responsável pela síntese da N-acetilglucosaminatransferase e está diretamente envolvido na determinação do hospedeiro específico.

5.2.3. O gene *nodB*

O gene *nodB* está presente em todos os rizóbios descritos até o momento, apresenta-se bastante conservado entre os mesmos e normalmente aparece junto da unidade transcricional *nodABC*. A proteína NodB tem a capacidade de desacetilar a N-acetilglucosamina no extremo não redutor da molécula sinal, usando como substratos quitotrioses e quitotetroses, mas nunca se utiliza dos monômeros de N-acetilglucosamina (John et al., 1993) (FIGURA 7). A proteína

NodB é similar a uma desacetilase do fungo *Mucor roxii* que requer a presença de tetrassacarídeos para sua atividade (Kafzopoulos et al., 1993) e também possui similaridade com outras desacetilases bacterianas, tais como LpxC e NagA de *Pseudomonas* e *E. coli*, respectivamente (Price et al., 1994).

5.2.4. O gene *nodA*

O *nodA* é um gene envolvido na transferência do grupo acil para o amino livre do extremo não redutor do fator Nod (Atkinson et al., 1994). A proteína NodA possui homologia com aciltransferases de outras espécies, tal como FirA de *E. coli* implicada na acilação da N-glucosamina do lipídio, mas reconhece somente tetrâmeros e pentâmeros e nunca dímeros e trímeros da N-acetilglucosamina (Debellé et al., 1996), o que indica uma estrutura e função diferenciada do resto das aciltransferases (Dicker & Seetharam, 1991). Sendo um gene “comum” e apresentando uma homologia altamente conservada entre os rizóbios, Debellé et al. (1996), demonstraram que sua função em *S. meliloti* e *R. tropici* não é equivalente. Em *S. meliloti*, este gene é necessário para a acilação do fator Nod com um ácido graxo insaturado C16:2 ou com uma série de ácidos graxos hidroxilados de C18 a C26. No entanto, quando este gene é substituído pelo gene *nodA* de *R. tropici*, o fator Nod desta estirpe, apresenta, além dos grupos acil, o ácido graxo cis-vacênico, sugerindo que a aciltransferase de cada estirpe apresenta diferentes afinidades pelos doadores dos grupos acil (Debellé et al., 1996). Por outro lado, se tem demonstrado que, apesar de ser classificado como um gene “comum”, o gene *nodA* possui um papel importante na especificidade do hospedeiro. Assim, o intercâmbio entre os genes produz trocas entre os tipos de hospedeiros e as estirpes envolvidas, impondo uma revisão de sua classificação como um gene “comum” (Ritsema et al., 1996). Assim como os genes *nodB* e *nodC*, a transcrição do gene *nodA* é essencial aos estágios de pré-infecção, notadamente para a divisão celular do córtex da planta e para a deformação dos pêlos radiculares (Kodorosi, 2000; Dudley et al., 1987).

5.2.5. A regulação dos genes *nod*

Os genes *nod* estão organizados em diferentes unidades transcricionais e são regulados pelo produto do gene *nodD* e pelas moléculas específicas produzidas pela planta (flavonóides e outros compostos derivados). A proteína NodD está localizada na membrana citoplasmática para facilitar sua união com os flavonóides e somente a forma solúvel da proteína NodD é capaz de unir-se aos promotores dos genes *nod*. A proteína NodD é uma ativadora transcricional dos genes *nod* com diferentes especificidades pelos flavonóides e outros compostos derivados, dependendo da espécie em estudo. O gene *nodD* está presente em todos os rizóbios estudados até hoje, podendo apresentar em uma cópia única, como é o caso dos *R. leguminosarum* bv. *viceae*, *R. leguminosarum* e *Azorhizobium caulinodans*, ou apresentando mais de uma cópia, como acontece em *S.meliloti*, *R. tropici* e *Rhizobium* sp. NGR234, entre outros (Honma et al., 1987).

6. Fixação biológica do nitrogênio

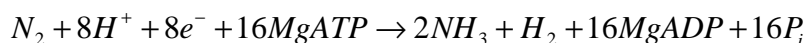
Denomina-se nitrogenase, ou dinitrogenase, o complexo enzimático, presente no rizóbio, responsável pela redução do N_2 a amônia, além de diversos outros compostos que apresentam ligações tríplexes terminais. Nitrogenases foram isoladas de diversos microrganismos e se mostram muito semelhantes estrutural e enzimaticamente. As nitrogenases melhor estudadas são aquelas isoladas de *Klebsiella pneumoniae*, uma bactéria anaeróbica facultativa heterotrófica, de *Clostridium pasateurianum*, um anaeróbio facultativo, e de *Azotobacter chroococcum*, um aeróbio obrigatório (Postgate, 1982).

Esse complexo enzimático também é 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 (Evans et al., 1987). Sabe-se, hoje, que

existem três tipos de dinitrogenase, denominadas de dinitrogenase–molibdênio, dinitrogenase–vanádio e dinitrogenase–ferro (Newton, 1993). Em *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, porém, até o momento só foi detectada a dinitrogenase–molibdênio (Hungria et al., 1994c).

O processo de redução do N_2 começa pela doação de elétrons pela ferredoxina ou flavodoxina, dependendo do microrganismo, para a redutase da dinitrogenase (proteína ferro), ou também chamada de componente I, que está associada com duas moléculas de MgATP. A proteína ferro é um dímero de subunidades idênticas (γ_2) (Eady, 1991) apresentando cada uma, um domínio tipo α hélice/folha β pregueada, (Georgiadis et al., 1992) que estão covalentemente ligados por um núcleo [4Fe–4S] simetricamente ligados a 2 cisteínas e, cada subunidade é codificada pelo gene *nifH*. Há evidências de mudança conformacional da proteína e também nas propriedades do núcleo [4Fe–4S] devido a ligação de MgATP, ocorrendo assim a transferência de elétrons da proteína–Fe para a dinitrogenase (proteína Mo–Fe) propriamente dita ou componente II, isso se dá com a transferência dos elétrons e a hidrólise concomitante do ATP a ADP. (Mensink & Haaker, 1992).

A proteína Mo–Fe é um tetrâmero $\alpha_2 \beta_2$ que possui aproximadamente 2 átomos de molibdênio, 30 de ferro e 30 de enxofre por tetrâmero (Eady, 1991). A subunidade α é codificada pelo gene *nifD* e a β pelo gene *nifK* (Roberts et al., 1978). O fluxo de elétrons é passado da proteína–Fe para o núcleo P da proteína–Mo–Fe por um processo dependente de ATP.Mg. A seguir, o núcleo P imediatamente transfere intramolecularmente os e elétrons para o FeMoco que é o sítio responsável pela ligação e redução do substrato (N_2) (Smith, 1990). Os elétrons são transferidos um a um e, como todo o processo requer oito elétrons para que ocorra a redução do N_2 a NH_3 , acredita-se que formem vários componentes intermediários durante a reação (Hungria et al., 1994c). Esse mecanismo catalisa a seguinte reação (Postgate, 1982):



Algumas bactérias possuem uma segunda enzima, a hidrogenase, capaz de oxidar parcial ou totalmente o H_2 evoluído, recuperando parte da energia perdida (Evans et al., 1987). A produção de H_2 , pela dinitrogenase, indica um uso ineficiente de energia que, de outro

modo, ficaria alocada ao processo de fixação do N_2 . Como parte dessa energia pode ser recuperada pela ação da hidrogenase, gerando ATP, considera-se que os sistemas que possuem essa enzima são mais eficientes (Hungria et al., 1994c).

O primeiro produto da fixação do N_2 é a amônia, que é transferida do bacteróide pela membrana peribacteroidal para o citossol da planta hospedeira. As reações de assimilação são então mediadas pela glutamina sintetase (GS) e glutamato sintetase (GOGAT). O desenvolvimento dessas enzimas ocorre, principalmente, durante o estabelecimento da nodulação (Hungria et al., 1994c), com mais de 95% da atividade localizada no citossol dos nódulos (Miflin & Cullimore, 1984). Posteriormente, a amônia é transportada para os demais órgãos da planta através do xilema, principalmente, na forma de amidas, aminoácidos ou ureídeos, dependendo do tipo de nódulo (Hungria et al., 1994c).

6.1. Genes implicados na síntese e regulação da nitrogenase

Os estudos genéticos da fixação do nitrogênio têm avançado rapidamente graças a dois fatos fundamentais: a possibilidade de detectar a fixação com a técnica de redução do acetileno a etileno e ao rico agrupamento dos genes diretamente implicados na fixação de nitrogênio (genes *nif*, homólogos a genes encontrados em *Klebsiella pneumoniae* e os genes *fix*, com a mesma função dos *nif*, mas sem homologia com genes de outras espécies). Em distintos organismos fixadores, são encontrados genes homólogos aos genes *nif*, provavelmente devido a presença comum a todos os microsimbiontes da enzima dinitrogenase, do cofator FeMo–proteína e de transportadores de elétrons (Toro & Oliveria., 1986).

As primeiras investigações realizadas sobre o número de genes, sua regulação e os produtos codificados foram realizados em *Klebsiella pneumoniae*. Esta foi uma escolha afortunada uma vez que neste microrganismo, os genes *nif* se encontram em uma única região de cerca de 25 kb no cromossoma, o que facilitou de sobremaneira seu isolamento e caracterização (Merrick, 1988) porém, a utilização da planta hospedeira adequada e a complexidade do sistema ainda impedem que os estudos avancem com maior velocidade.

Apesar disso, muitos conhecimentos já foram adquiridos nos casos de simbioses de *Rhizobium*–leguminosas e novas descobertas já tem sido reportadas em outras associações, como, por exemplo, em micorrizas (Toro & Oliveira, 1986).

Na enterobactéria anaeróbica facultativa *Klebsiella pneumoniae*, foram descobertos 20 genes envolvidos no processo de fixação de nitrogênio dispostos em oito operons contíguos. Esses genes se agrupam em uma região do cromossomo e estão envolvidos no processo de redução do N_2 pela enzima nitrogenase-molibdênio (Stricker et al., 1997). A enzima molibdênio–nitrogenase de *K. pneumoniae*, por exemplo, é composta por uma Fe–proteína, um dímero de subunidades idênticas (NifH) constituindo um único grupo (4Fe–4S), e por uma Mo–Fe-proteína, um heterotetrâmero de duas subunidades NifD e de duas subunidades NifK incluindo dois co–fatores ferro-molibdênio (FeMo–co) e mais dois grupos fosfóricos (Stricker et al., 1997). Para a reação de biossíntese da FeMo–co, é necessário a participação dos produtos dos genes *nifH*, *nifQ*, *nifB*, *nifV*, *nifE* e *nifN*. Em 1989, por exemplo, Hoover e colaboradores, demonstraram que o homocitrato é parte integral da molécula de FeMo–co sendo codificado pelo gene *nifV* através da enzima homocitrato sintetase. Outro gene de grande importância para o processo de redução da nitrogenase é o *nifA*. Encontrado na maioria das espécies de proteobactérias diazotróficas, o gene *nifA* codifica um ativador transcricional que auxilia na expressão de outros tipos de genes *nif* responsáveis por uma série de reações que participam do processo de fixação do N_2 (Teixeira et al., 1999).

A regulação dos genes *nif* pode ocorrer em dois níveis: um mais geral, envolvendo o sistema *ntr* e outro interno, próprio dos genes *nif* e inter-relacionado com o anterior (Merrick, 1988). O sistema *ntr* é responsável pelo controle do metabolismo geral de nitrogênio em enterobactérias. Este sistema regula a utilização de fontes alternativas de nitrogênio como os sistemas de utilização de nitrato e de alguns aminoácidos, por exemplo, arginina, prolina e histidina, bem como do N_2 através da fixação de nitrogênio (Drummond et al., 1983). A regulação da expressão dos genes *nif* envolve os produtos dos genes *nifA* e *nifL*, que por sua vez também têm sua expressão regulada pelo sistema *ntr*, que envolve os produtos dos genes *ntrC* e *ntrB* em uma cascata regulatória complexa (Merrick, 1988).

Todos os sistemas envolvidos no processo de fixação estão regulados para deter a fixação ou inibir a expressão dos genes *nif*, de acordo com a presença ou ausência da quantidade adequada de oxigênio, uma vez que o complexo dinitrogenase é muito sensível ao

O₂, podendo ser irreversivelmente inativado pela exposição aos níveis atmosféricos desse gás (Merrick, 1988).

6.1.1. O gene *nifH*

Além dos genes envolvidos no processo de nodulação, genes estruturais que participam diretamente do mecanismo de fixação podem ser utilizados para estudar as relações entre espécies de rizóbio. O *nifH* tem sido um dos genes mais avaliados entre os *Rhizobium*, apresentando diversas espécies com suas seqüências já catalogadas em bases de dados para possíveis comparações (Haukka et al., 1998).

Juntamente com os genes *nifD* e *nifK*, o *nifH* participa como gene estrutural da enzima nitrogenase, uma vez que codifica para as duas subunidades que compõem a Fe–proteína (requerida para a biossíntese do FeMo–cofator) constituindo, assim, um único grupo (4Fe–4S); participa da ligação entre duas moléculas de MgATP e da redução da FeMo–proteína com a presença de um único elétron (Dean & Jacobson, 1992).

A biossíntese do cofator FeMo (FeMoco) envolve os produtos dos genes *nifQ*, *nifB*, *nifE*, *nifN*, *nifV* e também do *nifH* (Merrick, 1988). As proteínas NifN e NifE apresentam homologia estrutural com as subunidades α e β da proteína–MoFe e parecem formar um complexo protéico onde o cofator seria sintetizado (Aguilar et al., 1990). O produto do *nifH*, por outro lado, parece estar envolvido na transferência de elétrons para o complexo NifEN para reações de reduções essenciais à biossíntese de FeMoco (Robinson et al., 1987).

Em *Rhizobium*, assim como todos genes estruturais da nitrogenase, o gene *nifH* está presente em um único plasmídio, chamado de plasmídio simbiótico (*pSym*), porém é transcrito em um operon separado dos genes *nifDK* (Becking, 1992). Conhecido como uma região conservada na maioria dos organismos fixadores de nitrogênio e apresentando homologia com genes encontrados em *Klebsiella pneumoniae*, o gene *nifH* é bastante utilizado em estudos filogenéticos, já que tem sido largamente seqüenciado na maioria das espécies de rizóbios para posterior comparação (Laguerre et al., 2001).

Este gene codifica a síntese da enzima dinitrogenase redutase e tem apresentado, recentemente, uma relação não consistente entre os estudos de filogenia de suas seqüências quando comparado com a filogenia do gene ribossomal 16S, mas tem sido largamente similar ao gene *nodA* (Haukka et al., 1998).

7. Métodos empregados em estudos de diversidade de bactérias da família *Rhizobiaceae*

Os microrganismos representam uma fonte de recursos naturais de fácil manipulação em laboratório e podem ser, igualmente, estudados em seus ambientes naturais, além de serem parte importante do ecossistema, pois representam um papel crucial na transformação de energia e em processos biogeoquímicos. Com isso, estudos que permitam o isolamento, a identificação e a quantificação desses organismos nos vários hábitats são de grande valor (Fungaro & Vieira, 1998).

A identificação rápida e confiável de estirpes continua sendo o objetivo mais importante nos estudos taxonômicos. As análises genotípicas compreendem todas as metodologias direcionadas ao estudo das moléculas de DNA ou RNA. Através da aplicação de tecnologias baseadas em PCR, sequenciamento automatizado, eletroforese de campo pulsado (“pulse-field”) e RFLP (“Restriction Fragment Length Polimorphism”), é possível gerar dados de alta qualidade que podem ser usados para melhorar os sistemas existentes de identificação e classificação microbiana; permitir a rápida detecção, circunscrição e identificação de organismos novos; determinar condições ecológicas para o isolamento seletivo; determinar a extensão da diversidade procariótica, inclusive determinando a distribuição geográfica de microrganismos de importância industrial e/ou agrônômica (Straliotto & Rumjanek, 1999).

Este extenso campo de ação só pode ser mais bem compreendido no contexto da nova sistemática microbiana, surgida a partir da introdução e aplicação de novos conceitos taxonômicos e técnicas surgidas a partir do final dos anos 50 e início dos anos 60 (Bull et al.,

1992). O desenvolvimento mais significativo iniciou-se com a aplicação dos métodos de taxonomia numérica, molecular e química, e especialmente nos últimos 10 anos, com o rápido desenvolvimento no campo do sequenciamento dos genes que codificam para o DNA ribossomal e sua contribuição para a filogenia bacteriana e taxonomia de todos os organismos vivos, como também das técnicas de polimorfismo molecular. Com o advento das técnicas de biologia molecular dentro da taxonomia bacteriana, foi possível determinar objetivamente as relações inter e intra-específicas (Straliotto & Rumjanek, 1999).

Em termos ecológicos, a análise de dados fenotípicos tem aplicabilidade restrita devido ao grande número de interações que ocorrem no sistema solo, tanto biótica como abióticas, especialmente quando se considera os microagregados do solo onde se alojam as populações bacterianas e a influência do ambiente rizosférico. Mas atualmente, apesar da avalanche de dados genotípicos na literatura, a correlação destes com as características fenotípicas é uma das condições para a descrição de novos gêneros e espécies bacterianas. Além disso, estas análises de agrupamento facilitam o estudo comparativo do comportamento dos diferentes grupos, tanto intraespecíficos como interespecíficos, quanto à diferentes características a nível de campo (Straliotto & Rumjanek, 1999).

Neste contexto, os métodos utilizados para a identificação de bactérias, têm sido os que utilizam anticorpos policlonais e, mais recentemente, os monoclonais e ambos podem ser adaptados ao método ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Hungria et al., 1997). Há relatos, também, sobre análises com polimorfismo de isoenzimas (Eardly et al., 1990) e perfil de plasmídeos (Chan et al., 1988). Os padrões eletromórficos produzidos para um certo número de enzimas são identificados como fenótipos multilocus ou tipos eletroforéticos (Electrophoretic Types – ET's), os quais refletem o genótipo cromossomal. A difusão do uso desta metodologia deu-se através do desenvolvimento de metodologias eficientes para a visualização do produto enzimático, e da aplicabilidade imediata encontrada em diversas áreas da biologia (Ferreira & Grattapaglia, 1998). O estudo dos padrões de isoenzimas obtidos por eletroforese (MLEE – multilocus enzyme electrophoresis) tem sido amplamente aplicado nos estudos de diversidade genotípica cromossomal e da estrutura genética de populações bacterianas do solo, inclusive dentro do gênero *Rhizobium* (Piñero et al., 1988; Young, 1985; Eardly et al., 1990; Demezas et al., 1995; Souza et al., 1994; Barrera et al., 1997). Embora as técnicas baseadas nas metodologias de amplificação de DNA por PCR tenham obtido grande

popularidade nos últimos anos, a maioria dos dados de diversidade e estrutura genética das populações bacterianas disponíveis são baseados em isoenzimas (Straliotto & Rumjanek, 1999).

Desde a década de 80 vem se utilizando com freqüência os perfis eletroforéticos de lipopolissacarídeos (LPS) em estudos de diversidade e identificação de populações bacterianas (De Maagd et al., 1988; De Weger et al., 1987). É dito que os perfis de LPS são característicos de cada bactéria unindo-se assim, a rapidez, sensibilidade, alta reprodutibilidade e baixo custo, esta técnica tornou-se uma ferramenta útil para o emprego em estudos de diversos microrganismos (Hitchcock & Brown, 1983; Lindström & Zahran, 1993; Siverio et al., 1993)

Outro processo de caracterização que tem fornecido valiosas informações nos estudos de identificação de microrganismos é o perfil eletroforético de proteínas. A eletroforese em gel de poliacrilamida de proteínas totais (PAGE) produz padrões de bandas que podem ser considerados impressões altamente específicas. Esse método diferencia, taxonomicamente, níveis de espécies e subespécies (Yamaoka-Yano & Valarini, 1998).

Os métodos genotípicos partiram de procedimentos mais simples até chegarem às técnicas mais sofisticadas. Metodologias básicas como a técnica de hibridização do DNA de colônias com sondas ligadas a genes cromossomais ou simbióticos (Mercante et al., 1998) por exemplo, são bastante úteis no levantamento da biodiversidade do rizóbio presente em determinado ecossistema, embora de limitado valor taxonômico. As técnicas de hibridização de ácidos nucléicos e de seqüenciamento tem tido muita ênfase na sistemática bacteriana por revelarem relações naturais entre os diferentes níveis na hierarquia taxonômica (Bull et al., 1992).

O estudo da composição de bases do DNA ainda é uma ferramenta útil e um modo rotineiro de distinguir entre estirpes fenotipicamente semelhantes mas geneticamente não relacionadas (Bull et al., 1992). Conforme já discutido, a composição de bases do DNA é parte dos padrões mínimos para a definição de gêneros e espécies. É geralmente aceito que microrganismos mostrando diferenças em mais de 5% de guanina (G) mais citosina (C) não devem ser considerados da mesma espécie, e aqueles com mais de 10% de diferença no padrão G+C não devem ser classificados dentro do mesmo gênero (Bull et al., 1992). Outros autores consideram que as espécies já seriam distintas a partir de uma diferença de 3% em suas porcentagens de G+C (Stackebrandt & Liesack, 1993, citados por Vandamme et al., 1996).

Esta percentagem no conteúdo de GC varia entre 24 e 76% dentro das espécies bacterianas estudadas até o presente (Vandamme et al., 1996).

O uso da homologia de DNA como critério principal na definição de espécies, baseia-se no resultado de numerosos estudos onde um alto grau de correlação foi encontrado entre a similaridade do DNA e similaridade baseada em dados quimiotaxonômicos, genômicos, sorológicos e de análise fenética numérica (Stackebrandt & Goebel, 1994). Esta metodologia está baseada na descoberta inicial de que o DNA de fita simples de duas estirpes diferentes pode se reassociar até um determinado ponto mensurável e formar um DNA híbrido, por exemplo, quando as fitas apresentarem menos de 15% de bases não pareadas (Ullman & McCarthy, 1973). Quanto mais semelhantes forem as espécies a analisadas, menor será o tempo de reassociação, portanto, medidas de 70% ou mais de similaridade se correlacionam com pequenas diferenças na estabilidade dos duplexes formados durante a reassociação (Johnson, 1985).

Em rizóbio ocorrem problemas de concordância dos dados de homologia de DNA com os de seqüenciamento do 16S rRNA, havendo casos de muito baixa homologia de DNA dentro da mesma espécie. A explicação dada pelos autores é de que a hibridização do DNA envolve também o DNA presente em plasmídeos, que, no caso de algumas espécies de rizóbio, pode representar até 45% do genoma. Uma vez que este DNA extracromossomal provavelmente sofre mudanças muito mais rápidas do que o restante do genoma, este pode estar contribuindo para esta alta variabilidade, não congruente com os demais resultados de similaridade baseados em outros critérios (Martínez-Romero, 1994).

Uma das técnicas mais utilizadas na detecção e identificação de microrganismos em ambientes naturais e que ganhou grande impulso nos últimos anos é a PCR (Polymerase Chain Reaction). Esta técnica, que foi descrita por Saiki et al. (1985), permite amplificar segmentos pequenos e específicos do DNA. É uma técnica pela qual se obtêm, “in vitro”, várias cópias de um segmento de DNA, previamente conhecido. Para se fazer a amplificação de uma certa seqüência de DNA, é necessário que se faça, em primeiro lugar, a extração do DNA, depois sua amplificação (PCR) com algum “primer” (oligonucleotídeo) em um termociclador (Fungaro & Vieira, 1998).

A interpretação dos géis de eletroforese de PCR depende dos propósitos pelos quais se utiliza a técnica, por exemplo, em genética, a PCR pode ser utilizada para identificar e

quantificar a variabilidade genética. Esta técnica oferece vantagens por ser rápida e versátil, possibilitando que um grande número de isolados possa ser caracterizado em pouco tempo (Yamaoka–Yano & Valarini, 1998; Fungaro & Vieira, 1998).

A caracterização da seqüência do gene ribossomal rRNA 16S tem sido amplamente utilizada em estudos evolucionários, taxonômicos e ecológicos, não apenas para definir taxas mas também para detectar quais taxas estão presentes (Fox et al., 1992; Olsen et al., 1994). A amplificação direta via PCR do 16S rRNA a partir de amostras de solo tornou possível o estudo da diversidade microbiana sem a necessidade de cultivar o microrganismo (Ward et al., 1990). Comparações entre as seqüências de nucleotídeos completas ou parciais do 16S rRNA tem sido amplamente utilizadas para avaliar relações filogenéticas entre muitas espécies de *Rhizobium* (Laguerre et al. 1993; van Berkum et al., 1996; Barrera et al., 1997).

Em estudos de diversidade de microorganismos a técnica de PCR é utilizada em várias metodologias como a análise de restrição do DNA ribossômico amplificado (ARDRA – Amplified Ribossomal DNA Restriction Analysis), polimorfismo dos espaçadores (IGS – intergene sequences) do DNA ribossômico, DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis), PCR–SSCP (Single–Strand–Conformation Polymorphism), PCR de seqüências repetitivas de DNA (rep–PCR usando primers REP, ERIC ou BOX), PCR com primers randômicos (RAPD, AP–PCR) e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) (Straliotto & Rumjanek, 1999).

Desde o início deste século, os geneticistas têm utilizado recursos poderosos em estudos de biologia de populações e ecologia do comportamento, em especial os marcadores genéticos, para conhecer a estrutura dessas populações. O RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) é um dos marcadores moleculares derivados da técnica de PCR, que gera fragmentos únicos de DNA com um único oligonucleotídeo de seqüência arbitrária (Williams et al., 1990). Esta técnica é uma das mais populares variações da PCR, pois apresenta vantagens em relação aos outros métodos, porque requer pequena quantidade de DNA, não necessitando ter informações sobre a seqüência de nucleotídeos do genoma. Além disso, é capaz de revelar alto grau de marcas polimórficas e é um método rápido, além de processar grande número de microrganismos ao mesmo tempo (Yamaoka–Yano & Valarini, 1998). O RAPD tem sido utilizado para caracterização de isolados de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*,

tanto com culturas puras, quanto com nódulos (de Bruijn, 1992; Harrison et al., 1992; Judd et al., 1993; Loureiro, 1994; Versalovic et al., 1994; Sadowsky & Moawad, 1995).

Os métodos de REP-PCR (repetitive extragenic palindromic sequences – PCR), ERIC-PCR (enterobacterial repetitive intergenic consensus – PCR) e BOX-PCR baseiam-se na amplificação de seqüências repetitivas (rep-elements) no genoma bacteriano (Versalovic et al., 1994). Quando um destes elementos repetitivos é detectado dentro de uma distância amplificável durante a reação de polimerase em cadeia, um produto de PCR de tamanho característico é gerado, de modo que o genoma possa gerar padrão de polimorfismo em um gel. O método é uma poderosa ferramenta para estudar a diversidade genética intraespecífica e em nível de estirpe, fornecendo uma análise complementar à caracterização prévia por outras metodologias. A análise da impressão digital gerada a partir de genomas distintos tem sido usada para separação de estirpes muito proximamente relacionadas de *B. japonicum* (Judd et al., 1993; Vinuesa et al., 1998), *R. tropici* (van Berkum et al., 1994), *R. leguminosarum* bv, *trifolii* (Leung & Bottomley, 1994), *R. galegae* (Selenska-Pobell et al., 1995) e *R. meliloti* (de Bruijn, 1992; Rossbach et al., 1995).

As análises combinadas de seqüências de DNA ribossomal amplificadas por PCR e digeridas com enzimas de restrição de corte freqüente (sítios de 4 pb) gerando padrões de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), tem sido extensivamente utilizada nos estudos de diversidade de rizóbio, metodologia que passou a ser denominada ARDRA (análise de restrição do DNA ribossomal amplificado). Esta técnica foi inicialmente utilizada por Laguerre et al. (1994) sendo que a topologia das árvores filogenéticas obtidas por mapeamento dos sítios de restrição e por alinhamento de seqüências apresentou-se muito bem relacionada, mostrando que o método é uma ferramenta poderosa para a estimativa rápida de relações filogenéticas (Lindström et al., 1998). Esta metodologia foi aprimorada através da construção de uma base de dados de sítios de restrição nos genes que codificam para o gene ribossomal 16S na família *Rhizobiaceae* (Laguerre et al., 1997). Em rizóbio, sondas baseadas em diferentes genes, tanto ligadas a características simbióticas (*nod*, *fix*) ou não simbióticas (operons do DNA ribossomal e outras), tem sido utilizadas para detectar polimorfismos, utilizando diferentes metodologias de marcação e detecção. Estas metodologias combinadas tem sido utilizadas para a caracterização da diversidade entre diferentes populações de rizóbio (Laguerre et al., 1992; Thomas et al., 1994; Paffetti et al., 1996).

O valor do método de RFLP, está na sua rapidez e habilidade para avaliar diferenças entre grupos filogenéticos, possibilitando análises em vários níveis taxonômicos, inclusive em estudos de evolução, gerando novos marcadores para estudos de genética de populações (Jorgensen & Cluster, 1989). Esta técnica utiliza enzimas de restrição para fragmentar o DNA em diferentes comprimentos, evidenciando o polimorfismo no comprimento dos fragmentos obtidos. Para a identificação desse polimorfismo, é necessário que as seqüências de nucleotídeos, nas fitas de DNA dos organismos, sejam distintas (Yamaoka–Yano & Valarini, 1998). Apesar de ser eficiente na identificação de microrganismos, esta técnica possui custo elevado para ser utilizada rotineiramente, por isso, outras técnicas são utilizadas para auxiliar na formação de um agrupamento inicial, de onde serão então escolhidas estirpes representativas para serem submetidas a uma análise por ARDRA. A técnica pode ser também utilizada para evidenciar polimorfismos resultantes do corte do DNA genômico com enzimas de restrição de corte raro (6 a 8 pb) gerando fragmentos de DNA grandes, cuja separação em gel só é possível pelo uso da técnica de eletroforese em campo pulsado (“pulsed–field gel electrophoresis”) (Corich et al., 1991; Sobral et al., 1991; Haukka & Lindström, 1994).

Para o agrupamento de estirpes de rizóbio, as análises de diversos parâmetros com várias espécies, mostraram que resultados mais confiáveis são obtidos pela utilização de dois a três métodos (Laguerre et al., 2001). Os métodos que mostraram maior confiabilidade nas análises foram o seqüenciamento, parcial ou total, do gene 16S rDNA, a amplificação do DNA com primers específicos pela PCR, fragmentação do DNA pelas enzimas de restrição através da técnica de RFLP (Laguerre et al., 2001). Portanto, para uma melhor confiabilidade dos dados, conclui-se que a análise polifásica é mais adequada (Dutta & Pan, 2002). Iniciada a 25 anos atrás, a chamada taxonomia polifásica, teve como objetivo a integração dos diferentes tipos de dados e informações (fenotípicas, genéticas e filogenéticas) sobre o microrganismo e essencialmente indica uma taxonomia de consenso (Vandamme et al., 1996). O termo “taxonomia polifásica” foi utilizado pela primeira vez por Colwell (1970) e é utilizado para o delineamento de taxa em todos os níveis (Murray et al., 1990). Os recentes desenvolvimentos na taxonomia polifásica, também chamada de classificação polifásica ou identificação polifásica, constituem um enorme avanço na moderna taxonomia bacteriana (Vandamme et al., 1996).

Portanto, para que a FBN traga benefícios maiores para a cultura do feijoeiro é necessário que se identifique a diversidade das estirpes brasileiras em termos de classe taxonômica através de análises envolvendo parâmetros morfológicos, fisiológicos e genéticos (como os métodos citados anteriormente) e, dentro dessa diversidade, identificar estirpes com maior capacidade de fixação de nitrogênio, maior competitividade e maior estabilidade genética (Hungria et al., 1997).

8. Distribuição geográfica do rizóbio

Nos últimos anos, a taxonomia das bactérias fixadoras de nitrogênio, em geral, tem sofrido uma revisão substancial, devido ao advento dos métodos moleculares de análise filogenética (Young, 1993). Estes métodos moleculares têm se revelado como ferramenta poderosa nos estudos de biodiversidade das populações de rizóbio presentes no solo. Métodos que consideram a variação genotípica e o relacionamento entre espécies de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* têm sido estabelecidos (Martínez–Romero, 1994; Laguerre et al., 1996). Comparações entre seqüências completas ou parciais de nucleotídeos do 16S rRNA têm sido utilizadas para avaliar a relação filogenética entre as diferentes espécies de *Rhizobium* (Jarvis et al., 1992; Laguerre et al., 1993; Lucas et al., 1995; van Berkum et al., 1996).

Segundo Young (1993), *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* divergiram muito antes dos nódulos evoluírem mas, como os genes *nod* dos dois gêneros são claramente relacionados, deve ter ocorrido transferência lateral. Uma das primeiras teorias, sugeriu que os *Bradyrhizobium* seriam ancestrais e teriam originado junto com as leguminosas, quando imperavam condições de altas temperaturas e umidade (Hungria et al., 1997). Por outro lado, os estudos filogenéticos mostraram que o *Rhizobium* é estreitamente relacionado com *Agrobacterium* (Young et al., 1991) e, desse modo, seria lógico pressupor que os genes *nod* se originaram em *Rhizobium* e foram transferidos para *Bradyrhizobium*. A partir daí, os rizóbios passaram a nodular os ancestrais das leguminosas nos trópicos úmidos, com baixa

especificidade hospedeira e, indo para ambientes mais especializados, começou a ocorrer a seleção das plantas hospedeiras por determinados rizóbios (Sprent, 1994).

As estirpes de crescimento rápido parecem ser taxonomicamente mais diversificadas e ecologicamente mais adaptadas do que as de crescimento lento, provavelmente porque os principais genes ligados à FBN estão em plasmídeos, o que confere maior dinamicidade ao processo. Entretanto, ainda são desconhecidos todos os fatores que determinam a distribuição geográfica das espécies de rizóbio que nodulam o feijoeiro mas, certamente, a origem da disseminação da planta hospedeira deve estar relacionada à predominância da espécie de rizóbio, que pode ser carregada com as sementes (Hungria et al., 1997).

Quanto à distribuição geográfica do *Rhizobium* que nodula o feijoeiro, a hipótese lançada por Segovia et al. (1993) é de que a espécie *R. etli* seria encontrada originalmente na Mesoamérica, tendo sido introduzida na Europa juntamente com sua hospedeira no século XVI. Pela transferência horizontal do plasmídeo simbiótico destas estirpes para *R. leguminosarum*, teria surgido *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. Por outro lado, *R. tropici* seria originário da América do Sul (Martínez-Romero et al., 1991), devido à frequência de isolamento desta espécie principalmente no Brasil (Hungria et al., 1995; Mercante et al., 1998). No entanto, dados de levantamento de espécies de rizóbio nodulando o feijoeiro na Europa mostram uma ampla diversidade, incluindo a presença significativa de isolados de *R. etli*, *R. tropici* e mais recentemente duas novas espécies, compreendendo principalmente estirpes isoladas de nódulos de feijoeiro na França (Laguerre et al., 1993; Amarger et al., 1994), *R. gallicum* e *R. giardinii* (Amarger, et al., 1997). Provavelmente nos locais onde o feijoeiro foi introduzido via países da América do Sul, as sementes devem ter carregado *Rhizobium tropici*, explicando a dominância dessa espécie em algumas regiões da África, como no Quênia (Ayanango et al., 1995). Em diversos locais da França, conforme esperado, foi detectada a presença de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, mas a presença de *R. tropici* na população (Amarger et al., 1993, 1994, 1995), pode ter sido o resultado de introdução de sementes da América do Sul.

Ainda dentro do gênero *Rhizobium*, a espécie *R. hainanense* foi proposta por Chen et al. (1997). Esta espécie foi identificada por taxonomia numérica e contém 13 estirpes isoladas de 13 diferentes espécies de plantas que crescem na ilha tropical chinesa de Hainan. A similaridade com *R. tropici* verificada pelo seqüenciamento parcial do gene ribossomal 16S e

a falta de estudos de homologia de DNA com outros isolados de *R. tropici* geraram críticas quanto à validade da nova espécie. O trabalho final propondo a nova espécie (Chen et al., 1997) já inclui comparações da homologia de DNA com 6 estirpes diferentes de *R. tropici*, além de estirpes pertencentes à outras espécies descritas de rizóbio, assim como dados de sequenciamento do 16S rDNA e sua respectiva gama de hospedeiros. Após estas caracterizações adicionais Lindström et al. (1998) passaram a incluir a espécie dentro do gênero *Rhizobium*.

Além de *Rhizobium*, um número bastante representativo de isolados que, através de análise de restrição do gene ribossomal 16S, foram incluídos dentro do gênero *Sinorhizobium*, foram isolados de nódulos de feijoeiro ocorrendo naturalmente em solos tropicais do Brasil (Straliotto et al., 1999) e da África (Murphy et al., 1997).

A distribuição geográfica dos rizóbios de feijoeiro está diretamente relacionada com os grandes centros de origem do *P. vulgaris*. A análise de populações de feijoeiros crioulos, baseado em critérios diversos como características morfológicas, tipagem de phaseolinas, padrão de isoenzimas e RFLP, conduziu à proposta de duas distinguíveis áreas ou centros principais de diversificação genética de feijão (BD centros): o centro Mesoamericano (México, América Central, e Colômbia) e o centro andino na América do Sul (Equador, Peru, e Argentina) (Tohme, 1996; Beebe et al., 2001).

R. etli *bv. phaseoli* é uma das espécies predominantes encontradas associada com os feijoeiros selvagens e cultivados comuns do México, Colômbia, e Sul dos Andes (Amarger, 2001), conduzindo à proposta de coevolução entre o hospedeiro e *Rizóbio*, embora isto não tenha sido demonstrado claramente (Bernal & Graham, 2001). Por outro lado, *R. etli* é encontrado em regiões onde o feijoeiro foi introduzido a partir do século 16, ou seja, depois da descoberta das Américas. O *R. etli* já foi isolado de nódulos de feijoeiros cultivados na Espanha, França, Áustria, Quênia, Tunísia, e Indonésia (Silva et al., 2003)

Sequenciamento de DNA de rizóbios nativos revelou que estirpes da Etiópia também agrupam com *R. etli*, embora estes resultados tenham sido divergentes daqueles obtidos pela análise de isoenzimas nas mesmas estirpes (em que a maioria agrupou com *R. leguminosarum*) (Beyene et al. 2004). Os autores observaram que numa coleção de 83 isolados, nenhum deles assemelhou-se com *R. tropici*, *R. gallicum* e *R. giardinii*.

Uma coleção de isolados de rizóbio de 17 regiões geograficamente separadas do norte da Argentina foi caracterizada, por Aguilar et al. (1998), com base na variação de hospedeiro, crescimento, hibridização, polimorfismo de DNA e perfis plasmidiais, com o intuito de se verificar quais espécies de rizóbio nodulavam eficientemente os feijoeiros selvagens. Sendo assim, verificaram uma grande dominância de *R. etli*, além de alguns feijoeiros apresentarem, como simbiote, *R. leguminosarum* bv. phaseoli. Com esses resultados foi possível verificar, através da predominância de *R. etli*, que neste centro de origem a co-evolução favoreceu esta associação.

Na Austrália, 745 estirpes de rizóbio foram isoladas de 32 diferentes espécies de leguminosas hospedeiras provenientes de 17 localidades, por Lafay & Burdon (1998) e a caracterização mostrou que desses rizóbios, 16 pertenciam ao *Bradyrhizobium*, dois ao *R. leguminosarum* e três ao *Mesorhizobium*. Apenas um perfil genômico correspondeu à espécie conhecida como *R. tropici*, enquanto que a distribuição da maioria das espécies não se relacionou com as leguminosas hospedeiras ou localidades.

Amarger et al. (1994) avaliaram a ocorrência de *Rhizobium* nodulando feijão em quatro diferentes regiões da França. Utilizando características simbióticas e análise de RFLP dos fragmentos de 16S rRNA amplificados por PCR, esses autores conseguiram distinguir duas espécies, *R. leguminosarum* bv. phaseoli e *R. tropici*.

Para Aguilar et al. (2004), o *Rhizobium etli* é predominante nas Américas. Porém, ele encontrou polimorfismo no *nodC* do gene de *nodulação* comum entre estes rizóbios dentre uma gama extensiva de origens geográficas, as quais revelaram três tipos de *nodC*. As formas alélicas do gene *nodC* existentes entre os isolados americanos mostraram uma variação de predominância nas suas distribuições regionais em relação aos centros de diversificação genética de feijoeiro. Esta foi confirmada através de testes de inoculação cruzada com feijoeiros selvagens dos três centros de origem (solos do México, Equador, Bolívia, e a do noroeste da Argentina). Estes resultados mostraram que as populações de *R. etli* obtidas de nódulos originados dos solos mexicanos apresentaram predominância de um “tipo” de alelo para *nodC* completamente oposto ao encontrado nas bactérias dos solos boliviano e argentino e que, o alelo encontrado nas populações obtidas de solos equatorianos apresentou características intermediárias.

Desta forma, a variabilidade populacional encontrada nas estirpes noduladores de feijoeiro está relacionada à escolha do hospedeiro, à ampla distribuição geográfica dessas bactérias em todos os continentes e à sua enorme diversidade genética. Várias espécies novas de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Sinorhizobium* vêm sendo descritas nos últimos anos, refletindo o número crescente de grupos de pesquisa envolvidos em estudos da diversidade de rizóbios. Os avanços tecnológicos permitem, cada vez mais, a detecção de características discriminantes entre as espécies determinando a grande diversidade destes microrganismos (Aguilar et al., 2004).

O gênero *Burkholderia* também pode representar um microorganismo de associação com leguminosas, especialmente nos trópicos, onde tem-se observado uma imensa variabilidade genética entre os isolados, de pouca proximidade filogética com rizóbios. A capacidade diazotrófica destas bactérias já está atualmente bem caracterizada (Estrada de los Santos et al. 2001; Salles et al. 2004).

9. Estudo de diversidade do microssimbionte do feijoeiro no Brasil

No Brasil, na maioria dos solos onde se cultiva o feijoeiro, existe uma população naturalizada de rizóbio capaz de nodular a cultura, como demonstraram diversos levantamentos de nodulação espontânea (Hungria et al., 1997). Para garantir o sucesso da fixação é importante escolher adequadamente os parceiros simbióticos e dar preferência às bactérias mais eficientes e competitivas, bem como, genótipos de plantas que respondam melhor ao microssimbionte. Desta forma, é preciso que, num primeiro passo, uma busca por estirpes mais eficientes sejam buscadas, realizando um levantamento qualitativo e quantitativo da população naturalizada de rizóbios (Mostasso et al., 2002).

A espécie *R. tropici* parece ser nativa da região tropical da América do Sul, (Martínez–Romero *et al.*, 1991), sendo largamente encontrada no Brasil (Mercante et al., 1998; Hungria et al., 1995). Em uma análise de população em solos cultivados com feijoeiro no estado do Paraná foi constatado que, em média, a população era constituída de 29% de

rizóbio somente capaz de nodular o feijoeiro (*R. leguminosarum* bv. *phaseoli* ou *R. etli*), 25% capaz de nodular feijoeiro e leucena (*R. tropici* ou *R. etli*) e 46% de *Rhizobium* (*Leucaena*) spp. (Hungria & Stacey, 1997).

Em estudos de diversidade genotípica de rizóbios nativos isolados da região nordeste do Brasil, Estrada de los Santos et al. (2001) identificaram 7 grupos genéticos de rizóbio tropical. Dentre eles, um pequeno grupo de *R. etli* foi constatado. Por outro lado, Grange & Hungria (2004), identificaram em estudos de diversidade de rizóbio em dois ecossistemas brasileiros (solos de Pernambuco e Paraná), através de técnicas de PCR, RFLP-PCR e seqüenciamento do gene ribossomal 16S, reconheceram a predominância do *R. etli* nestas duas regiões. Também foram encontrados isolados similares a *R. tropici*, *R. leguminosarum* e *Mesorhizobium plurifarium*. Na Bahia e no Espírito Santo, 47,5% dos isolados capturados com a leucena foram classificados como *R. tropici* IIA, 1,5% como *R. tropici* IIB e os demais como tipo I (*R. etli*) (Stralio et al., 1995).

Assim, considerando estas discrepantes informações, são necessários novos estudos para o conhecimento da diversidade genética entre as espécies de rizóbio de cada região a fim de estabelecer melhores estratégias de inoculação de estirpes eficientes para a fixação biológica do nitrogênio (Hungria et al., 1997).

Ainda, considerando a importância da cultura do feijoeiro e do processo de fixação do N₂, poucos estudos foram conduzidos no Brasil sobre a diversidade de rizóbio capaz de nodular essa leguminosa. Entretanto, os rizóbios tendem a se tornar um dos grupos de microrganismos mais estudados no campo da genética e da biodiversidade. Este fato é explicado pelo interesse crescente nos mecanismos genéticos que controlam a simbiose, devido à importância econômica, ecológica e científica deste microsimbionte (Provorov & Vorob'ev, 2000).

9.1. Estudo de diversidade do microssimbionte do feijoeiro nas regiões do Cerrado

Os Cerrados são apresentados, atualmente, como uma das alternativas de maior potencial para expansão da fronteira agrícola brasileira. Este grande potencial deve-se ao clima (tropical estacional), à localização geográfica (distribuído nos estados de Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Bahia, Maranhão, Piauí, Pará, Ceará, Rondônia, Distrito Federal, áreas satélites de São Paulo, Amapá e Roraima) (FIGURA 8) e à extensão de terras mecanizáveis (207 milhões de hectares), que são aptas para o cultivo da maioria das culturas (Hungria et al., 1997; Vargas et al., 1994) (FIGURA 8).

Em levantamentos realizados na região dos Cerrados utilizando estirpes isoladas de nódulos de feijoeiro, foram constatados que, aproximadamente, 70% da população foi classificada como *R. tropici* IIA, 19% de *R. tropici* IIB e 11% como *R. etli* ou *R. leguminosarum* bv. Phaseoli (Hungria et al., 1997). Estas informações são corroboradas por Sá et al. (1997), que isolaram estirpes eficientes de rizóbios de diferentes regiões do cerrado e que foram distinguidas, fenotipicamente, como *R. leguminosarum* bv. phaseoli e *R. tropici*.

Embora *R. tropici* seja a espécie aceita como a mais comum e eficiente em condições tropicais, já foram isoladas nos solos dos Cerrados estirpes de *R. giardinii*, *R. leguminosarum* e até mesmo de *R. etli* (Mostasso et al., 2002). Estirpes de *Rhizobium* eficientes na nodulação do feijoeiro, isoladas de diferentes regiões de cultivo dessa leguminosa nos cerrados brasileiros, foram caracterizadas via RAPD (Mostasso et al., 2002). Esse estudo mostrou grande heterogeneidade entre as estirpes de *R. tropici* e *R. leguminosarum* bv. phaseoli avaliadas e permitiu a definição de grupos genéticos, além de indicar os "primers" mais adequados para essa caracterização. Os grupos de estirpes geneticamente distintas podem ser usados em estudos de competitividade buscando a obtenção de estirpes mais eficientes para a produção de inoculantes (Oliveira et al., 2000).

É interessante ressaltar que a utilização das técnicas moleculares podem revelar fatos muito interessantes sobre a evolução simbiótica dos rizóbios com leguminosas nas áreas dos Cerrados, principalmente porque esta região era desprovida de muitas das leguminosas comerciais e ainda apresenta muitas áreas naturais para comparação.

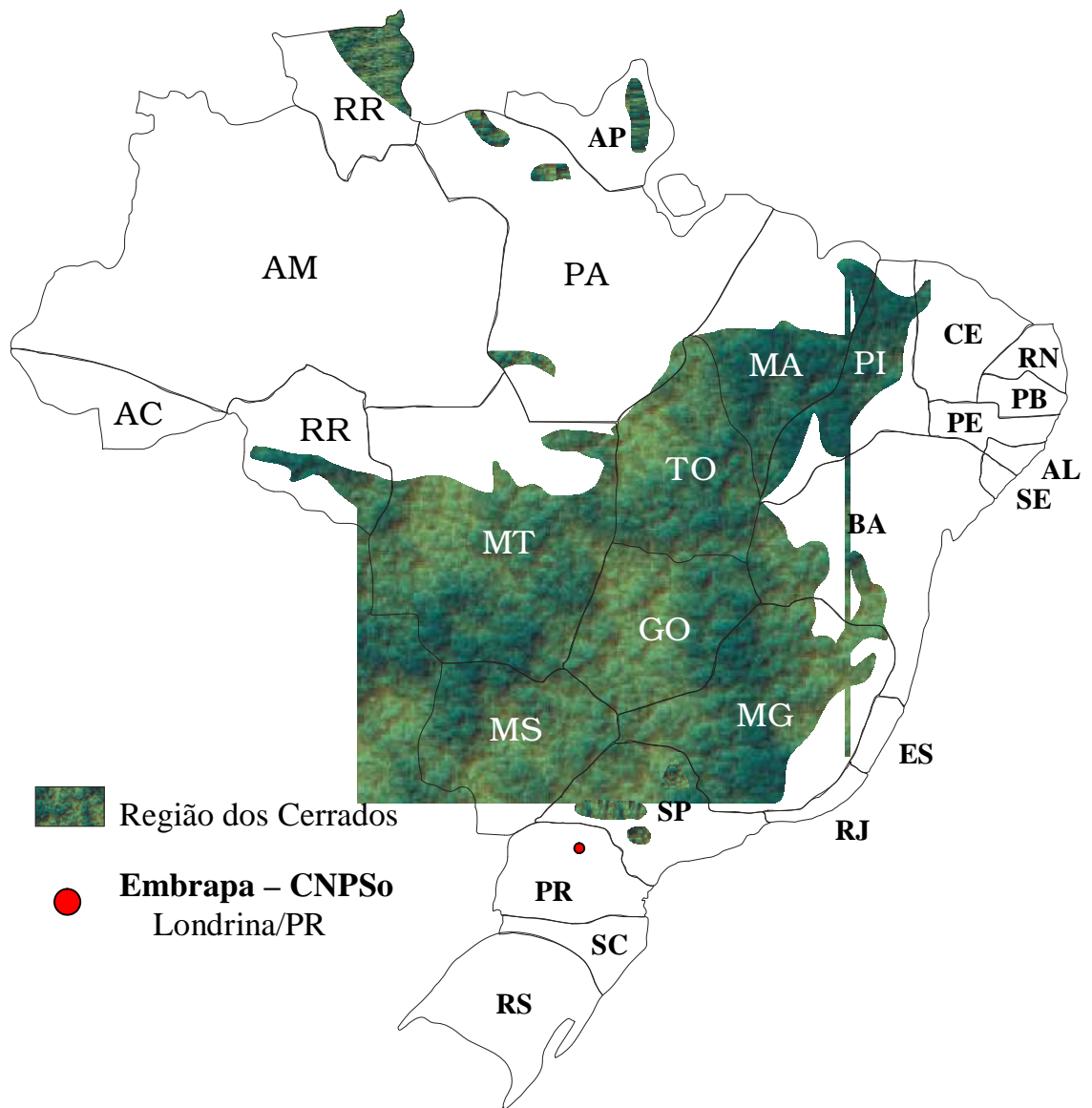


FIGURA 8. Distribuição geográfica da Região dos Cerrados. (Fonte: Mostasso et al., 2002).

II. Material e Métodos

Foram conduzidos dois estudos visando o entendimento da evolução, em solos brasileiros, da simbiose entre bactérias diazotróficas simbióticas e o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). A seguir, o material e as metodologias utilizadas nos dois estudos serão descritos.

1. Bactérias

1.1. Diversidade de bactérias capazes de nodular o feijoeiro nos Cerrados brasileiros

O estudo das bactérias simbiontes do feijoeiro provenientes de solos dos Cerrados foi realizado com 93 isolados provenientes de 20 áreas distintas do Distrito Federal (Tabela 1).

1.1.1. Isolamento das bactérias dos Cerrados

Dentre as 20 áreas selecionadas, dez já haviam sido utilizadas para agricultura e, no momento da amostragem, se encontravam com diferentes cultivos, conforme pode ser visualizado na Tabela 1. As demais áreas não haviam sido cultivadas anteriormente e estavam preservadas sob distintos gradientes florestais fisiográficos: Cerrado, Cerradão, Campo Sujo e Capoeira. Na Tabela 2 estão descritas as principais características dessas vegetações.

TABELA 1. Isolados de nódulos do feijoeiro provenientes de solos dos Cerrados do Distrito Federal obtidos e utilizados neste estudo. Nas coleções de culturas da Embrapa Soja e Embrapa Cerrados esses isolados receberam a denominação "H".

Área	Manejo	Vaso	Isolados
Áreas cultivadas			
1	Milheto (<i>Pennisetum</i> spp.) E soja (<i>Glycine max</i>)	1	61, 62
		2	63, 64
		3	65, 66
2	diversas leguminosas cultivadas como adubo verde	4	67, 68
		5	69, 70
		6	72
3	seringueira (<i>Hevea brasiliensis</i>)	7	73, 74
		8	sobrevivência zero
		9	77, 78
4	<i>Stylosanthes</i> sp. cultivar Mineirão	10	79, 80
		11	81, 82
		12	83, 84
5	<i>Leucaena</i> sp.	13	85
		14	87, 88
		15	89
6	Cevada (<i>Hordeum vulgare</i>) e milho (<i>Zea mays</i>)	16	91, 92
		17	93, 94
		18	95, 96
7	amendoim forrageiro (<i>Arachis pinto</i>) e milho	19	97, 98
		20	100
		21	101, 102
8	mandioca (<i>Manihot esculenta</i>) e milho	22	103, 104
		23	106
		24	107, 108
9	cana-de-açúcar (<i>Saccharum officinalis</i>)	25	109
		26	111, 112
		27	113, 114
10	trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	28	115, 116
		29	118
		30	119
Solos virgens e cobertos com vegetação natural			
11	vegetação de "Cerrado"	31	121, 122
		32	nodulação zero
		33	nodulação zero
12	vegetação de "Cerrado"	34	127
		35	128, 129
		36	130, 131
13	vegetação de "Capoeira"	37	nodulação zero
		38	132, 133
		39	134, 135
14	vegetação de "Cerrado"	40	136, 137
		41	138, 139
		42	140, 141
15	vegetação de "Cerradão"	43	142, 143
		44	144, 145
		45	146
16	vegetação de "Cerradão"	46	nodulação zero
		47	147, 148
		48	149, 150
17	vegetação de "Campo Sujo"	49	151, 152
		50	nodulação zero
		51	153
18	vegetação de "Capoeira"	52	158
		53	159
		54	160
19	vegetação de "Cerrado"	55	161, 162
		56	163, 164
		57	165, 166
20	vegetação de "Cerradão"	58	167, 168
		59	169, 170
		60	171

TABELA 2. Características dos tipos de vegetação dos Cerrados¹.

Tipo de vegetação	Características
Cerrado	Forma savânica caracterizada por apresentar extratos arbóreo e arbustivo bem definidos e cobertura arbórea variando de 10 a 60%.
Cerradão	Forma florestal mais densa e mais alta do que o Cerrado, com árvores de 7m ou mais de altura (chegando a atingir 15-18m) formando um dossel fechado.
Campo Sujo	Forma campestre de cobertura arbórea menor que o cerrado e arbustos mais esparsos; ocorre ao longo dos cursos fluviais de pequeno porte no Brasil Central.
Capoeira	Área de associações vegetais com predominância de árvores com baixa diversidade e alta densidade; caracterizada por formar um único extrato arbóreo e pela ausência de epífitas.

¹Andrade et al. (2002).

Amostras de solo foram coletadas nas áreas indicadas na Tabela 1 e transportadas para a Embrapa Cerrados, em Brasília, no Distrito Federal. Vasos de 4 kg de capacidade foram preenchidos com 2–3 kg de solo e utilizados como substrato para o cultivo do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Para o plantio, as sementes foram desinfestadas superficialmente, conforme descrito por Vicent (1970).

As plantas cresceram sob condições de casa de vegetação e, após quatro semanas, todos os nódulos foram coletados e os rizóbios foram isolados utilizando procedimentos microbiológicos padronizados (Vincent, 1970). A pureza das culturas foi confirmada pela riscagem das bactérias em meio contendo extrato de levedura e manitol (yeast mannitol extract, YMA, Vincent, 1970), verificando-se um único tipo de colônia, absorção de vermelho Congo e coloração de Gram. Cada colônia foi transferida para meio líquido (YM) e, após o crescimento, as culturas foram misturadas com glicerol 1:1 (v:v) para estocagem a –80°C e/ou liofilizadas para transporte.

Foram obtidos 105 isolados, que foram enviados ao laboratório de Biotecnologia do Solo da Embrapa Soja, no Distrito da Warta, município de Londrina, no Paraná. Nas etapas de preparo de novos estoques e confirmação da pureza foi verificado que 12 isolados pararam de

crescer. Desse modo, o estudo foi conduzido com 93 isolados, que foram estocados na Embrapa Soja a -80°C , enquanto as culturas de trabalho foram mantidas em tubos contendo meio YMA inclinado, a 4°C .

1.2. Estudo de genes de nodulação e fixação de N_2 de *Rhizobium etli*

Os ensaios deste estudo foram conduzidos no laboratório de Biotecnologia do Solo e em casa de vegetação na Embrapa Soja. Foram selecionadas 43 estirpes de *Rhizobium etli*, com base em agrupamentos obtidos previamente na análise por RFLP (restriction fragment length polymorphism, polimorfismo de fragmentos de restrição)–PCR (polymerase chain reaction, reação da polimerase em cadeia) da região do DNA que codifica o gene ribossomal 16S, bem como de seqüenciamento dessa região gênica, de uma população de bactérias isoladas de nódulos de feijoeiro inoculado com diluições sucessivas (10^{-1} a 10^{-6}) de solos provenientes de 14 áreas distintas dos estados de Pernambuco e Paraná (Grange & Hungria, 2004). A origem dessas estirpes pode ser visualizada na Tabela 3.

1.2.1. Estirpes de rizóbios utilizadas como referência

As estirpes utilizadas como referência estão citadas na Tabela 4. Foram incluídas tanto estirpes-tipo, representativas das espécies de *Rhizobium* capazes de nodular o feijoeiro, como outras estirpes representativas dessas espécies em utilizadas em outros estudos.

TABELA 3. Origem das 43 estirpes de feijoeiro obtidas de solos de Pernambuco e do Paraná e classificadas como *Rhizobium etli* no estudo de Grange & Hungria (2004)¹.

Solo	Estado	Distrito	Manejo do Solo	Cultivar utilizada para o isolamento	
				Aporé ²	Negro Argel ²
1	PE	São Francisco	Cultivado com feijoeiro	5	14, 28 ³
2	PE	São Francisco	Cultivado com feijoeiro três anos antes	29, 31, 39	48, 51, 54
4	PE	Santo Antonio	Cultivado com feijoeiro quarto anos antes	68, 69, 72, 73, 74, 76, 79	82, 244
5	PE	Caruaru	Cultivado com feijoeiro, uma área que não recebeu fertilizantes por 10 anos	96, 118, 124, 230 ³ , 246	123, 126
6	PE	Caruaru	Cultivado com feijoeiro	108, 248	109, 115, 116, 236
8	PR	São João	Cultivado com feijoeiro, por dois anos, entre as linhas de café (<i>Coffea arabica</i>)	127, 133	
9	PR	São João	Soja e feijoeiro nos últimos dois anos	160	
12	PR	Toledo	Cultivado com soja/trigo	164	178
13	PR	Francisco Alves	Feijoeiro por vários anos intercalado com milho	189, 190	199
14	PR	Francisco Alves	Feijoeiro intercalado com milho	204, 206, 209, 222	

¹Adaptado de Grange & Hungria (2004).

²Aporé apresenta coloração marrom e Negro Argel coloração preta.

³Modificado de Grange & Hungria (2004).

TABELA 4. Estirpes utilizadas como referência nos estudos de rizóbios microsimbiontes do feijoeiro.

Estirpes	Nome	Sinonímia	Local de isolamento	Precedência e estudo em que foi descrito
<i>Rhizobium etli</i> bv. phaseoli	CFN 42 ^T	ATCC 51251, DSM 11541, USDA 9032	México	CIFN, México, E. Martinez (Segovia et al., 1993)
<i>Rhizobium tropici</i> tipo A	CFN 299	USDA 9039, LMG 9517	México	CIFN, México, E. Martinez (Martínez-Romero et al., 1991)
<i>Rhizobium tropici</i> tipo B	CIAT 899 ^T	ATCC 49672, DSM 11418 , USDA 9030, UMR 1899, SEMIA 4077	Colombia	CIFN, México, E. Martinez (Martínez-Romero et al., 1991)
<i>Rhizobium tropici</i>	PRF 35		Paraná, Brasil	Embrapa Soja (Hungria et al., 2000)
<i>Rhizobium tropici</i>	PRF 54		Paraná, Brasil ¹	Embrapa Soja (Hungria et al., 2000)
<i>Rhizobium tropici</i>	PRF 81	SEMIA 4080	Paraná, Brasil	Embrapa Soja (Hungria et al., 2000)
<i>Rhizobium tropici</i> tipo B	LMG 9518			USDA, USA, P. van Berkum
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. phaseoli	USDA 2671	RCR 3644	England	USDA, USA, P. van Berkum
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. trifolii	ATCC 14480 ^T	DSM 30141 , 3D1k22a		USDA, USA, P. van Berkum (Jordan, 1984)
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. viciae	USDA 2370 ^T		USA	USDA, USA, P. van Berkum (Jordan, 1984)
<i>Rhizobium etli</i> bv. phaseoli	ATCC 8002		Inglaterra	USDA, USA, P. van Berkum (originalmente <i>R. leg.</i> bv. phaseoli, Young et al., 1991, agora <i>R. etli</i> , Münchbach et al., 1999)
<i>Rhizobium galicum</i> bv. galicum	R602sp ^T	USDA 2918	França	INRA, França, N. Amarger (Amarger et al., 1997)
<i>Rhizobium giardinii</i> bv. giardinii	H152 ^T	USDA 2914	França	INRA, França, N. Amarger (Amarger et al., 1997)
<i>Rhizobium tropici</i> tipo A	77		Pernambuco, Brasil	Embrapa Soja (solo 4, Grange e Hungria, 2004)
<i>Rhizobium</i> sp.	84 ¹		Pernambuco, Brasil	Embrapa Soja (solo 4, Grange e Hungria, 2004)
<i>Rhizobium</i> sp.	100 ¹		Pernambuco, Brasil	Embrapa Soja (solo 5, Grange e Hungria, 2004)
<i>Rhizobium</i> sp.	H 129 ¹		D. Federal, Brasil	Embrapa Soja
<i>Rhizobium</i> sp.	129 ²		Paraná, Brasil	Embrapa Soja (solo 8, Grange e Hungria, 2004)
<i>Rhizobium</i> sp.	215 ²		Paraná, Brasil	Embrapa Soja (solo 14, Grange e Hungria, 2004)
<i>Rhizobium</i> sp.	233 ¹		Paraná, Brasil	Embrapa Soja (solo 14, Grange e Hungria, 2004)
<i>Rhizobium tropici</i>	H 12	SEMIA 4088	D. Federal, Brasil	Embrapa Soja (Mostasso et al., 2002)
<i>Rhizobium tropici</i>	H 20		D. Federal, Brasil	Embrapa Soja (Mostasso et al., 2002)
<i>Rhizobium tropici</i>	H 52		D. Federal, Brasil	Embrapa Soja (Mostasso et al., 2002)
<i>Rhizobium etli</i> bv. phaseoli	ISP 34		Espanha	Univ. Sevilla, Espanha, M. Megías
<i>Rhizobium etli</i> bv. phaseoli	ISP 23		Espanha	Univ. Sevilla, Espanha, M. Megías
<i>Rhizobium etli</i> bv. phaseoli	ISP 19		Espanha	Univ. Sevilla, Espanha, M. Megías

¹Partial 16S rRNA sequences. ²Whole 16S rRNA sequences.

2. Caracterização dos isolados

2.1. Caracterização dos isolados capazes de nodular o feijoeiro provenientes dos Cerrados

2.1.1. Perfis de lipopolissacarídeos (LPS) dos isolados dos Cerrados

Os perfis de lipopolissacarídeos (LPS) foram obtidos de bactérias crescidas em 15 mL de meio YM por 7 dias, a 28°C, com agitação. As bactérias foram centrifugadas a 10.000 rpm por 15 minutos e lavadas duas vezes com solução salina (NaCl a 0.85%). O pélete foi ressuspensão para atingir uma concentração de 10^9 células mL⁻¹ e as células foram fervidas por 45 minutos a 95°C. A suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 12.000 rpm, tomando-se o sobrenadante e adicionando-se o mesmo volume de tampão de extração, consistindo de 4% (p/v) de SDS (sodium dodecyl sulfate) em 50 mM Tris-HCl pH 6,8; 20% (v/v) de glicerol; 5% (v/v) de β-mercaptoetanol e 0,01% de azul de bromofenol. As amostras foram fervidas por 5 minutos e mantidas a -20°C. As amostras foram corridas em géis de acrilamida (29,2 g de acrilamida e 0,8 g of *N,N'*-metilenobisacrilamida em 100 mL). O gel para separação foi preparado a 12,5% [contendo, em 50 mL: água, 16,75 mL; 1,5 M Tris-base pH 8,8, 12,5 mL; 10% SDS, 500 µL; bis/acrilamida, 20 mL; 10% persulfato de amônio, 250 µL; TEMED (*N,N,N',N'*-tetrametiletlenodiamina), 25 µL] e o gel para concentração foi preparado a 3,5% (ágar, 9,26 mL; Tris, 3,75 mL; SDS, 150 µL; bis/acrilamida, 1,75 mL; persulfato de amônio, 75 µL; TEMED, 7,5 µL). O tampão continha, para cada litro, Tris-base, 15,1 g; glicina, 72,0 g; SDS, 5 g. O tampão para corrida consistiu de (5X): Tris-Base, 15 g; glicina, 72,0 g; 0,5% SDS. As amostras foram corridas a 100 V por 3 a 4 h. Os géis foram corados durante a noite por incubação em 40% de etanol, 5% de ácido acético e oxidação do LPS com 0,7% (p/v) de ácido periódico, 40% de etanol, 5% de ácido acético e quatro lavagens de 15 minutos com água destilada. Os géis foram corados por 10 minutos com uma solução de nitrato de prata (1 g de nitrato de prata; 2,8 mL NaOH 1 M; 2 mL NH₄OH; em 150 mL de

água destilada); três lavagens de 30 minutos com água destilada, revelação com 0,25% de formaldeído e, finalmente, a revelação foi parada pela adição de ácido cítrico 1 M.

2.1.1.1. Índices de diversidade com base nos perfis de LPS

Para estimar os índices de diversidade os isolados dos Cerrados foram divididos em três categorias, segundo a procedência: 1) isolados de áreas cultivadas com leguminosas (áreas 1, 2, 4, 5 e 7 da Tabela 4); 2) isolados de áreas cultivadas sem leguminosas (áreas 3, 6, 8, 9 e 10 da Tabela 4); 3) isolados de áreas não cultivadas (áreas 11 a 20 da Tabela 4). Para cada categoria foi verificado o número total de indivíduos e o número de perfis distintos de LPS.

A abundância de perfis em cada categoria de manejo de solo foi analisada com o programa SPADE (“Species Prediction and Diversity Estimation”) (Chao & Shen, 2003). A riqueza genética das populações de cada manejo foi calculada com o índice ACE (“abundance-based coverage estimator”), uma estimativa não-paramétrica proposta por Chao & Lee (1992), na qual as espécies observadas são separadas em dois grupos: raros e abundantes. Nessa análise, somente os indivíduos do grupo raro são usados para estimar o número de indivíduos que estariam faltando na amostragem. O índice de diversidade de Shannon foi calculado com a equação proposta por Shannon & Weaver (1949) e uma estimativa não-paramétrica do mesmo índice foi baseada no método de cobertura de amostragem e espécies não observadas (Chao & Shen, 2003). A diferença entre esses parâmetros reside em que o índice tradicional de diversidade desconsidera as possíveis espécies que não foram observadas, enquanto que no método de Chao & Shen (2003) esses indivíduos são considerados com base nos grupos raros, que são aqueles que apresentam um número inferior ao corte (“cut-off”) do modelo. A similaridade entre as comunidades foi avaliada pelo índice de Jaccard (ajustado e não ajustado para considerar espécies não observadas) (Chao et al., 2004) e a predição de novas espécies em um levantamento mais amplo foi estimada conforme recomendado por Shen et al. (2003).

2.1.2. Caracterização genética dos isolados dos Cerrados

2.1.2.1. Extração do DNA total

As bactérias foram incubadas em 20 mL de meio YM, durante cinco dias, a 28°C, com agitação. Após a incubação, as suspensões bacterianas foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos e lavadas, por três vezes, com solução salina (NaCl a 0,85%). O precipitado foi ressuspenso em 400 µL de TE 50/20 (50 mM de Tris, pH 7,5; 10 mM de NaCl e 10 mM de EDTA, pH 8,0), a uma concentração de 10⁶ UFC mL⁻¹ (Unidade Formadora de Colônias) e avaliado por densidade ótica, segundo curva de crescimento previamente construída com diversas estirpes. A seguir, pipetaram-se 400 µL da suspensão bacteriana e foram adicionados 50 µL de SDS 10%, 5 µL de proteinase K (20 mg mL⁻¹ de água, mantida no congelador), 10 µL de lisozima (5 mg mL⁻¹ de água, mantida no congelador), 1 µL de RNase (10 mg mL⁻¹, preparada em tampão com 10 mM de Tris HCl pH 7,5 e 15 mM de NaCl) e, então, foram incubadas a 37°C, por mais ou menos 1 hora (até clarear). Depois disso, as amostras foram homogeneizadas com ponteiros de 1.000 mL (com a ponta cortada), movimentando para dentro e para fora, por três vezes, para retirar a viscosidade. A seguir, foi acrescentado NaCl para atingir uma concentração final de 250 mM e acetato de sódio até a concentração final de 300 mM. As amostras foram bem homogeneizadas e deixadas em repouso por 1 hora a 40°C. Em seguida, foram centrifugadas a 12.000 rpm por 15 minutos, recolheu-se o sobrenadante de cada amostra e foram adicionados, a este, 2 volumes de etanol absoluto frio a 95% para armazenamento, por uma noite, a -20°C. No dia seguinte, após as amostras serem centrifugadas novamente a 12.000 rpm por 15 minutos, o etanol foi descartado e os precipitados colocados para secar e, em seguida, ressuspenso em TE 10:1 (10 mM Tris-HCl; 1mM EDTA, pH 8,0). As soluções de NaCl, Tris-HCl, EDTA Na₂, SDS, AcONa e TE 50/20 foram previamente autoclavadas.

A quantificação do DNA de cada amostra foi feita em espectrofotômetro, no comprimento de onda 260 nm, sendo que 1 unidade de absorbância corresponde a 50 µg mL⁻¹ de DNA. A leitura foi feita com as amostras diluídas e a concentração do DNA (µg µL⁻¹) foi estimada pela seguinte relação: (OD₂₆₀ x Fator de diluição x 50 µg mL⁻¹)/1000.

Para verificar a pureza do DNA foi feita, também, a leitura a 280 nm. Com a relação entre as leituras 260/280, que deve ser inferior a 1,8, foi obtida a pureza do DNA (OD_{260}/OD_{280}). Depois das leituras, foi realizada a diluição do DNA para obter um estoque de DNA concentrado e outro de DNA diluído (utilizado para amplificação). Para a diluição, foram utilizados 10 μL de DNA, variando a quantidade de água (milli-Q esterilizada ou TE 10:1), segundo a fórmula: $C_i \times V_i = C_f \times V_f$, onde C_i é a concentração inicial do DNA, segundo a quantificação em 260nm; V_i é o volume inicial da solução de DNA; C_f é a concentração final da solução de DNA e V_f é o volume final necessário.

Para confirmar a concentração e pureza do DNA, as amostras (diluídas) foram corridas em mini-gel de agarose de 8 x 10 cm a 1,5% [0,6g de agarose em 40mL. de TBE 1X (10,8 mL de Tris-base; 5,5 g de ácido bórico; 4,0 mL de EDTA, 0,5 M, pH 8,0)], durante 25 minutos a 80 V.

A pureza do DNA foi verificada após a coloração com brometo de etídio a 40 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (1mg mL^{-1} de estoque, 0,00005 $\mu\text{L L}^{-1}$ de concentração final) por, aproximadamente, 20 minutos e a visualização feita em transluminador emitindo radiação ultra-violeta de comprimento de onda curto.

2.1.2.2. Amplificação do DNA pela reação de PCR (Polymerase Chain Reaction) com o “primer” específico BOX (*rep*-PCR)

O DNA das bactérias foi amplificado pela técnica de PCR com o oligonucleotídeo (“primer”) BOX A1R (5’-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3’), sintetizado pela Invitrogen™ (Life Technologies), que amplifica regiões conservadas e repetitivas do DNA (Versalovic et al., 1994). A reação de amplificação foi conduzida com os seguintes volumes: água milli-Q estéril, 13,6 μL ; dNTPs, 5 μL (estoque com 6 mM de cada base); tampão 10X, 2,5 μL ; MgCl_2 , 1,2 μL (50 mM); oligonucleotídeo, 1,0 μL (50 pmol μL^{-1}); DNA, 1,5 μL (50 ng. μL^{-1}); Taq DNA polimerase, 0,2 μL (5 U μL^{-1}), em um volume final de 25 μL . A amplificação foi realizada usando 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 final a 4°C, com o uso do termociclador PTC-100™.

Depois da amplificação, foram colocados 3 µL do tampão de amostra por tubo (tampão de amostra preparado com 0,25% de azul de bromofenol e 40% de sacarose ou 30% de glicerol) e preparado um gel de agarose de 20 x 25 cm a 1,5%, diluído em tampão TBE 1X. Nas canaletas do gel foram colocados 28 µL de cada amostra, com exceção da primeira canaleta, da última e da central, nas quais foi colocado 1 µL, por canaleta, do padrão de peso molecular de 1 Kb (Plus DNA Ladder™ Invitrogen – Life technologies). Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese a 120 V em gel de agarose a 1,5% (20 X 25 cm), em tampão TBE 1 X que, após 6 horas, foi corado com brometo de etídio e visualizado em um transluminador com lâmpada UV de comprimento de onda curta. Os géis foram fotografados por uma câmera digital (Kodak digital science™).

2.1.2.3. Análise de agrupamento dos produtos obtidos na análise de *rep*-PCR

Os produtos de PCR obtidos e fotografados, conforme descrito no item 2.1.2.2 foram analisadas pelo programa BioNumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica, Versão 1.01) e, para a análise de agrupamento foi usado o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean) e o coeficiente de Jaccard. Foi considerada uma tolerância de 3%.

2.1.2.4. Índices de diversidade com base na análise de *rep*-PCR

Para a análise de diversidade genética os isolados foram divididos nas três categorias especificadas no item 2.1.1.1, ou seja, isolados de áreas cultivadas com leguminosas, isolados de áreas cultivadas sem leguminosas e isolados de áreas não cultivadas.

Inicialmente, foi realizada a análise de agrupamento com os isolados de cada uma das três categorias, conforme descrito no item 2.1.2.3 e sem a inclusão das estirpes de

referência. Os perfis com 70% de similaridade nos dendrogramas, considerando uma tolerância de 3% foram considerados semelhantes. Com base nessa análise, o número total de indivíduos e o número de perfis distintos em cada categoria foi determinado. Os índices de diversidade utilizados foram os mesmos descritos no item 2.1.1.1.

2.1.2.5. Amplificação do DNA pela reação de PCR com “primers” que codificam o gene 16S rRNA

A partir dos agrupamentos obtidos por BOX-PCR no estudo de diversidade de 93 isolados de rizóbios, foram escolhidos 45 isolados para o sequenciamento da região do DNA que codifica o gene ribossomal 16S.

O DNA das amostras foi submetido à amplificação com os “primers” fD1 (5’-ccgaattcgtcgacaacAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3’) e rD1 (5’-cccgggatccaagcttAAGGAGGTGATCCAGCC-3’), segundo Weisburg et al. (1991), com a finalidade de amplificar a região que codifica o gene 16S rRNA com, aproximadamente, 1.500 pares de bases. As bases em letras minúsculas são necessárias em caso de clonagem e podem ser omitidas dos “primers”, caso não sejam requeridas. A amplificação foi realizada usando os seguintes ciclos: 1 ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 2 min; 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 15 s, 93°C por 45 s, anelamento dos “primers” a 55°C por 45 s, e extensão a 72°C por 2 min; 1 ciclo de extensão final a 72°C por 5 min e manutenção a 4°C.

2.1.2.6. Seqüenciamento da região do DNA que codifica o gene 16S rRNA

Para a purificação dos produtos de PCR obtidos no item 2.1.2.5 foi utilizado o “kit” “Concert Rapid PCR Purification System” da GibcoBRL (n°11458), na seguinte ordem: adicionou-se uma alíquota de “Binding Solution-H1” (hidroclorato de guanidina, EDTA, Tris HCl, isopropanol) para cada amostra amplificada, que foi então homogeneizada. As amostras foram centrifugadas por 1 min a 12.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Em

todos os precipitados foi adicionado um tampão de lavagem “Wash Buffer–H2” (NaCl, EDTA, Tris HCl e etanol) e, então, as amostras foram centrifugadas novamente por 1 min a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram novamente centrifugadas para que qualquer resíduo de tampão de lavagem fosse removido.

Para o seqüenciamento da região do DNA que codifica o gene 16S rRNA, os produtos purificados de PCR de cada bactéria (obtidos com os “primers” fD1 e rD1, 80 ng por reação) receberam uma mistura de 3 µL de corante (“Dynamic ET terminator reagent premix” para o MegaBACE, Amersham, Biosciences) e 3 pmol dos “primers” fD1 (Weisburg et al., 1991) ou Y2 (Young et al., 1991). As reações de PCR foram conduzidas em uma microplaca de 96 poços com as seguintes reações: desnaturação, 2 min a 95°C; 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 10 s; 50°C por 4 s; extensão a 60°C por 4 min; e, manutenção a 4°C.

Após a amplificação foram adicionados, para cada 20 µL de amostra (7 µL de cada reação de PCR acrescidos de 20 µL de água mili–Q), 2 µL de acetato de amônio (7,5 M) e 65 µL de etanol (99,5%, mantido a temperatura ambiente). As placas foram vedadas, homogeneizadas e centrifugadas por 45 min a 4.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a placa invertida sobre papel absorvente para secar. Após o período de secagem, a placa foi selada, homogeneizada, centrifugada por 10 min a 4.000 rpm e o sobrenadante novamente descartado. Posteriormente, a placa foi invertida sobre papel absorvente e centrifugada a 300 rpm por 25 s. O precipitado atingiu massa constante em temperatura ambiente por 30 min ou a 37°C por 15 min, ressuspensão em 7 µL de água mili–Q, ou em tampão (formamida a 70% por 15 min e EDTA 1 mM) e submetido ao seqüenciamento no sistema de análise de DNA, MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences). Em geral, os parâmetros de eletroforese utilizados foram: 1 Kv de voltagem de injeção, 40 s de injeção da amostra, 5 Kv de voltagem de corrida e 240 min de corrida.

2.1.2.7. Análise de agrupamento das seqüências do gene ribossomal 16S rRNA

As seqüências de alta qualidade obtidas no item 2.1.2.5 foram reunidas formando uma fita “contig” (fita consenso) utilizando os programas Phred (Ewing & Green, 1998; Ewing et al., 1998), Phrap (www.phrap.com) e Consed (Gordon et al., 1998). As

seqüências confirmadas no sentido 3’–5’ foram submetidas ao banco de dados “Genebank” a fim de verificar seus alinhamentos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Para a análise de agrupamento, as seqüências obtidas foram comparadas às seqüências das seguintes estirpes utilizadas como referência (em parênteses, número de acesso no “Genebank”, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>): *Burkholderia* sp. BR 3470 (AY773198.1), *Burkholderia graminis* C4D1M^T (U96939), *Burkholderia cepacia* ATCC 53867^T (AY741356), *Burkholderia* sp. TJ 182 (AJ505301), *Burkholderia* sp. HPUD 12.1 (AY691395.1), *Rhizobium tropici* PRF 54 (AF260275.2), *Rhizobium tropici* PRF 35 (AF260298.2), *Rhizobium tropici* PRF 81 (AF260274.2), *Rhizobium tropici* CIAT 899^T (U89832), *Rhizobium leguminosarum* USDA 2370^T (U29386), *Rhizobium* sp. AC87K1 (AY776226.1), *Rhizobium etli* CFN 42^T (U28916), *Rhizobium etli* ISM4 (AY465887.1).

Uma árvore filogenética foi construída usando o programa Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica, Versão 1.01), utilizando o algoritmo UPGMA (unweighted pair–group method, com média aritmética) (Sneath & Sokal, 1993).

2.1.3. Caracterização simbiótica dos isolados dos Cerrados

2.1.3.1. Avaliação da capacidade de nodulação e fixação de N₂ dos isolados em casa de vegetação

O experimento foi conduzido em um delineamento experimental em blocos ao acaso, com três repetições, em condições de casa de vegetação, em vasos de Leonard modificados (Vincent, 1970) contendo areia e vermiculita 1:2 (v:v), previamente lavadas e autoclavadas.

Os isolados armazenados em tubos a 4°C, conforme descrito no item 1.2.1 foram crescidos por 7 dias, a 28°C, em meio YM. As culturas foram padronizadas para a concentração de 10⁹ células mL⁻¹. Sementes de feijão Aporé foram desinfestadas com álcool comercial e hipoclorito de sódio a 10% em água deionizada (v:v), conforme descrito por Vincent (1970). Em cada vaso, foram plantadas cinco sementes, que foram inoculadas adicionando-se 1 mL por vaso do inoculo (10⁹ células mL⁻¹). Foram incluídos controle

sem inoculação, com e sem nitrogênio mineral (80 mg N pl^{-1} por semana). Oito dias após a emergência das plantas foi realizado o desbaste, deixando duas plantas por vaso.

Aos 45 dias após o plantio, as plantas foram coletadas, separando a parte aérea da raiz e retirando-se os nódulos. Os nódulos e a parte aérea foram secos a 65°C até atingirem massa constante e, então, foram avaliados os parâmetros de número e massa de nódulos secos, massa da parte aérea seca e N total da parte aérea. O N total foi analisado pelo método espectrofotométrico de azul de indofenol (Feije & Anger, 1972). As médias e os desvios padrões das médias foram estimados utilizando o programa Microsoft®Excel 2002.

2.2. Caracterização dos genes de nodulação e fixação de N_2 de *Rhizobium etli*

2.2.1. Caracterização genética das estirpes de *R. etli*

2.2.1.1. Extração do DNA total

O DNA das 43 estirpes de *R. etli*, bem como das estirpes utilizadas como referência citadas na Tabela 4 foi extraído conforme descrito no item 2.1.2.1.

2.2.1.2. Reação de PCR com “primers” que codificam a região plasmidial (*pSym*) contendo o genes *nodA*, *nodB*, *nodC* e *nifH*

Os “primers” obtidos para a amplificação da região contendo o gene *nifH* foram escolhidos por uma cuidadosa inspeção em 37 seqüências de *nifH* disponíveis no GeneBank database, EMBL e DDBJ7. Foram utilizados os seguintes marcadores:

nifHF–“forward” (5’–TACGGNAARGGSGGNATCGGCAA–3’) e nifHI–“reverse” (5’–AGCATGTCTCSAGYTCNTCCA–3’). Esse “primers”, são capazes de flanquear fragmentos entre 780 pb e 890 pb (Laguerre et al., 2001). Para a amplificação de 930 pb dos 1300 pb do gene *nodC* foram escolhidos os seguintes “primers”: nodCF–“forward” (5’–AYGTHGTYGAYGACGGTTC–3’) e nodCI–“reverse” (5’–CGYGACAGCCANTCKCTATTG–3’) (onde Y representa uma C ou T; H representa um A, C ou T; R representa A ou G; S representa C ou G; K representa G ou T; N representa A, C, G ou T e I representa uma inosina – relação válida para os dois marcadores citados acima). Para desenhar os “primers” de amplificação para o gene *nifH*, Laguerre et al. (2001) comparou seqüências deste gene presentes em: *R. leguminosarum* bv. trifolii, *R. etli* bv. phaseoli, *S. meliloti*, *Sinorhizobium* sp. NGR234, *B. japonicum*, *Azorhizobium caulinodans*, *Azospirillum brasiliense*, *Azotobacter chroococcum*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus* e *Rhodospirillum rubrum*. Os marcadores para o gene *nodC* foram desenhados a partir de comparações de seqüências deste gene em: *R. leguminosarum* bv. viciae, *R. tropici*, *R. etli* bv. phaseoli, *R. galegae*, *Sinorhizobium meliloti*, *S. fredii*, *Sinorhizobium* sp. NGR234, *M. loti*, *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii* (Laguerre et al., 2001).

Os “primers” escolhidos para as amplificações das regiões correspondentes ao genes *nodB* e *nodA* foram, respectivamente: nodB3F–“forward” (5’–TACCTGACSTTYGACGACGGTCC–3’) (Wernegreen & Riley, 1999) e nodCRR–“reverse” (5’–GAGACGGCGRCRCTGGTTG–3’) (Silva et al., 2003); nodA1 (5’–TGCRGTGGAARNTRNCTGGGAAA–3’), nodA2 (5’–GGNCCGTCRTCRAAWGTCARGTA–3’) (Haukka et al., 1998), nodA3 (5’–TCATAGCTCYGRACCGTTCCG–3’) e nodA4 (5’–ATCATCKYNCCGGNNGGCA–3’) (Zhang et al., 2000). Para as estirpes que não amplificaram com os “primers” nodA1 e nodA2, Zhang et al. (2000), sugerem uma reação de PCR com os “primers” nodA1 e nodA3, seguida de uma outra reação com os “primers” nodA1 e nodA4, utilizando como DNA o produto de PCR da primeira reação.

Para iniciar as reações de amplificação, tanto para a região específica do gene 16S rRNA, quanto para os genes *nifH*, *nodA*, *nodB* e *nodC*, foi necessário o preparo dos seguintes reagentes: dNTPs, 1,5mM de solução para cada um dos quatro nucleotídeos; “primers” (estoques preparados a 30 ng μL^{-1} ; concentração final de 50 pmol μL^{-1}); Taq polimerase, 5 U μL^{-1} , diluída em tampão 1X; tampão 10X [500 μL de KCl 1 M (500 mM);

Tris-HCl pH 8,3, 1 M (100 mM); 400 µL de água]; solução de MgCl₂, 20 mM. Os volumes utilizados para cada reação foram, para os genes: *nifH*- 24,2 µL de água (milli-Q esterilizada), 10,0 µL de dNTPs, 5,0 µL de tampão 10X, 2,4 µL de MgCl₂, 3,0 µL de cada "primer", 2,0 µL de DNA (50 ng) e 0,4 µL de Taq polimerase; *nodA*- 22,8 µL de água (milli-Q esterilizada), 6,6 µL de dNTPs, 5,0 µL de tampão 10X, 3,2 µL de MgCl₂, 5,0 µL de cada "primer", 2,0 µL de DNA (50 ng) e 0,4 µL de Taq; *nodB*- 25,2 µL de água (milli-Q esterilizada), 6,6 µL de dNTPs, 5,0 µL de tampão 10X, 4,8 µL de MgCl₂, 3,0 µL de cada "primer", 2,0 µL de DNA (50 ng) e 0,4 µL de Taq e; *nodC* - 28,2 µL de água (milli-Q esterilizada), 4,8 µL de dNTPs, 5,0 µL de tampão 10X, 2,0 µL de MgCl₂, 5,0 µL de cada "primer", 2,0 µL de DNA (50 ng) e 0,4 µL de Taq. Todos apresentando um volume final de 50 µL.

Os ciclos utilizados para cada gene foram: *nifH*- 30 min a 95°C, 1 min a 94°C, 30 seg a 63°C, 2 min a 72°C, repetir os passos 2, 3, 4 35 vezes, 3 min a 72°C; *nodA*- 2 min a 97°C, 40 seg a 92°C, 1 min a 55°C, 1 min e 30 seg a 72°C, repetir os passos 2, 3, 4 25 vezes, 5 min a 72°C; *nodB*- 1 min e 30 seg a 96°C, 30 seg a 96°C, 30 seg a 66°C, 30 seg a 72°C, repetir os passos 2, 3, 4 30 vezes, 3 min a 72°C; *nodC*- 30 seg a 94°C, 1 min a 53°C, 30 seg a 72°C, repetir os passos 2, 3, 4 40 vezes, 5 min a 72°C.

Depois da amplificação, as amostras foram aplicadas em um gel de agarose (20 x 25 cm) a 1,5%, diluído em tampão TBE. O padrão de peso molecular utilizado foi de 1Kb (plus DNA LadderTM- Gibco – Life technologies). A corrida foi realizada a 100 V por, aproximadamente, 6 horas. Os géis foram corados com brometo de etídio e analisados conforme descrito no item 2.2.2.

2.2.1.3. Perfil de RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism) dos genes *nodA*, *nodB*, *nodC* e *nifH*

Os produtos obtidos pelas amplificações com os “primers” para as regiões que codificam os genes *nod* e *nif* citados no item 2.2.1.2 foram digeridos com as seguintes enzimas de restrição: *Hha* I (5′- GCG/C - 3′; 3′- C/GCG - 5′), *Hae* III (5′- GGCC - 3′; 3′- CCGG - 5′), *Mbo* II (5′- /GATC - 3′, 3′- CTAG/ - 5′) e *Msp* I (5′- C/CGG - 3′; 3′-

GGC/C – 5') (Gibco – Life technologies) para as regiões do *nifH* e dos *nodA*, *nodB* e *nodC* e, ainda para esses três últimos genes, mais duas enzimas foram aplicadas: *Hinf* I (5'–G/ANTC – 3'; 3'–CTNA/G – 5') e *Rsa* I (5'–GT/AC – 3'; 3'–CA/TG – 5). Como todas as enzimas são estocadas a 10 U μL^{-1} e o volume final de cada reação foi de 10 μL , os volumes dos reagentes para cada reação de digestão foram: 0,5 μL da enzima, 1 μL do tampão 10X, 2,5 μL de água milli-Q esterilizada e 6 μL do produto de PCR. Todas as reações foram incubadas a 37°C em termociclador e o tempo de digestão para cada enzima foi de: *Hinf* I, 3 h; *Hae* III, 5 h; *Mbo* I, 5 h, *Hha* I, 1 h; *Msp* I, 2 h e; *Rsa* I, 2 h.

Após a incubação, as amostras foram aplicadas em gel de agarose (10 x 12,5 cm) a 3%, utilizando tampão TBE 0,5X, tanto para o preparo do gel, quanto para a corrida (100 V por aproximadamente 3,5 h). Em cada canaleta do gel foram colocados 7,2 μL de cada amostra e 3 μL do tampão de amostra, com exceção da primeira canaleta, da última e da central, nas quais foram colocados 0,7 μg , por canaleta, do padrão de peso molecular de 100 Kb (Invitrogen–Life Technologies). Os géis foram corados com brometo de etídio e as bandas visualizadas em transluminador com lâmpada ultravioleta e fotografadas, conforme descrito no item 2.1.2.2.

2.2.1.4. Análise de agrupamento dos produtos obtidos na análise de RFLP-PCR dos genes de *nod* e *nif*

Os géis foram fotografados e a análise de agrupamento das estirpes foi realizada utilizando o programa BioNumerics, conforme descrito no item 2.2.2.

III. Resultados

Estudo 1

1. Diversidade de bactérias capazes de nodular o feijoeiro nos Cerrados

1.1. Perfis de lipopolissacarídeos (LPS) dos isolados dos Cerrados

Para a caracterização inicial dos 93 isolados dos Cerrados microssimbiontes do feijoeiro foi utilizada a análise de perfis de LPS, uma metodologia eficiente e de baixo custo para esse tipo de agrupamento. Os isolados dos Cerrados puderam ser agrupados em 15 perfis distintos (FIGURA 9) e o perfil de cada isolado está discriminado na TABELA 5.

Nas áreas cultivadas anteriormente com alguma leguminosa (áreas 1, 2, 4, 5 e 7), os isolados puderam ser classificados em quatro perfis (I, II, III e IV). Cada uma das cinco áreas cultivadas com alguma leguminosa foi bastante homogênea em termos de perfis de LPS, com todos os isolados das áreas 1 e 4 apresentando o perfil I, todos da área 5 o perfil III e os da área 7 o perfil IV; somente as estirpes da área 2 apresentaram dois tipos de perfis, I e II (TABELA 5).

Nas cinco áreas cultivadas anteriormente, mas nunca com leguminosas (áreas 3, 6, 8, 9 e 10) foram observados oito perfis distintos de LPS, sendo dois deles comuns aos das áreas cultivadas com leguminosas (I, II e IV) e os demais ocorrendo somente nessas áreas (V, VI, VII, VIII, IX). Em nenhuma das cinco áreas todos os perfis foram idênticos e duas delas se destacaram em relação à diversidade: a área 8, com mandioca e milho, em que cada um dos cinco isolados apresentou perfil único, o mesmo acontecendo com três dos quatro isolados da área 10, cultivada com trigo (TABELA 5).

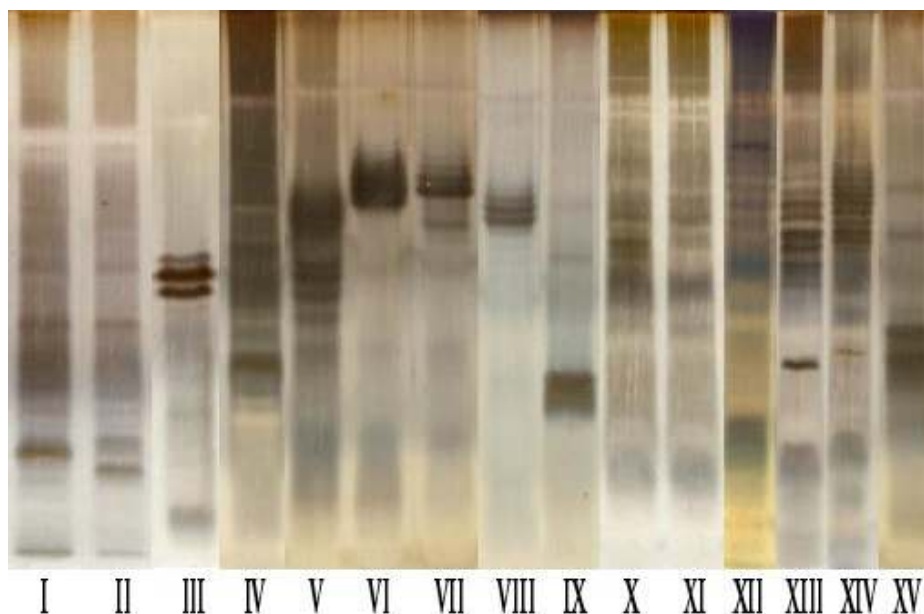


FIGURA 9. Perfis de lipopolissacarídeos encontrados em 93 isolados de nódulos de feijoeiro inoculado com diluições de solos provenientes de áreas cultivadas e não cultivadas dos Cerrados.

A diversidade de perfis de LPS dos microssimbiontes nativos de solos dos Cerrados fica ainda mais evidenciada na análise das dez áreas nunca cultivadas anteriormente (áreas 11 a 20). Exceto pela área 14, em nenhuma delas as bactérias apresentaram um único perfil de LPS. Ao todo, as bactérias foram classificadas em oito perfis de LPS, dos quais somente um, o IV, foi comum às áreas cultivadas com e sem leguminosas e outro, o perfil IX, foi detectado em áreas cultivadas sem leguminosas. Os demais seis perfis (X a XV) ocorreram exclusivamente em áreas nunca cultivadas anteriormente (TABELA 5).

As estirpes de referência para *R. tropici* IIA (CFN 299) e IIB (CIAT 899), assim como as estirpes PRF54 e PRF81, apresentaram os perfis I e II, presentes somente em áreas cultivadas, mas o perfil de *R. etli* (CFN 42) não apresentou semelhança com nenhum dos isolados dos Cerrados (TABELA 5).

TABELA 5. Perfis de lipopolissacarídeos (LPS) e posicionamento em grande grupos (GG) na análise de *rep*-PCR de isolados de nódulos de feijoeiro inoculado com diluições de solos provenientes de áreas cultivadas e não cultivadas dos Cerrados.

Isolado	Área ¹	LPS ²	<i>rep</i> ³	Isolado	Área ¹	LPS ²	<i>rep</i> ³	Isolado	Área ¹	LPS ²	<i>rep</i> ³
61	1	I	III	103	8	II	IV	147	16	IV	n.a.
62	1	I	IV	104	8	V	I	148	16	IV	IV
63	1	I	IV	106	8	IV	III	149	16	XII	n.a.
64	1	I	XI	107	8	VII	I	150	16	XII	n.a.
65	1	I	n.a. ⁴	108	8	IX	IV	151	17	XII	II
66	1	I	IV	109	9	IX	V	152	17	IV	IV
67	2	I	n.a.	111	9	IV	VI	153	17	IV	n.a.
68	2	I	IV	112	9	IX	n.a.	158	18	IV	II
69	2	I	IV	113	9	IX	IV	159	18	XV	III
70	2	II	VI	114	9	IX	IV	160	18	XII	II
72	2	II	IV	115	10	IX	IV	161	19	X	IV
73	3	II	n.a.	116	10	VIII	n.a.	162	19	XIV	IV
74	3	VI	VI	118	10	II	II	163	19	XIV	II
77	3	I	IV	119	10	IX	IV	164	19	XIV	II
78	3	I	I	121	11	X	IV	165	19	XIII	VI
79	4	I	VII	122	11	XIV	n.a.	166	19	XIV	II
80	4	I	IV	127	12	X	VIII	167	20	IX	n.a.
81	4	I	VII	128	12	IX	II	168	20	IX	n.a.
82	4	I	IV	129	12	IX	IV	169	20	XII	IV
83	4	I	VII	130	12	X	VI	170	20	IX	II
84	4	I	IV	131	12	X	VI	171	20	XII	II
85	5	III	IV	132	13	XI	II				
87	5	III	IV	133	13	XI	VIII				
88	5	III	III	134	13	X	X				
89	5	III	n.a.	135	13	X	II				
91	6	II	n.a.	136	14	XIII	I				
92	6	IV	I	137	14	XIII	II				
93	6	IV	IV	138	14	XIII	VI				
94	6	IV	XI	139	14	XIII	II				
95	6	IV	XI	140	14	XIII	II				
96	6	IV	I	141	14	XIII	VI	Estirpes de referência			
97	7	IV	V	142	15	IX	II	CFN 299	I	I	
98	7	IV	VII	143	15	XII	n.a.	PRF54	I	IX	
100	7	IV	n.a.	144	15	XII	IV	PRF81	II	X	
101	7	IV	n.a.	145	15	XII	IV	CIAT899	II	II	
102	7	IV	n.a.	146	15	XII	II	CFN42	XVI	IX	

¹As áreas estão descritas na TABELA 1.

²Perfis de LPS mostrados na FIGURA 9.

³Grandes grupos (GG) mostrados na FIGURA 10.

⁴Não amplificado satisfatoriamente na análise de *rep*-PCR.

1.2. Análise de agrupamento dos produtos obtidos por *rep*-PCR

Quando os DNAs dos 93 isolados dos Cerrados foram submetidos à reação de PCR com o “primer” BOX (*rep*-PCR), boas amplificações foram conseguidas com 75 desses isolados. Constatou-se um grau elevado de polimorfismo entre as bactérias investigadas, com a obtenção de 61 perfis distintos (FIGURA 10). Somente três grupos uniram bactérias com perfis idênticos, mas as bactérias desses agrupamentos apresentavam origens distintas. Como exemplo, o grupo com maior número de isolados idênticos apresentou dois isolados da área 1, cultivada com leguminosa (62 e 63), um isolado da área 8, cultivada sem leguminosa (108) e os demais de áreas não cultivadas, incluindo as áreas 11 (121), 16 (148 e 152) e 19 (161 e 162) (FIGURA 10 e TABELA 1).

A análise de agrupamento dos produtos de *rep*-PCR obtidos foi realizada utilizando o método de agrupamento UPGMA e o coeficiente de Jaccard e resultou na união de todos os isolados e estirpes de referência em um nível de similaridade de apenas 31,6% (FIGURA 10). Onze grande grupos (GG) puderam ser observados no dendrograma geral de *rep*-PCR, embora todos com baixo nível de similaridade final. A seguir, os agrupamentos obtidos serão descritos, conforme os resultados apresentados na FIGURA 10 e na TABELA 1.

O GG I agrupou seis isolados dos Cerrados, somente um de área não cultivada (136), reunidos em um nível de similaridade de 37,6%. As estirpes CFN 299 de *R. tropici* e R602sp de *R. gallicum* foram unidas entre si com 66,7% de similaridade e aos seis isolados dos Cerrados em um nível de similaridade final de 36,1%.

O GG II apresentou vários subagrupamentos. No primeiro deles, três estirpes de *R. leguminosarum*, pertencentes a três biovars distintos, foram agrupadas com 67,5% de similaridade, enquanto três estirpes de *R. tropici*, incluindo a padrão CIAT 899 apresentaram identidade total. Nos demais subgrupos foram posicionados 17 isolados dos Cerrados e todos, exceto um (118), são provenientes de áreas nunca cultivadas anteriormente. O nível final de similaridade do GG II foi de 42,4%.

Nenhuma estirpe de referência foi agrupada no GG III, apenas quatro isolados dos Cerrados, unidos em um nível final de similaridade de 52,5%, três deles de áreas cultivadas com e sem leguminosas.

O GG IV foi o que incluiu maior número de isolados e apresentou dois subagrupamentos. No primeiro, quatro isolados, dois de áreas nunca cultivadas anteriormente, foram unidos em 66,7% de similaridade. No segundo subgrupo, 23 isolados, dos quais somente seis provenientes de áreas não cultivadas, foram unidos com o maior nível de similaridade constatado neste estudo, de 76,8%; em relação aos demais isolados desse subgrupo, dez perfis correspondem a isolados de áreas cultivadas com leguminosas e os sete demais de áreas cultivadas sem leguminosas. Finalmente, o isolado 145, de área com vegetação de “Cerradão”, se uniu aos demais com 53,6% de similaridade.

Dois isolados de duas áreas cultivadas distintas se uniram em 50% de similaridade, formando o GG V. Já o GG VI, com 43,8% de similaridade, foi formado por oito isolados, cinco provenientes de três áreas distintas não cultivadas e três originários de áreas sob diferentes cultivos. Similaridade mais elevada (70,9%) foi constatada entre os quatro isolados que formaram o GG VII, três deles obtidos em área cultivada com estilosantes e o quarto de área com amendoim forrageiro e milho.

Os isolados 127 e 133, ambos de áreas não cultivadas, foram agrupados com *R. giardinii* estirpe H152 (40,6%) no GG VIII. O GG IX uniu *R. etli* CFN 42 e *R. tropici* PRF 54 em 47,8%, enquanto *R. tropici* PRF 81 foi agrupada com o isolado 134 no GG X com apenas 39,1% de similaridade. Finalmente, três isolados com perfis idênticos, todos de áreas cultivadas, dois deles provenientes da mesma área, foram agrupados no GG XI (FIGURA 10, TABELA 1).

Pode-se concluir, portanto, que a diversidade genética constatada na análise por *rep*-PCR foi bastante elevada, uma vez que 81,3% dos isolados dos Cerrados apresentaram perfis únicos de BOX-PCR e foram agrupados em um nível final de similaridade bastante baixo, de apenas 31,5%. Além disso, todos os GGs reuniram isolados de diferentes áreas. Contudo, em alguns GGs foi constatada uma predominância de isolados de áreas cultivadas ou não cultivadas, o que fica particularmente evidenciado nos GGs reunindo maior número de isolados (igual ou superior a seis perfis). Como exemplo, nos GGs I e IV houve uma predominância de isolados de áreas cultivadas, enquanto nos GGs II e VI predominaram isolados de áreas não cultivadas (TABELA 6).

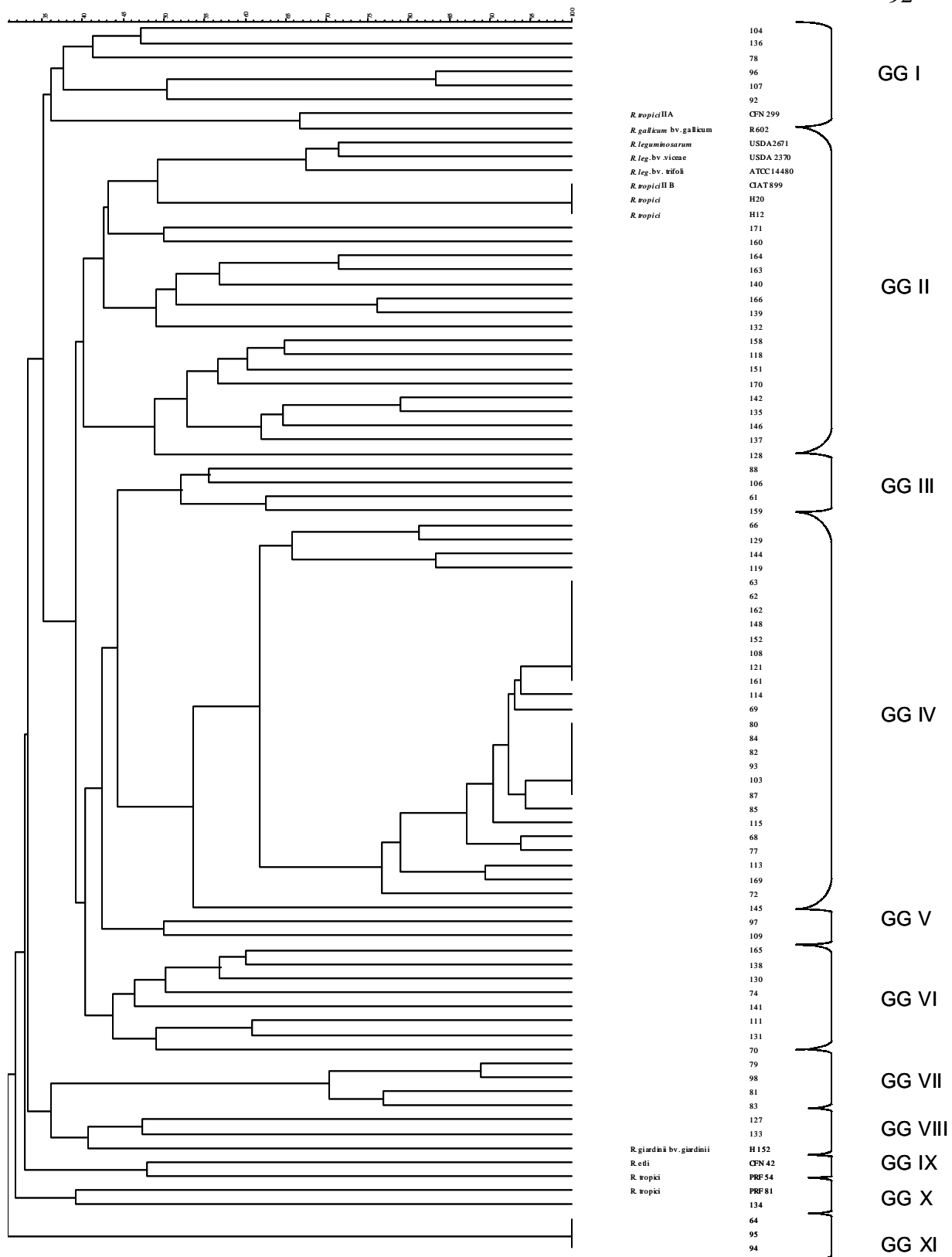


FIGURA 10. Dendrograma construído com 73 isolados dos Cerrados e com estirpes utilizadas como referência, obtido pela análise de agrupamento dos produtos de amplificação da reação por BOX-PCR, com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard.

TABELA 6. Distribuição dos isolados dos Cerrados, provenientes de áreas cultivadas ou não cultivadas anteriormente, segundo a distribuição em grandes grupos (GG) no dendrograma obtido na análise dos produtos de BOX-PCR¹.

GG ¹	Número total	Áreas cultivadas		Áreas não cultivadas	
		Número	Porcentagem	Número	Porcentagem
I	6	5	83,3	1	16,7
II	17	1	5,9	16	94,1
III	4	3	75,0	1	25,0
IV	28	19	67,9	9	32,1
V	2	2	100,0	0	0,0
VI	8	3	37,5	5	62,5
VII	4	4	100,0	0	0,0
VIII	2	0	0,0	2	100,0
IX	0	0	0,0	0	0,0
X	1	0	0,0	1	100,0
XI	3	3	100,0	0	0,0
Total	75	40		35	

¹Conforme identificado na FIGURA 10.

A diversidade de perfis de LPS e BOX-PCR fica ainda mais evidenciada quando ambos os perfis são comparados (TABELA 5). Os isolados apresentando perfil de LPS I foram posicionados nos seguintes GGs de BOX-PCR: GG I, III, XI, nove isolados no GG IV e três no VII. No perfil de LPS II foram encontrados isolados agrupados nos GG II, IV e VI, enquanto isolados mostrando o perfil de LPS III foram distribuídos nos GG III e IV. Finalmente, isolados mostrando perfis de LPS V e VII foram posicionados no GG I, enquanto os de perfil de LPS VI agruparam no GG VI. Todos esses isolados são provenientes de áreas sob cultivo.

Por outro lado, nos perfis de LPS X a XV foram posicionados exclusivamente isolados de áreas não cultivadas, contudo, em nenhum desses agrupamentos de LPS os isolados apresentaram perfis posicionados em um único GG de BOX-PCR.

Maior diversidade de origem dos isolados foi encontrada entre os isolados de perfil de LPS IX, provenientes de áreas cultivadas com leguminosas e áreas não cultivadas e que foram agrupadas nos GGs II, IV e V e, principalmente, no perfil de LPS IV, com isolados dos três tipos de manejo e posicionados nos GGs I, II, III, IV, V, VI, VII e XI.

Conseqüentemente, vários isolados mostrando perfis de LPS idênticos foram muito distintos quanto ao perfil de BOX-PCR.

Do mesmo modo, isolados agrupados no mesmo GG foram, freqüentemente, muito distintos quanto ao perfil de LPS, por exemplo, os seis isolados do GG I apresentaram cinco perfis distintos de LPS. Mais intrigante ainda foi a análise dos três únicos agrupamentos de isolados apresentando perfis de BOX-PCR idênticos. No primeiro agrupamento, no GG IV, dois isolados (62 e 63) provenientes da área 1 apresentaram perfis de LPS idênticos. Dois outros pares de isolados apresentaram mesmo perfil de LPS: 148 e 152, perfil IV e 121 e 161, perfil X, enquanto os últimos dois isolados, 108 e 162, apresentaram perfis de LPS distintos, IX e XV, respectivamente. No segundo agrupamento de isolados com perfis de BOX-PCR idênticos, três isolados, 80, 82 e 84 vieram da mesma área (4) e apresentaram perfis de LPS idênticos (I), mas os demais três isolados apresentaram perfis distintos e foram obtidos em áreas diferentes. Finalmente, dos três últimos isolados com perfis de BOX-PCR idênticos, no GG XI, dois foram obtidos na área 6 e apresentaram perfil de LPS IV, mas o outro foi isolado da área 1 e apresentou o perfil de LPS I. Conseqüentemente, dos 75 isolados analisados quanto aos perfis de LPS e BOX-PCR, 71 deles (94,7% dos isolados) apresentaram combinações únicas de perfis.

1.3. Índices de diversidade obtidos para as populações dos Cerrados

Alguns índices de diversidade foram calculados para as populações dos três manejos distintos, áreas cultivadas com leguminosas (áreas 1, 2, 4, 5 e 7 da Tabela 4), áreas cultivadas sem leguminosas (áreas 3, 6, 8, 9 e 10) e áreas nunca cultivadas, com diferentes vegetações dos Cerrados (áreas 11 a 20). Esses índices foram calculados considerando tanto os perfis de LPS (TABELA 7), como os de *rep*-PCR (TABELA 8).

TABELA 7. Índices de diversidade, estimados pelos perfis de lipopolissacarídeos, de isolados dos Cerrados provenientes de áreas sob manejos distintos¹.

Índice de diversidade	Áreas cultivadas com leguminosas	Áreas cultivadas sem leguminosas	Áreas não cultivadas
Shannon tradicional	1.120 ¹ (0.137) ²	1.754 ¹ (0.150) ²	1.936 ¹ (0.069) ²
Shannon modificado	1.153 (0.137)	2.012 (0.233)	1.990 (0.080)
Riqueza genética (ACE)	4.0 (0.0)	13.0 (5.6)	8.3 (0,7)
Perfis observados	4	8	8
Perfis esperados em um levantamento futuro	0.0 (0.0)	7.7 (8.7)	1.0 (1.5)

¹Parâmetros definidos: m=1000 (tamanho da amostragem) e k=4 (valor de corte, “cut-off”).

²Erro padrão da média apresentado entre parênteses.

TABELA 8. Índices de diversidade, estimados pelos perfis de BOX-PCR, de isolados dos Cerrados provenientes de áreas sob manejos distintos¹.

Índice de diversidade	Áreas cultivadas com leguminosas	Áreas cultivadas sem leguminosas	Áreas não cultivadas
Shannon tradicional	1.855 ¹ (0.252) ²	2.231 ¹ (0.188) ²	3.090 ¹ (0.113) ²
Shannon modificado	2.693 (0.718)	2.863 (0.445)	4.063 (0.441)
Riqueza genética (ACE)	85.8 (92.6)	45.3 (24.6)	121.5 (58.8)
Perfis observados	10	13	26
Perfis esperados em um levantamento futuro	0 (0,0)	18 (12,8)	65.6 (37.6)

¹Parâmetros definidos: m=1000 (tamanho da amostragem) e k=4 (valor de corte, “cut-off”).

²Erro padrão da média apresentado entre parênteses.

Os índices de Shannon obtidos para LPS indicam maior diversidade em áreas não cultivadas, seguidas das áreas cultivadas sem leguminosas, sendo consideravelmente inferior nas áreas cultivadas com leguminosas (TABELA 7). Considerando os perfis de *rep*-PCR, a maior diversidade e riqueza genética em áreas não cultivadas foi ainda mais

evidenciada. Além disso, os índices de Shannon estimados com base nos produtos de rep-PCR também foram superiores nas áreas cultivadas sem leguminosas, quando comparados com as áreas com leguminosas (TABELA 8). Finalmente, a maior diversidade também foi evidenciada pelo número elevado de novos perfis de rep-PCR esperados em um próximo levantamento em áreas nativas (TABELA 8).

Quando os coeficientes de similaridade entre as comunidades de microsimbiontes do feijoeiro isolados dos Cerrados foram estimados considerando os perfis de LPS e de BOX-PCR, houve baixa similaridade entre todas as combinações, com os valores mais elevados encontrados na comparação entre áreas cultivadas com leguminosas e áreas cultivadas sem leguminosas. Para os perfis de LPS, a menor similaridade foi observada entre áreas não cultivadas e áreas cultivadas com leguminosas, enquanto que para BOX-PCR valores baixos foram constatados entre áreas não cultivadas e áreas cultivadas com ou sem leguminosas (TABELA 9).

1.4. Seqüenciamento, nos isolados dos Cerrados, da região do DNA que codifica o gene 16S rRNA

Os isolados apresentando perfis de LPS e BOX-PCR únicos passaram a ser denominados de estirpes. A seguir, foi realizado o seqüenciamento parcial de 45 estirpes, escolhidas a partir dos agrupamentos de LPS e rep-PCR (FIGURA 11). Nessa análise, foi possível dividir as estirpes em dois grandes grupos (GGs). O GG I reuniu 32 estirpes em um nível de similaridade de 76,1%, podendo ainda ser divididas em quatro subgrupos (SGs). O SG IA agrupou as estirpes 111 e 107, ambas obtidas de áreas cultivadas sem leguminosa, em um nível de similaridade de 87,4%. O SG IB incluiu 19 estirpes dos Cerrados, 14 das quais provenientes de áreas nunca cultivadas, que foram agrupadas com *Burkholderia* sp. estirpe BR 3470, com uma similaridade de 90,9%; das demais cinco estirpes desse SG, três foram isoladas de áreas com leguminosas e duas de áreas sem leguminosas. No SG IC foram posicionadas sete estirpes agrupadas em um nível de similaridade de 97,9%, juntamente com *Burkholderia* sp. Hpud12.1; esse agrupamento, por sua vez, se uniu, em um nível de similaridade de 94,9%, com as estirpes TJ 182 de *Burkholderia* sp., CaD1MT de *B. graminis* e ATCC 53867^T de *B. cepacia*. A estirpe 96, de

área cultivada com cevada e milho, se uniu aos SGs IA, IB e IC com uma similaridade de 81,7%. Finalmente, três outras estirpes isoladas de três áreas cultivadas distintas foram agrupadas com uma similaridade de 85,0% (FIGURA 11). Conseqüentemente, o GG I agrupou estirpes dos Cerrados, a maioria (65,6%) isolada de áreas não cultivadas, mostrando maior similaridade de seqüências do 16S rRNA com bactérias do gênero *Burkholderia*,

TABELA 9. Coeficientes de similaridade, não ajustados e ajustados, entre as populações de microssimbiontes do feijoeiro isolados de áreas dos Cerrados sob três manejos distintos: não cultivadas, cultivadas com leguminosas mas não com feijoeiro e cultivadas com não leguminosas.

Similaridade entre as comunidades	Não ajustado	Ajustado
Perfis de lipopolissacarídeos		
Área cultivada x não cultivada	0.1805	0.3058
Cultivada com leguminosa. x cultivada sem leguminosa	0.4931	0.6605
Cultivada sem leguminosa. x não cultivada	0.2163	0.3557
Cultivada com leguminosa. x não cultivada	0.0781	0.1449
Produtos de rep-PCR		
Área cultivada x não cultivada	0.1807	0.3336
Cultivada com leguminosa. x cultivada sem leguminosa	0.3564	0.5979
Cultivada sem leguminosa. x não cultivada	0.1587	0.2910
Cultivada com leguminosa. x não cultivada	0.1633	0.2990

16S rRNA

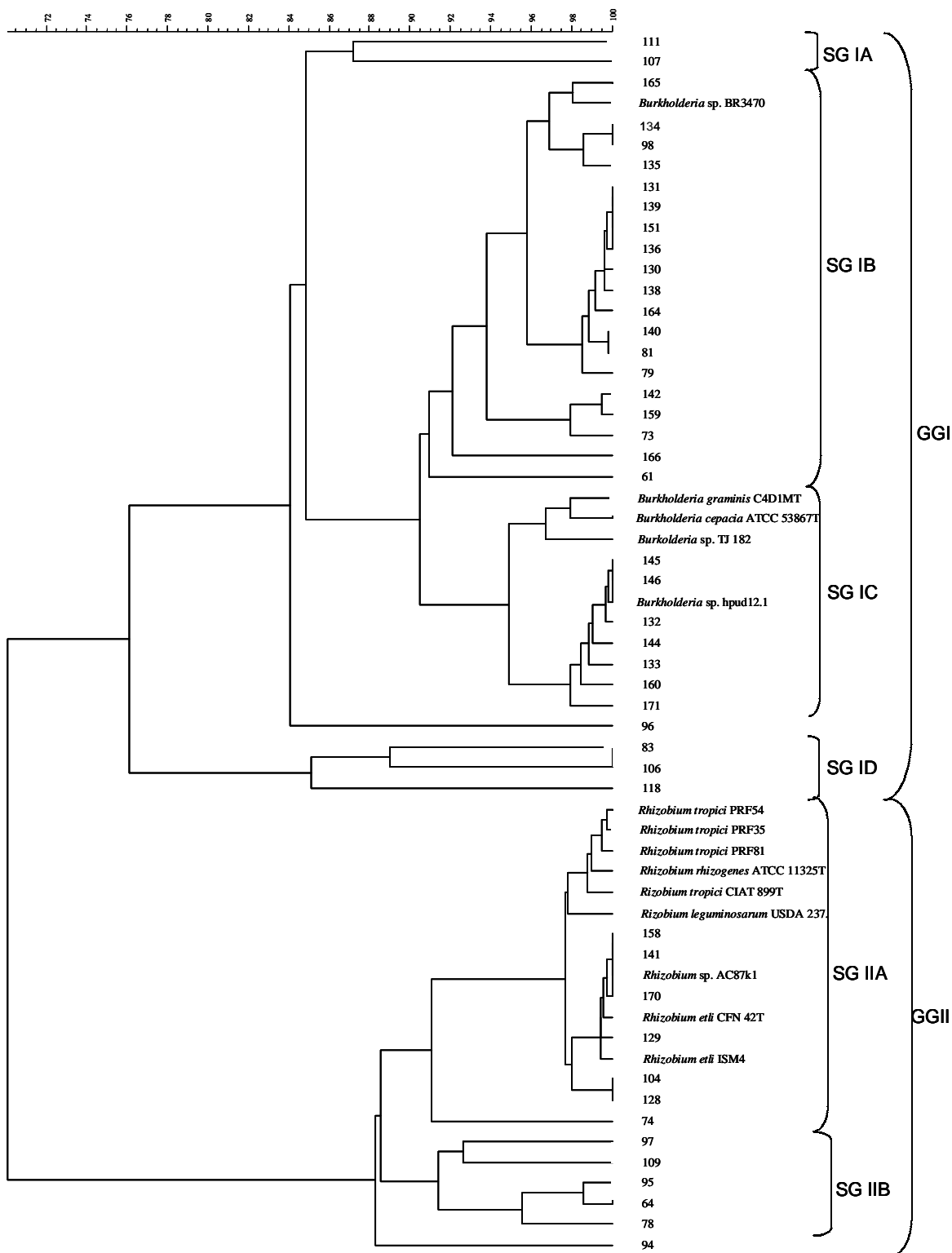


FIGURA 11. Dendrograma construído utilizando o algoritmo UPGMA e as seqüências alinhadas do gene 16S rRNA de 45 estirpes microssimbiontes do feijoeiro isoladas de solos dos Cerrados e de estirpes utilizadas como referência.

O GG II da análise do 16S rRNA agrupou 13 estirpes dos Cerrados com estirpes utilizadas como referência das espécies capazes de nodular o feijoeiro, em um nível final de similaridade de 88,5%, podendo ser dividido em dois subgrupos. No SG IIA, seis estirpes agruparam em um nível de 97,6% com: *R. tropici* PRF 54, *R. tropici* PRF 35, *R. tropici* PRF 81, *R. tropici* CIAT 899^T, *R. leguminosarum* USDA 2370^T, *R. rhizogenes* ATCC 11325^T, *Rhizobium* sp. AC87k1, *Rhizobium etli* CFN 42^T e *R. etli* ISM4. Nesse mesmo SG foi posicionada a estirpe 74, agrupando em um nível de 90,8% de similaridade. No SG IIB foram agrupadas cinco estirpes em um nível de 91,9% de similaridade, todas obtidas de solos cultivados. Finalmente, a estirpe 94 se uniu ao GG II em um nível de similaridade de 88,2% (FIGURA 11). Ao contrário do GG I, no GG II houve uma predominância (61,5%) de estirpes provenientes de áreas cultivadas e apresentando maior similaridade de bases com estirpes de referência do gênero *Rhizobium*.

1.5. Capacidade de nodulação e fixação de N₂ dos isolados dos Cerrados

Na TABELA 10 fica evidenciado que a maior diversidade das estirpes de solos cobertos com vegetação nativa não correspondeu a uma maior eficiência de FBN. Nessas áreas não cultivadas, o número de nódulos não diferiu daquele observado nas duas áreas cultivadas. Contudo, os nódulos formados eram pequenos e de menor massa, resultando em que a massa nodular nas áreas cultivadas fosse, em média, 68% superior do que na área sob vegetação nativa. Em relação aos parâmetros de massa e N total acumulado na parte aérea, não houve diferença entre as áreas cultivadas com e sem leguminosas, contudo, em média, constatou-se superioridade de 113% na MPAS e de 123% no NTPA em relação à área virgem dos Cerrados. A eficiência nodular também foi inferior nos solos virgens, com o fornecimento médio de 0,270 mg N mg⁻¹ nódulo, com incrementos para 0,359 e 0,350 mg N mg⁻¹ nódulo nas áreas cultivadas sem e com leguminosas, respectivamente. Desse modo, com a introdução da agricultura nesses solos, ocorreu uma seleção de estirpes com maior capacidade de FBN.

TABELA 10. Nodulação (número, NN e massa de nódulos secos, MNS), massa da parte aérea seca (MPAS) e N total acumulado na parte aérea (NTPA) de feijoeiro, cultivar Carioca, inoculado com 93 isolados de áreas cultivadas e não cultivadas dos Cerrados¹. Ensaio conduzido em condições axênicas de casa de vegetação, cada estirpe foi inoculada individualmente, com três repetições e as plantas foram coletadas no florescimento.

Parâmetros	Não cultivada		Cultivadas sem leguminosas		Cultivadas com leguminosas	
NN (n° pl ⁻¹)	187,4	± 42,1	186,4	± 38,2	158,1	± 37,2
MNS (mg pl ⁻¹)	141,2	± 33,1	231,8	± 69,4	244,7	± 71,3
MPAS (g pl ⁻¹)	1,50	± 0,62	3,16	± 0,52	3,22	± 0,36
NTPA (mg N pl ⁻¹)	38,0	± 11,5	83,9	± 13,1	85,7	± 11,5
EN (mg N mg ⁻¹ nódulo)	0,270	± 0,029	0,359	± 0,031	0,350	± 0,030

¹Isolados descritos na TABELA 1.

²Os dados representam as médias e os erros padrões das média (±) para cada grupo de manejo: dez áreas sob vegetação nativa dos Cerrados, cinco áreas de cultivo com não leguminosas e cinco áreas de cultivo com leguminosas (mas não feijoeiro).

Estudo 2

2. Estudo de genes de nodulação e fixação de N₂ de *Rhizobium etli*

Este estudo foi conduzido em continuação a um levantamento realizado previamente com populações de rizóbios microssimbiontes do feijoeiro isolados de dois ecossistemas brasileiros contrastantes: o Nordeste, na Zona da Mata de Pernambuco, com clima semi-árido e solos alcalinos e a Região Sul, no Paraná, com clima úmido subtropical e solos ácidos (Grange & Hungria, 2004). Diversas estirpes isoladas por Grange & Hungria (2004) foram com base na análise de RFLP-PCR da região do DNA que codifica o gene 16S rRNA, seguida pelo seqüenciamento de algumas estirpes representantes do grupo apresentando o mesmo padrão de restrição de enzimas, na espécie *R. etli*. Neste segundo estudo, foram selecionadas 43 estirpes classificadas como *R. etli* por Grange & Hungria (2004) para serem submetidas, inicialmente, à análise de RFLP-PCR das regiões do DNA (plasmidial) que codificam os genes *nodA*, *nodB* e *nodC* e *nifH*.

Nas Figuras 12, 13, 14 e 15 podem ser visualizados alguns produtos de PCR obtidos pela amplificação com os “primers” que codificam para as regiões dos genes *nodA* (*nodA1/nodA3* aproximadamente 660 pb), *nodB* (aproximadamente 600), *nodC* (aproximadamente 930 bp) e *nifH* (entre 780 e 890 pb), respectivamente. Os fragmentos obtidos para as 43 estirpes de *R. etli*, bem como de diversas estirpes utilizadas como referência foram submetidos à técnica de RFLP-PCR com as seguintes enzimas de restrição: *Hha* I, *Hae* III, *Mbo* II, *Msp* I, *Hinf* I, *Rsa* I. A avaliação do polimorfismo molecular foi realizada com cada uma das enzimas e, também, com todas as enzimas. Além disso, foi realizada a análise para cada região gênica e para todas as regiões gênicas estudadas.



FIGURA 12. Produtos de PCR correspondents ao gene *nodA* de algumas estirpes brasileiras de *R. etli*.



FIGURA 13. Produtos de PCR correspondents ao gene *nodB* de algumas estirpes brasileiras de *R. etli*.



FIGURA 14. Produtos de PCR correspondents ao gene *nodC* de algumas estirpes brasileiras de *R. etli*.

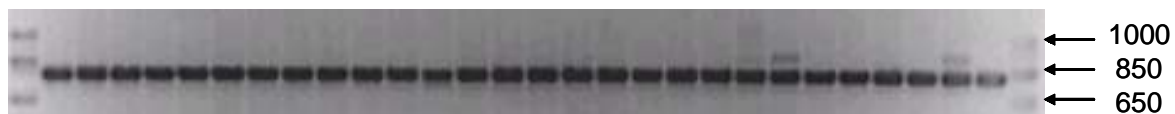


FIGURA 15. Produtos de PCR correspondents ao gene *nifH* de algumas estirpes brasileiras de *R. etli*.

2.1. Análise polifásica do perfil de PCR–RFLP da região que codifica o gene *nodA*

O dendrograma obtido pela análise de PCR–RFLP da região que codifica o gene *nodA* com seis enzimas de restrição mostra que as estirpes agruparam em um nível final de similaridade de 32,6% (FIGURA 16). Foi possível, ainda, dividir o agrupamento em três grandes grupos (GGs). O GG I reuniu 15 estirpes em um nível de similaridade de 37,4% e incluiu exclusivamente estirpes utilizadas como referências das espécies *R. giardinii* e principalmente, *R. tropici*, com ênfase para um grupo de nove estirpes que, incluindo a CIAT 899, se uniram com uma similaridade de 60,3%. Nesse GG I foram posicionadas, também, quatro estirpes do estudo de Grange & Hungria (2004), duas que apresentaram maior similaridade de bases do 16S rRNA com *Sinorhizobium* sp. (estirpes 129 e 215), e a estirpe 84 e 100, distinta de todas as espécies de rizóbios descritas e, portanto, classificadas como *Rhizobium* sp.

O GG II foi formado por 42 das 43 estirpes de *R. etli* deste estudo e duas estirpes de referência da espécie *R. etli*, com uma similaridade final de 65,5%, mas claramente dois subgrupos (SGs) puderam serem visualizados. No SG IIA foram agrupadas dez estirpes de *R. etli*, cinco provenientes do Paraná e cinco de Pernambuco, juntamente com a estirpe-tipo de *R. etli* CFN 42 e a estirpe ATCC 8002, isolada na Europa, previamente classificada como *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e, agora, reclassificada como *R. etli* (Münchbach et al., 1999); o nível final de similaridade nesse SG IIA foi de 67,7%. O SG IIB incluiu as outras 32 estirpes de *R. etli* deste estudo, em um nível de similaridade de 68,8%. Também não foi observada, nesse SG, maior similaridade entre estirpes do Paraná ou de Pernambuco, bem como se isoladas de uma cultivar de grãos de cor (Aporé) ou preta (Negro Argel). A estirpe de *R. etli* 28, isolada de São Francisco, em Pernambuco, se uniu ao GG II em 50,5% de similaridade, enquanto *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* USDA 2671 foi agrupada com uma similaridade final de 43,2%. O GG III agregou as três estirpes de *R. etli* oriundas da Espanha (ISP 19, 23, 34), com 59,2% de similaridade. Finalmente, a estirpe H 129 de *Rhizobium* sp., utilizada como referência, foi unida aos demais grupos (FIGURA 16).

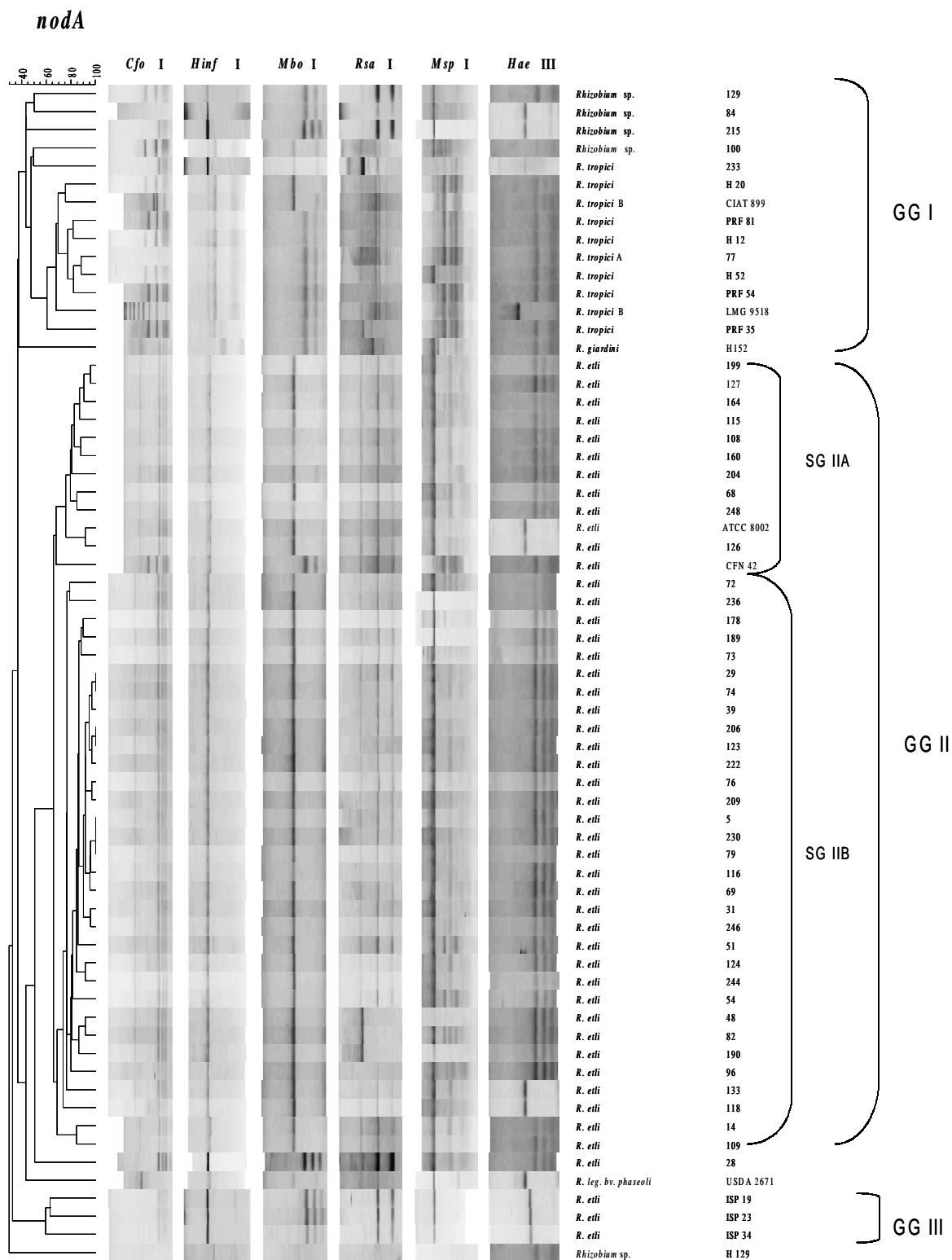


FIGURA 16. Dendrograma obtido pela análise por RFLP-PCR da região gênica do *nodA* com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J).

2.2. Análise polifásica do perfil de PCR–RFLP da região que codifica o gene *nodB*

Quando a região gênica correspondente ao *nodB* foi analisada por RFLP-PCR, também com seis enzimas de restrição, as estirpes foram agrupadas em um nível final de similaridade de 29,2% (FIGURA 17). Contudo, o dendrograma pode ser dividido em cinco GGs. O GG I agrupou, em 50,0% de similaridade, 42 das 43 estirpes de *R. etli* deste estudo (exceto a 204), juntamente com a estirpe-tipo CFN 42 e *R. leguminosarum* bv. phaseoli USDA 2671. Além disso, a maioria das estirpes brasileiras de *R. etli* (35 estirpes) foi posicionada em três subgrupos (SG IA, SG IB, SG ID) do GG I, unidos em 66,5% de similaridade, e bastante distintos das estirpes de referência. O SG ID compreende três estirpes de *R. etli*, 108, 109 e 14 com 58,8% de similaridade. Não houve agrupamento preferencial das estirpes de *R. etli* segundo o local de isolamento ou a cultivar utilizada como planta-isca. No GG II foram posicionadas todas as estirpes de *R. tropici*, destacando que os genes *nodB* dessa espécie são distintos. O GGIII está representado pela *R. etli* 204 agrupada com a *R. etli* ATCC 8002. O quarto GG foi composto por apenas duas estirpes de *Rhizobium* sp. unidas em 61,6% de similaridade. Finalmente, o GG V incluiu seis estirpes, os três *R. etli* originários da Espanha e três estirpes de *Rhizobium* sp., todas unidas em um baixo nível de similaridade, de apenas 37,3% (FIGURA 17).

2.3. Análise polifásica do perfil de PCR–RFLP da região que codifica o gene *nodC*

Na FIGURA 18 são mostrados os resultados referentes ao RFLP-PCR da região do *nodC*.

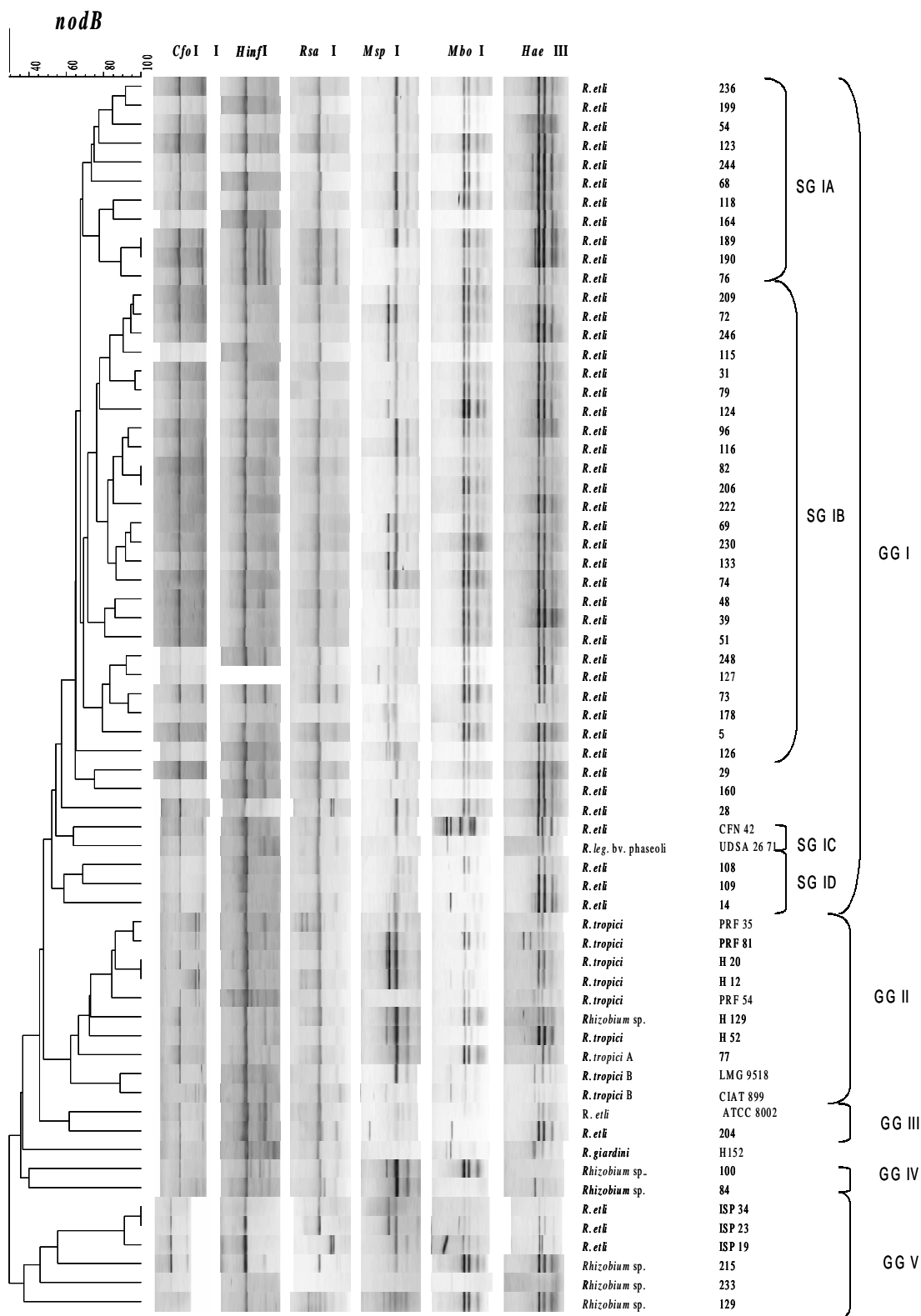


FIGURA 17. Dendrograma obtido pela análise por RFLP-PCR da região gênica do *nodB* com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J).

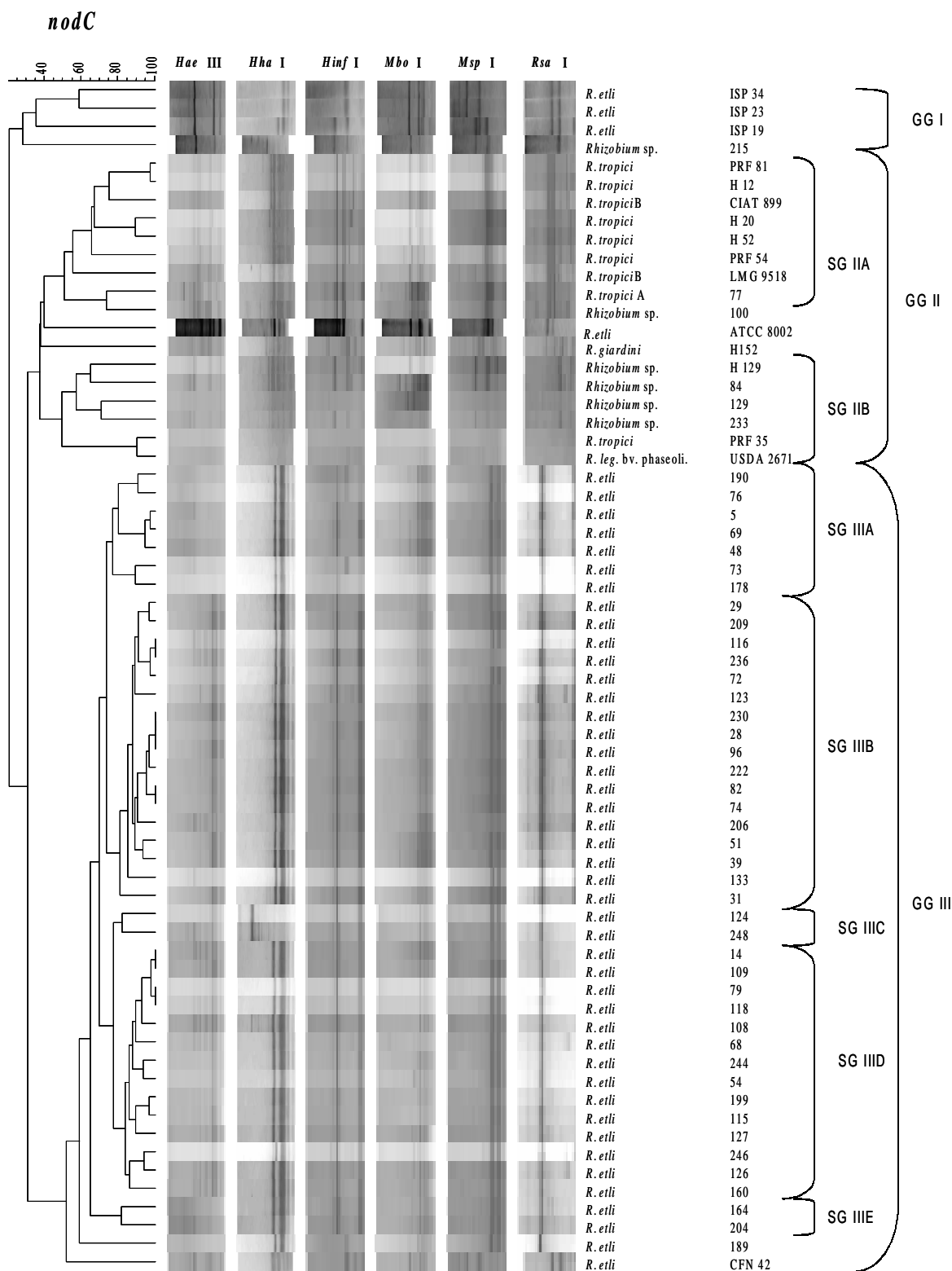


FIGURA 18. Dendrograma obtido pela análise por RFLP-PCR da região gênica do *nodC* com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J).

Três grande grupos foram formados na análise da região do *nodC*, unidos em um nível final de similaridade de 27,3%. O GG I foi claramente distinto dos demais, agrupando as três estirpes de *R. etli* da Espanha (ISP 19, 23, 34), unidas à estirpe 215 de *Rhizobium* sp. ao nível final de similaridade do estudo, de 27,3%. O GG II uniu estirpes bastante heterogêneas, podendo ser subdividido em SG IIA e SG IIB. Todas as estirpes de *R. tropici* foram posicionadas no GG II, bem como representantes de *Rhizobium* sp., *R. giardinii* e *R. etli* estirpe ATCC 8002, previamente classificada como *R. leguminosarum*. Todas as 43 estirpes de *R. etli* do Brasil foram posicionadas no GG III, e cinco SGs foram definidos nesse grande grupo, contudo, mais uma vez as estirpes em cada SG são originárias dos dois ecossistemas brasileiros, sendo um forte indicativo de que esse grupo de estirpes tem ampla distribuição no território nacional. As estirpes de *R. etli* do Brasil foram agrupadas com uma similaridade de 58,6% e a estirpe-tipo CFN 42 se uniu a esse grupo em um nível de 51,5% de similaridade (FIGURA 18).

2.4. Análise polifásica do perfil de PCR-RFLP das regiões que codificam os genes *nodA*, *nodB* e *nodC*

Quando os produtos das três regiões de nodulação foram analisados conjuntamente, a diferenciação entre os grupos de estirpes foi evidenciada (FIGURA 19). Cinco subgrupos puderam ser visualizados e as estirpes foram unidas em um grau final de similaridade de 29,8% (FIGURA 19). O SG I uniu três estirpes provisoriamente classificadas como *Rhizobium* sp. Todas as demais estirpes de *R. tropici* formaram o SG II, com 49,4% de similaridade, ao qual se uniram duas outras estirpes. O SG III agrupou todos os isolados de *R. etli*, com 60,8% de similaridade unindo à estirpe-tipo CFN 42 com uma similaridade baixa de 57,7%. O *R. giardinii* e a estirpe USDA 2671 de *R. leguminosarum* bv. phaseoli formaram o SG IV (41,8% de similaridade). Finalmente, foi diferenciado o agrupamento das três estirpes de *R. etli* da Espanha, agrupadas com 62,3% de similaridade no SG V, e a elas se uniu *Rhizobium* sp. estirpe 215 (FIGURA 19).

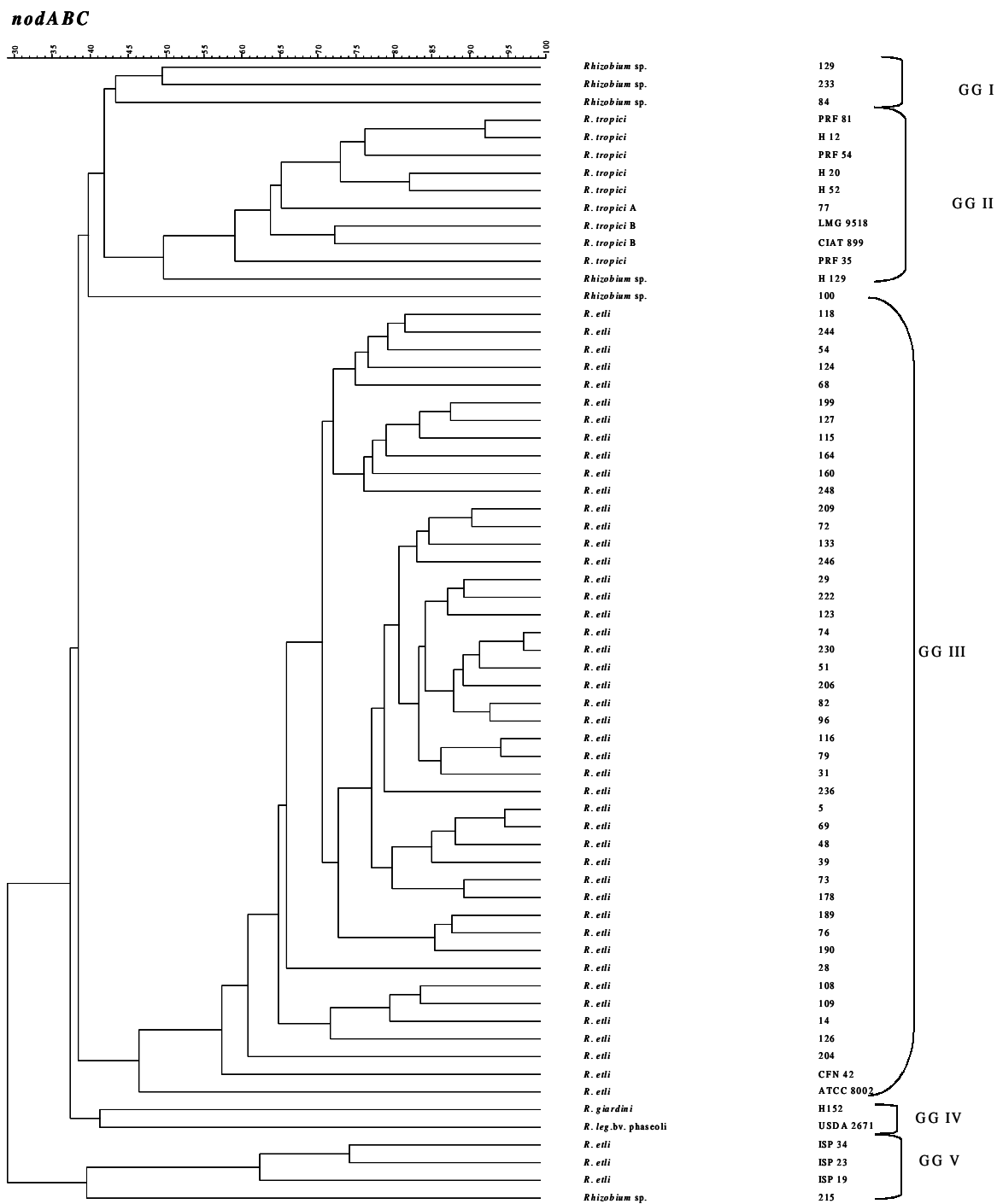


FIGURA 19. Dendrograma obtido pela análise por RFLP-PCR das regiões gênicas dos *nodA*, *nodB* e *nodC* com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J).

2.5. Análise polifásica do perfil de PCR-RFLP da região que codifica o gene *nifH*

A análise dos perfis obtidos para a região do *nifH* revelou três GGs, que também puderam ser subdivididos em SGs, unidos em um nível final de similaridade de 29,9% (FIGURA 20). O SG IA agrupou, em um nível de 53,0% de similaridade, as estirpes: *R. tropici* (77), *Rhizobium sp.* (215, 129) e *R. leguminosarum* (100). No SG IB, todas as estirpes encontradas são representantes de *R. tropici*, unidas em 63,0% de similaridade e a esse grupo se uniu *R. giardinii* (H 152), formando o GG I, unido em um nível de similaridade de 35,8%. O GG II agrupou, com 45,5% de similaridade, estirpes diversas: *R. etli* ATCC 8002 e CFN 42, bem como *R. etli* da Espanha (ISP 19, 23, 34), *R. tropici* (H 52, 233) e *Rhizobium sp.* (H 129). Mais uma vez, as estirpes brasileiras de *R. etli* ocuparam uma posição distinta das demais estirpes, formando o GG III, com uma similaridade de 61,8%. Dois subgrupos também puderam ser visualizados nesse grande grupo, com 14 estirpes posicionadas no SG IIIB, com 72,3% de similaridade e 29 outras no SG IIIB, com 77,0% de similaridade (FIGURA 20).

2.6. Análise polifásica do perfil de PCR-RFLP da região que codifica os genes *nodA*, *nodB*, *nodC* e *nifH*

O agrupamento polifásico de todas as regiões que codificam os genes de *nodABC* e o gene *nifH* (FIGURA 21) não foi muito distinto daquele observado somente com os genes *nod* (FIGURA 19). Verificou-se a formação de três grandes grupos (GGs), onde o grupo GG I apresentou um subgrupo especial. O SG IA reuniu todos os *R. tropici*, exceto a estirpe 233, em um nível de similaridade 59,1%. Ainda neste subgrupo foram incluídos as *Rhizobium sp.* H129 e 84 ao nível de 50,8% de similaridade (FIGURA 21).

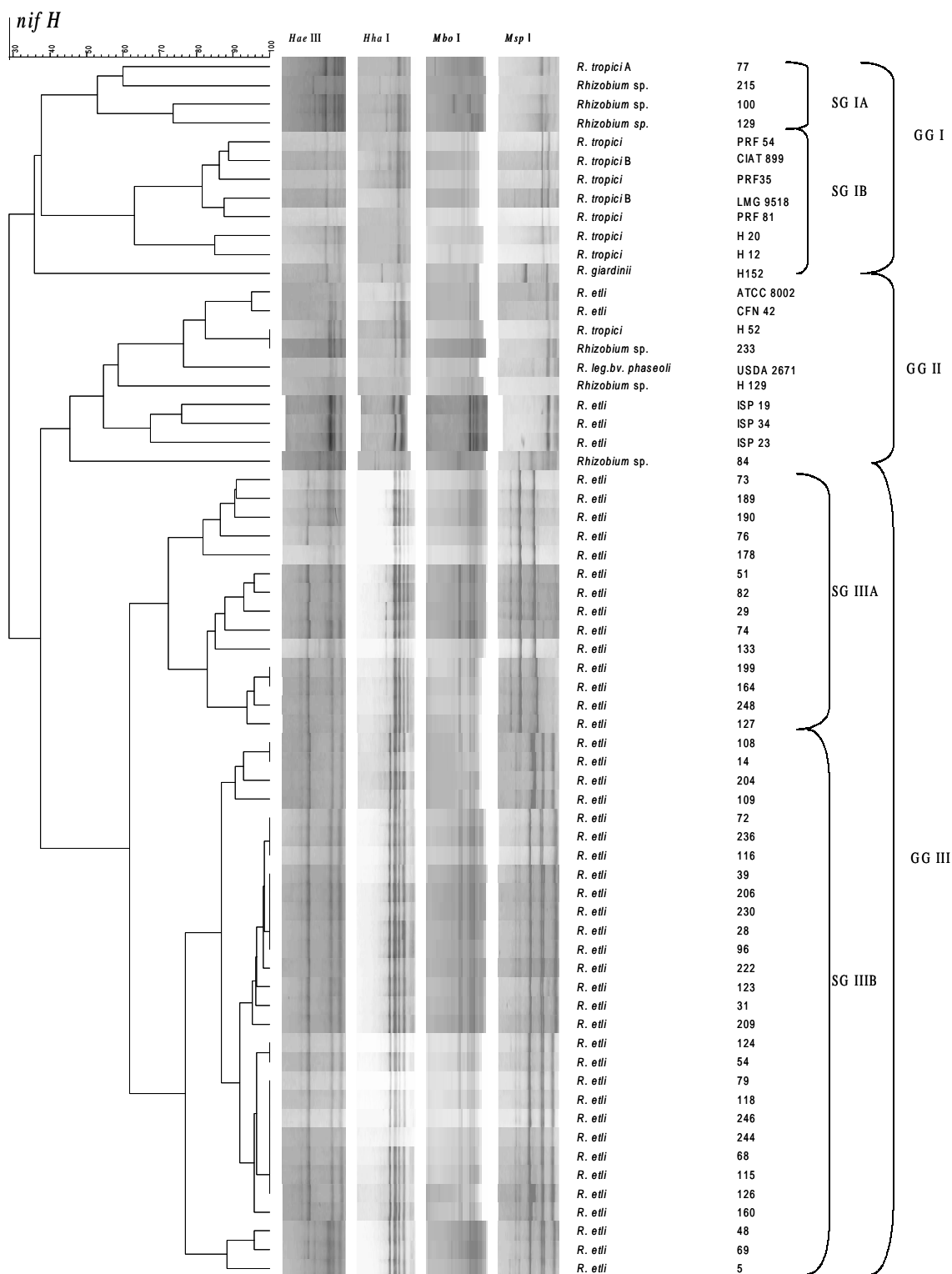


FIGURA 20. Dendrograma obtido pela análise por RFLP-PCR da região do *nifH* com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J).

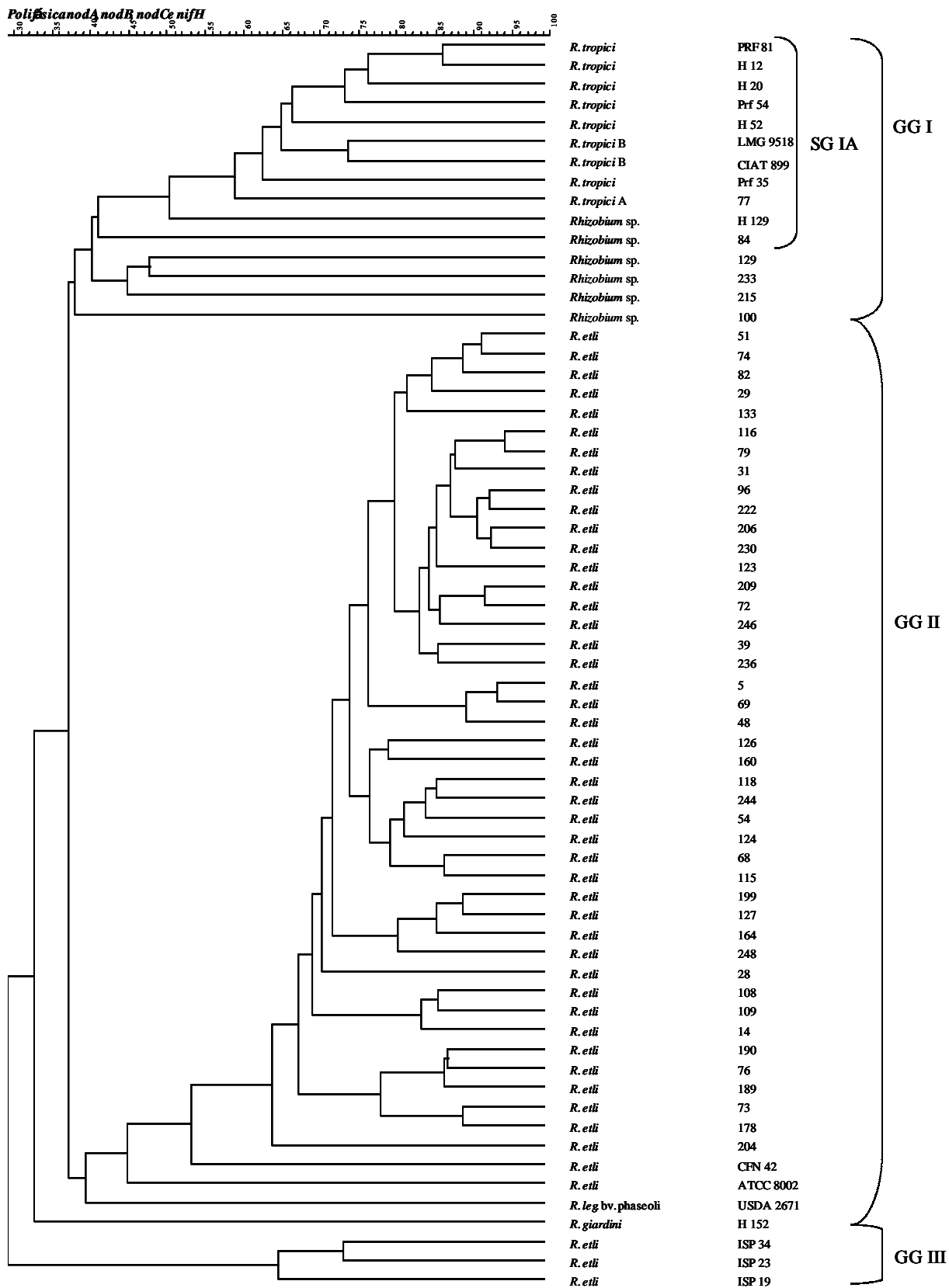


FIGURA 21. Dendrograma obtido pela análise por RFLP-PCR das regiões gênicas dos *nodA*, *nodB*, *nodC* e *nifH* com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J).

O GG II apresentou estirpes representantes de *R. etli* em um nível de similaridade de 64,5%. Nesse mesmo grupo, foram incluídos *R. etli* estirpes CFN 42e ATCC 8002 e *R. leguminosarum* bv. phaseoli (USDA 2671) em níveis de similaridade de, respectivamente, 53,2%, 44,1% e 39,3%. Agrupou-se aos GG I e II em um nível de similaridade de 37,0%, *R. giardinii* (H 152). Finalmente, as estirpes de *R. etli* (ISP 19, 23, 34) foram agrupadas no GG III, apresentando similaridade de 64,5% (FIGURA 21).

IV. Discussão

Estudo 1

Diversidade de bactérias capazes de nodular o feijoeiro nos Cerrados

O ecossistema dos Cerrados é formado por solos que se encontram em um estágio avançado de intemperização, em geral com boas propriedades físicas, mas que apresentam grande heterogeneidade espacial e se caracterizam pelo baixo teor de nutrientes, acidez e, freqüentemente, níveis tóxicos de alumínio. O ecossistema é, ainda, afetado por uma sucessão de ciclos bioclimáticos (períodos mais secos e mais úmidos) e pela presença de incêndios espontâneos (Queiroz Neto, 1982; Lopes, 1983). Em resposta a esses fatores, encadearam-se processos evolutivos que resultam em abundante diversidade genética (plantas, animais e microrganismos) para buscar maiores adaptações aos fatores de estresse e pressão seletiva ambiental. Desta forma, todos os recursos são eficientemente (re)utilizados para a manutenção do equilíbrio ambiental (Lopes, 1983).

A região dos Cerrados foi considerada área marginal para a agricultura devido à baixa fertilidade natural, sendo considerada incapaz de atender às exigências nutricionais das espécies domesticadas e utilizadas na agricultura. Contudo, com o advento da tecnificação agrícola na década de 1960, o processo de ocupação dos Cerrados foi intensificado, de forma que, hoje, a região contribui com mais de 25% da produção de alimentos no Brasil (Embrapa, 2005). Considera-se que os Cerrados representam a última fronteira agrícola do mundo e em expansão continua até os dias de hoje, razão pela qual o conhecimento do solo, com ênfase na biota ali residente é estratégico para o estabelecimento de práticas de manejo adequadas, visando a manutenção das propriedades físicas, a melhoria da fertilidade e a conservação da biodiversidade. Esses são os critérios para a condução de uma agricultura sustentável e economicamente viável (Souza & Lobato, 2002).

De maneira geral, a intensificação da agricultura afeta as propriedades químicas e físicas do solo e, em consequência, a atividade biológica (por exemplo, Ferreira et al.,

2000; Kaschuk et al., 2005a,b). Alguns levantamentos indicam que áreas nativas dos Cerrados apresentam parâmetros com melhor relação com a sustentabilidade, como agregação e teor de carbono do solo, em relação às áreas de pastagens cultivadas, reflorestamento (*Eucalyptus* spp.) e culturas anuais (Alvarenga et al., 1999). Também há resultados mostrando que áreas nativas apresentam maior biomassa microbiana do solo e menor coeficiente metabólico, indicativo de maior eficiência dos microrganismos do solo, em comparação com áreas cultivadas (Alvarenga et al., 1999). As alterações nesses parâmetros indicam que, com a introdução da agricultura, pode ocorrer alterações na dinâmica da biota do solo que durante a evolução ambiental levam à priorização de certos sistemas biológicos, seja mutualísticos ou parasíticos (Kiers et al., 2002).

Neste trabalho, populações de bactérias diazotróficas microsimbiontes do feijoeiro foram utilizadas como modelo para avaliar tanto o impacto da introdução da agricultura nos Cerrados, como para elucidar os mecanismos de evolução dessas populações em resposta às pressões de manejo do solo. O feijoeiro, por sua natureza extremamente promíscua em relação aos rizóbios (Michiels et al., 1998), foi utilizado como planta-isca, na busca por microsimbiontes de áreas nunca cultivadas de Cerrados e de áreas cultivadas sem e com leguminosas, embora em nenhuma dessas áreas o próprio feijoeiro tenha sido cultivado (Embrapa arroz e feijão, 2005). Além disso, há evidências de que a leguminosa é cultivada há 1.500-2.000 anos no Brasil (Freitas, 2001) o que, provavelmente, pode explicar a nodulação abundante que é sempre verificada em solos brasileiros, mesmo em áreas nas quais não há relatos recentes de cultivo com essa leguminosa (Hungria et al., 1997).

Com relação aos perfis de LPS dos isolados deste estudo, foi observada variabilidade elevada entre as 20 áreas analisadas, mas também foram detectadas diferenças relacionadas ao uso do solo, com efeito significativo do cultivo, especialmente com leguminosas. Os LPS representam um dos primeiros metabólitos que a bactéria produz para se estabelecer na rizosfera (Drozdowicz, 1999). Os genes envolvidos na produção de LPS são hipervariáveis, se encontram nos cromossomos e/ou nos plasmídeos crípticos, podendo sofrer modificações genéticas tradicionais, além de poderem ser adquiridos por transferência lateral (Martínez–Romero, 2005). Ambas partes da molécula de LPS, o polissacarídeo antígeno–O e o lipídeo–A, são consideradas determinantes simbióticos (Broughton et al., 2000).

Neste estudo, houve maior diversidade de perfis de LPS nas áreas nativas e nas áreas cultivadas sem leguminosas. Nas áreas nativas, os diversos exsudatos vegetais

provavelmente induziram à síntese e/ou modificação de LPS em diferentes rizóbios, mecanismos esses provavelmente necessários para a manutenção dos processos de infecção e formação de nódulos com as diversas espécies de leguminosas nativas. É possível que, nas áreas cultivadas sem leguminosas, os microssimbiontes atuem como endofíticos dessas plantas. O papel de rizóbios como endofíticos de não-leguminosas foi reconhecido há alguns anos (por exemplo, Yanni et al., 1997, 2001; Antoun et al., 1998) e tem despertado crescente atenção da pesquisa. Como exemplo, *R. etli* bv. *phaseoli* foi isolado como endofítico de milho, provavelmente atuando como promotor de crescimento e não como diazotrofo (Gutierrez-Zamora & Martínez-Romero, 2001). Contudo, não há ainda estudos sobre o papel dos LPS no estabelecimento endofítico dos rizóbios com essas plantas. Deve-se considerar, ainda, que, embora não tenham sido constatadas diferenças no número de perfis de LPS entre as áreas cultivadas sem leguminosas e as áreas nativas, houve variação qualitativa, pois os perfis encontrados foram distintos. Já nas áreas cultivadas com leguminosas foi constatada uma diminuição drástica no número de perfis de LPS, em geral ocorrendo um único perfil por área. Esses resultados indicam que a presença de uma leguminosa hospedeira seleciona um determinado grupo de bactérias cuja produção específica de um tipo de LPS deve facilitar a infecção e nodulação dessas leguminosa. Além disso, qualitativamente, os perfis das áreas com leguminosas (exceto o perfil IV) diferiram daqueles encontrados em áreas com vegetação nativa.

Desse modo, os resultados encontrados neste estudo propõem que, como resultado do estabelecimento de sistemas agrícolas em uma determinada área, ocorrem reestruturações gênicas envolvidas na produção de LPS, que vão sendo selecionadas para garantir a ocupação efetiva das raízes das leguminosas que passam a ser cultivadas, ou para a ocupação endofítica de não-leguminosas. As alterações genéticas e/ou processos de seleção nas comunidades bacterianas, levando à diferenciação da estrutura gênica até um novo equilíbrio genético, seriam mais drásticas quando visassem interações mais específicas, como é o caso da simbiose com leguminosas. De fato, leguminosas têm sido apontadas como mediadoras em processos evolutivos da simbiose para a FBN (Kiers et al., 2002; Souza et al., 1999).

Diversidade ainda mais elevada foi demonstrada na análise por *rep*-PCR. Os índices de diversidade e de riqueza genética, obtidos com base nos produtos de *rep*-PCR também foram significativamente maiores nas áreas nativas e áreas cultivadas sem leguminosas do que nas áreas cultivadas com leguminosas. Esses resultados, em adição aqueles obtidos com os perfis de LPS, comprovam que a diversidade genética dos

microrganismos de um ecossistema em equilíbrio altera rapidamente em função das práticas de manejo de solo. A diversidade dos isolados indígenas dos Cerrados também é confirmada na análise de perfis esperados em um futuro levantamento, conforme proposto por Shen et al. (2003), com indicação de que diversos outros perfis de *rep*-PCR seriam encontrados em um novo levantamento.

Bactérias simbiontes de leguminosas pertencem, em sua quase totalidade, à subclasse alfa de Proteobacteria. Neste estudo, porém, foi confirmado, por seqüenciamento da região do gene ribossomal 16S, que bactérias dos Cerrados pertencentes à subclasse beta são capazes de nodular o feijoeiro, pois diversas estirpes apresentaram maior similaridade de bases com o gênero *Burkholderia*. Apesar do gênero *Burkholderia* reunir cerca de 24 espécies, apenas duas delas foram identificadas como simbiontes diazotróficos com base na detecção do gene *nifH* (*B. vietnamiensis* e *B. kururiensis*), contudo, a eficiência de FBN em plantas do gênero *Mimosa*, de onde foram isoladas, não foi demonstrada (Moulin et al., 2001). Pandey et al. (2005) isolaram outra estirpe de *Burkholderia* de *Mimosa pudica*, mas a capacidade de FBN também não foi investigada e, finalmente, Menna (2005) identificou *Burkholderias* simbiontes de várias *Mimosoideae*, bem como uma estirpe, SEMIA 6160, capaz de nodular de modo eficaz espécies de *Mimosa* spp., *Albizia* (subfamília Mimosoideae) e *Sclerolobium paniculatum* (Caesalpinioideae), enquanto outra estirpe, SEMIA 656, é capaz nodular de modo eficaz plantas da subfamília Papilionoideae: *Desmodium* (Desmodieae), *Macroptilium* (Phaseoleae) e *Neonotonia* (Phaseoleae). Desse modo, este trabalho com isolados dos Cerrados confirma a nodulação eficaz de outra leguminosa da subfamília Papilionoidea, o feijoeiro, com várias estirpes de *Burkholderia*. É importante salientar, ainda, que *Burkholderias* diazotróficas foram identificadas como endofíticas de não-leguminosas como o milho, teosinte e cana-de-acúcar (Estrada et al., 2002; Reis et al., 2004), e classificadas em uma nova espécie, *B. tropica* (Reis et al., 2004). Neste estudo, a maioria das estirpes que apresentaram similaridade de seqüências do 16S rRNA com *Burkholderia* foi isoladas de áreas não cultivadas anteriormente, enquanto que, nas áreas cultivadas, particularmente com leguminosas, houve maior semelhança com *Rhizobium*.

A descoberta de *Burkholderias* como simbiontes de leguminosas ainda é recente, de modo que os mecanismos de evolução ainda não foram elucidados. É possível imaginar que o isolamento de *Burkholderia* expressando os genes de nodulação para o feijoeiro poderia indicar transferência lateral entre bactérias mais específicas para o hospedeiro e outras residentes no solo. A ocorrência ampla de transferência lateral de genes simbióticos

entre estirpes de rizóbios da mesma espécie foi claramente demonstrada em um experimento conduzido na Nova Zelândia, em que uma estirpe inoculante de *Lotus corniculatus* foi introduzida em solo isento de bactérias capazes de formar nódulos com essa leguminosa. Após sete anos de cultivo deste hospedeiro, o reisolamento de rizóbios dos nódulos demonstrou que as bactérias não apresentavam semelhança com a estirpe que havia sido introduzida, mas sim com rizóbios nativos não-simbiontes, que receberam informação genética para nodular e fixar nitrogênio da estirpe inoculante (Sullivan et al., 1995). Os fagos no solo são propostos como os principais mediadores da transferência de informação genética entre bactérias, muito embora a evidência desta transferência na natureza não seja contundente (Martínez-Romero, 2005). Em laboratório, os fagos podem encapsular fragmentos do genoma bacteriano, substituir o material genético do vírus e transferir parte do genoma infectado anteriormente (transdução generalizada). Os fagos podem, também, ser inseridos em sítios preferenciais do genoma e, ao saírem de maneira imperfeita, levar parte do genoma bacteriano em que se encontravam e integrá-los a outra bactéria (transdução específica) (Martínez-Romero, 2005). Concomitantemente com a transferência lateral, mutações e arranjos gênicos entre os microrganismos locais podem contribuir para a variabilidade genética (Papadopoulos et al., 1999).

Em estudos evolutivos bacterianos, tem-se considerado que não há evolução sem transferência lateral de informação genética. Segundo Provorov e Vorob'ev (2000) os genes virulentos (*nod*, *noe*, *nol*) que governam a sinalização dos estágios iniciais da nodulação podem ter sido transferidos lateralmente de algum rizóbio nativo para as estirpes nativas de *Burkholderia*. Entretanto, uma observação intrigante acerca este acontecimento: os genes de nodulação certamente não são essenciais à sobrevivência das estirpes de *Burkholderia*, visto que são bactérias dominantes mesmo em condições de baixa densidade populacional de leguminosas. Entretanto, é provável que estes genes virulentos tenham sido aleatoriamente “ligados” (organização das ilhas simbióticas) aos genes de manutenção e herdados compulsoriamente durante a multiplicação das bactérias (Estrada de los Santos, 2001).

A bactéria *E. coli* é o organismo modelo em estudos de evolução microbiana. Os processos moleculares e as vantagens seletivas que levam à evolução da patogenicidade parecem ser comparáveis ao sistema de associação simbiótica de rizóbios e leguminosas. A virulência da maioria dos patógenos bacterianos é um processo multifatorial que requer dois componentes: 1) um adereço genético propício e; 2) um grupo de genes de virulência que seja único para cada patógeno (Nataro & Kaper, 1998), e, estas características também

são observáveis em rizóbios (Provorov & Vorob'ev, 2000). Os genes responsáveis pela virulência e pela nodulação podem ser encontrados em plasmídeos ou em cromossomo e são denominados de “ilhas de patogenicidade” e “ilhas simbióticas”, respectivamente (Martinez–Romero, 2003). Seria interessante detectar essas ilhas em *Burkholderia* e investigar se elas se encontram inseridas no cromossomo ou em plasmídeos, bem como averiguar se estes genes estão ligados a sítios de inserção de outros grupos gênicos, talvez responsáveis pela síntese de produtos essenciais para este gênero ou até mesmo para a sobrevivência no ecossistema.

Os resultados obtidos quanto à capacidade de nodulação e FBN apontam para um incremento na eficiência de FBN com a reestruturação das comunidades após a quebra do equilíbrio original. Embora o número de nódulos não fosse estatisticamente distinto entre as três áreas analisadas, houve um incremento considerável, nas áreas cultivadas, na massa de nódulos. Além disso, a capacidade de FBN e, especialmente, a eficiência de FBN dos nódulos foi superior nos solos cultivados. Assim, os nódulos formados com simbioses de áreas nativas permitiram o fornecimento médio de 0,270 mg N mg⁻¹ nódulo, com incrementos para 0,359 e 0,350 mg N mg⁻¹ nódulo nas áreas cultivadas sem e com leguminosas, respectivamente. Desse modo, com a introdução da agricultura nesses solos ocorreu uma seleção de estirpes com maior capacidade de FBN. Provavelmente, com o cultivo do solo, bactérias mais eficazes no processo de FBN foram selecionadas e, pela multiplicação, se tornaram dominantes no solo. Do mesmo modo, as leguminosas podem ter recompensado indivíduos mais eficazes e penalizado indivíduos menos cooperantes posteriormente à infecção, de forma que as associações mutualísticas passaram a ser priorizadas no ecossistema (Provorov & Vorob'ev, 2000; Kiers et al., 2002; West et al., 2002).

A heterogeneidade dos solos dos Cerrados e a abundância da diversidade da flora e fauna determinam diferentes comunidades microbianas, que desempenham papel crucial na ciclagem dos nutrientes, equilíbrio de populações e conservação dos recursos naturais. A introdução de práticas agrícolas nestes solos representa uma ruptura num ecossistema em clímax e, como consequência, podem existir perdas genéticas através do processo de seleção e reestruturação de novos grupos funcionais. Em termos evolutivos, este estudo demonstrou que o uso do solo nos Cerrados promoveu mudanças quantitativas e qualitativas na diversidade de bactérias capazes de nodular e fixar N₂ com o feijoeiro. Os solos dos Cerrados são caracterizados pela baixa fertilidade natural, sendo particularmente pobres em N e, com a retirada da vegetação em clímax e a introdução de espécies

domesticadas com demanda elevada de nutrientes, houve a seleção de estirpes com maior eficiência de FBN. A diminuição da diversidade, com concomitante incremento na eficiência de FBN foi ainda mais elevada na presença de leguminosas, caracterizadas por uma relação simbiótica mais eficiente. Contudo, bactérias com eficiência de FBN comparável à das áreas com leguminosas foram isoladas de áreas cultivadas com não-leguminosas e poderiam indicar um papel endofítico dessas bactérias, mas que ainda precisa ser quantificado.

Muito se questiona sobre a importância da diversidade genética e funcional e a relação com a sustentabilidade e o rendimento agrícola. Acredita-se que a relevância da biodiversidade reside em que ela permite flexibilidade, adaptabilidade e resistência frente a diferentes estresses ambientais, aumentando as chances de sobrevivência das espécies frente às modificações casuais do nicho ecológico. A maior dificuldade, porém, tem sido a de relacionar a biodiversidade com a produção agrícola. Neste estudo, tomando como modelo funcional o processo de FBN, foi evidenciado que, no ecossistema dos Cerrados brasileiros, a diversidade de rizóbios microssimbiontes do feijoeiro é elevada, caindo drasticamente com todos os tipos de cultivo. Contudo, o cultivo resultou em um rápido processo de seleção de microssimbiontes com maior capacidade de FBN, o que permitiria o cultivo de plantas comerciais. Os resultados evidenciam, portanto, que nenhum dos cultivos foi capaz de manter a diversidade dos rizóbios, reforçando a necessidade de manter áreas de preservação para a manutenção da biodiversidade dos ecossistemas. Por outro lado, houve indicações de que, com o rompimento do equilíbrio do ecossistema e o cultivo de espécies comerciais, ocorre um processo imediato de adaptação e seleção da biota do solo visando, dentro do potencial dessa biota, a sustentabilidade das culturas.

Portanto, os dados obtidos também enfatizam a necessidade de investigação da rica diversidade microbiana nos Cerrados, que pode abrigar um reservatório importante de microrganismos com potencial biotecnológico nas áreas de remediação ambiental, agrícola e medicinal, entre outras.

Estudo 2

Genes de nodulação e fixação de N₂ de *Rhizobium etli*

As populações de rizóbios estabelecidas nos solos podem diferir quanto à eficiência de FBN e à competitividade, afetando diretamente a contribuição de N para a leguminosa hospedeira. A importância da diversidade genética e funcional está no fato de que ela permite flexibilidade, adaptabilidade e resistência frente a diferentes estresses ambientais, aumentando as chances de sobrevivência das espécies com modificações casuais do nicho ecológico. Contudo, os novos patamares de produtividade agrícola exigem um fornecimento elevado de nutrientes, particularmente N, o que, no caso de leguminosas, implica em uma contribuição elevada da FBN, ou na adição de fertilizantes nitrogenados. Em geral, porém, contribuições elevadas da FBN requerem a inoculação com estirpes selecionadas, caracterizadas pela capacidade elevada de FBN, estabilidade genética sob condições ambientais estressantes e competitividade elevada frente às populações estabelecidas no solo (Hungria et al., 1997).

O feijoeiro é considerado um hospedeiro promíscuo, sendo capaz de estabelecer relações simbióticas com diversas espécies de rizóbios (Michiels et al., 1998; Grange & Hungria, 2004; Kaschuk et al., 2005a,b; Alberton et al., 2005). No Brasil, a população estabelecida de rizóbios microsimbiontes do feijoeiro é elevada na maioria dos solos cultivados, competitiva, mas em geral pouco eficiente no processo de FBN (Hungria et al., 1997, 2000, 2003). Contudo, pouco se conhece sobre a estrutura das comunidades dos rizóbios microsimbiontes do feijoeiro estabelecidas nos solos brasileiros, informação essa indispensável para delinear estratégias para maximizar as respostas à inoculação e incrementar a contribuição da FBN.

Ainda não estão elucidados todos os fatores que determinam a distribuição geográfica das espécies de rizóbio que nodulam o feijoeiro, mas, certamente, a origem da disseminação da planta hospedeira deve desempenhar um papel relevante na predominância da espécie de rizóbio, que é carregada com as sementes. Existem diversas hipóteses para explicar a origem e domesticação do feijoeiro, sendo uma das mais fortes a de que a domesticação dessa leguminosa teria ocorrido na Mesoamérica, com disseminação posterior para a América do Sul. Entretanto, estudos baseados em padrões

eletroforéticos de *Phaseolina* (*Phs*) sugerem a existência de três centros primários de diversidade genética, tanto para espécies silvestres, como para cultivadas: a Mesoamérica, que se estende desde o sudeste dos Estados Unidos até o Panamá, tendo como zonas principais o México e a Guatemala; o sul dos Andes, que abrange desde o norte do Peru até as províncias do noroeste da Argentina; e o norte dos Andes, que abrange desde a Colômbia e Venezuela até o norte do Peru (Embrapa Arroz e Feijão, 2005). Em uma análise mais detalhada desses padrões eletroforéticos, porém, foi sugerido que o feijoeiro pode ter tido apenas um centro de origem e todos os tipos de feijão existentes evoluíram a partir de uma mesma população, do chamado grupo Norte [áreas desde o México até o norte da América do Sul (Colômbia, Equador, norte do Peru)] (Freitas, 2001). No Brasil, estudos recentes conduzidos com o gene nuclear *Phs*, em grãos coletados em sítios arqueológicos de Lapa do Boquete, em Januária, Minas Gerais, indicam que, ao contrário do pensamento generalizado, houve maior grau de relação com alelos presentes em populações do grupo Norte, embora também apresentassem vestígios de um certo grau de contato com alelos relacionados às populações do centro sul andino (Freitas, 2001). Aparentemente, as barreiras culturais humanas parecem ter sido mais fortes e decisivas do que as próprias barreiras geográficas e a difusão deve ter ocorrido através de migrações, por troca entre as populações indígenas, ou mesmo por conquista (Freitas, 2001). Há poucas informações sobre a evolução dos microssimbiontes do feijoeiro, mas um estudo conduzido com *R. etli* e feijões de diferentes centros genéticos indicam que ocorreu co-evolução dos rizóbios com os hospedeiros em cada local (Aguilar et al., 2004). Outro exemplo de co-evolução entre rizóbio e leguminosa foi relatado em uma cultivar de ervilha do Afeganistão, que nodulou com estirpes de *R. leguminosarum* de solos do Oriente Médio e Ásia Central, mas não com estirpes européias (Lie et al., 1987).

Existem, hoje, cinco espécies descritas de simbioses do feijoeiro: *R. leguminosarum*, *R. etli*, *R. tropici*, *R. gallicum* e *R. giardinii*. Com exceção de *R. gallicum*, todas as demais já foram encontradas em solos brasileiros (Mostasso et al., 2002; Grange & Hungria, 2004), além de outras que ainda não haviam sido descritas como simbioses dessa leguminosa: *Sinorhizobium fredii*, *Mesorhizobium plurifarum* e prováveis novas espécies (Grange & Hungria, 2004).

Segundo Segovia et al. (1993), a espécie *R. etli* é normalmente encontrada na Mesoamérica e teria sido introduzida, na Europa, concomitantemente com o seu hospedeiro, no século XVI. Algumas estirpes permaneceram como tal, mas, aparentemente, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* pode ter surgido a partir da adição, por

transferência horizontal, do genoma simbiótico de uma espécie de *R. etli*. A coexistência, por um período mais longo, entre *R. etli* e o hospedeiro, em relação à espécie *R. leguminosarum* bv. phaseoli, explicaria porquê a estirpe parental apresenta maior diversidade genética. No noroeste da Argentina, centro secundário de origem do feijoeiro, 100% da população que nodulou o feijoeiro selvagem (*P. vulgaris* var. aborigineus) também apresentou as características de *R. etli* (Aguilar et al., 1998).

Martínez-Romero et al. (1991) sugeriram que *R. tropici* seria uma espécie nativa de regiões tropicais da América do Sul, simbiote do feijoeiro. Contudo, a espécie tem sido isolada de outros continentes e, também, de outros hospedeiros, por exemplo, de nódulos de feijoeiro na França, nódulos de *Bolusanthus* e *Aspartium* na África, solos da África sem histórico de cultivo de feijoeiro, nódulos de leguminosas nativas da Austrália (revisado em Grange & Hungria, 2004). Em muitos casos, é possível que *R. tropici* tenha sido carregado junto com as sementes introduzidas em outros países, contudo, deve-se considerar também que o feijoeiro pode não ser o hospedeiro exclusivo ou primário dessa espécie. Nos poucos estudos conduzidos no Brasil, há relatos de predominância de *R. tropici* (Martinez-Romero et al., 1991; Hungria et al., 1997, 2000; Hungria & Stacey, 1997; Mercante et al., 1998; Hungria et al., 2000; Mostasso et al., 2002). Considera-se ainda que esses isolados foram coletados de três maneiras distintas: 1) nódulos a campo, correspondendo a estirpes mais competitivas (Mostasso et al., 2002); 2) utilizando como planta-isca *Leucaena* spp (Mercante, 1993; Mercante et al., 1998); 3) selecionados pela capacidade de nodular tanto o feijoeiro como *Leucaena* (Hungria et al., 2000).

Recentemente, porém, Grange & Hungria (2004) isolaram diversas estirpes de nódulos de feijoeiro inoculado com diluições de solos dos Estados de Pernambuco e do Paraná e, com base na análise do gene ribossomal 16S, a maioria foi classificada como *R. etli*, ao contrário dos estudos conduzidos anteriormente, que indicavam predominância de *R. tropici*. As estirpes de *R. etli* desse estudo foram obtidas em dois ecossistemas distintos, de clima semi-árido da Zona da Mata em Pernambuco, ou de clima subtropical no Paraná. Como plantas-isca foram utilizadas duas cultivares de feijoeiro, uma de grãos de cor (Aporé) e outra de grãos negros (Negro Argel).

Visando esclarecer as diferenças na composição das comunidades encontradas nos estudos conduzidos no Brasil, foram formuladas hipóteses e identificadas algumas linhas de pesquisa. Primeiramente, poderia ser questionado que a origem das cultivares (mesoamericanas) teria selecionado populações diversas. Contudo, as cultivares utilizadas nos estudos em que houve predominância de *R. tropici* também são de origem

mesoamericana e, inclusive, nos estudos de Hungria et al. (1997, 2000) incluíram a Negro Argel. Uma segunda hipótese seria sobre os métodos de obtenção dessas estirpes, uma vez que o trabalho de Grange & Hungria (2004) foi o único que utilizou inoculação de diluições de solo e o feijoeiro como planta-isca. De fato, ensaios conduzidos para esclarecer essa dúvida indicaram que, conforme a metodologia utilizada, a população obtida é distinta (Alberton et al., 2005). No caso do feijoeiro, baixa diversidade de estirpes foi constatada quando o isolamento foi realizado a partir de nódulos coletados diretamente a campo, pois o método selecionou as estirpes mais competitivas. Ao contrário, quando diluições de solo foram utilizadas como inoculante para plantas crescendo em vasos de Leonard, uma grande diversidade de bactérias foi obtida, uma vez que a diluição diminuiu a pressão de competição, aumentando as chances de nodulação das bactérias menos competitivas (Alberton et al., 2005). A posição taxonômica dos isolados de Alberton et al. (2005) não foi determinada, contudo, os resultados obtidos confirmam que as estirpes de *R. etli* isoladas por Grange & Hungria (2004) ocorrem de modo generalizado em pelo menos dois ecossistemas brasileiros, mas que devem apresentar baixa competitividade frente a outros rizóbios da comunidade. A linha de pesquisa estabelecida para este trabalho foi, então, a de procurar identificar a provável origem dos genes simbióticos de 43 estirpes brasileiras de *R. etli*.

Pela análise de PCR-RFLP dos genes de nodulação (*nodA*, *nodB* e *nodC*) foi possível constatar que as estirpes brasileiras de *R. etli* sempre formaram um grupo distinto, ainda que com variabilidade intra-específica. Esse grupo apresentou baixa similaridade genética com a estirpe-tipo CFN 42 de *R. etli*, isolada no México. Contudo, a similaridade foi ainda menor com *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* proveniente da Europa e, principalmente, com o grupo de *R. etli*. Finalmente, todas as regiões analisadas indicaram claramente que os genes *nod* de *R. etli* são muito distintos daqueles observados em *R. tropici*, descartando a hipótese de transferência lateral de genes simbióticos entre essas espécies. Resultados semelhantes foram constatados na análise do gene *nifH*, que é considerado geneticamente mais estável (Martínez-Romero et al., 1991). Na análise polifásica incluindo os genes *nodA*, *nodB*, *nodC* e *nifH*, os grupos referentes às diferentes espécies foram evidenciados. As estirpes de *R. tropici* e *Rhizobium* sp. formaram um agrupamento bastante heterogêneo, com um nível final de similaridade final de apenas 40,7%. As estirpes brasileiras de *R. etli* foram agrupadas com 64,1% de similaridade e *R. etli* CFN 42 se uniu a esse grupo em 53,7%. Já o grupo de *R. etli* isolado da Espanha foi bastante distinto.

Seria plausível estabelecer a hipótese de que os ancestrais bacterianos das estirpes deste estudo podem ter sido antigos *R. etli* introduzidos por sementes transportadas por tribos indígenas da região Norte, antes mesmo da colonização européia. Além disso, *R. etli* já foi encontrado como endofítico de milho no México (Gutierrez-Zamora & Martinez-Romero, 2001) e a difusão de raças/etnovariedades distintas de milho ocorreram para o Brasil, pela primeira vez, há cerca de 5.000 anos e também foram influenciadas pelos grupos da região Norte (Freitas, 2001).

Alterações na resposta genética podem estar relacionadas à liberação de exsudatos específicos pela planta hospedeira, na busca do simbiote mais efetivo, resultando em troca de informação genética entre as bactérias no solo, visando estabelecer qual população se tornará predominante diante do novo nicho ecológico (Souza et al., 1999). Recombinações gênicas também podem ocorrer em resposta a estresses ambientais (Souza et al., 1999). Pode-se levantar a hipótese que, no caso de *R. etli* em solos brasileiros, a presença de exsudatos do hospedeiro, a pressão de adaptação às condições ambientais e a co-evolução com o hospedeiro resultaram em seleção e recombinação genética a partir de *R. etli* proveniente da Mesoamérica, com o qual apresenta maior similaridade genética. No processo de colonização do Brasil, o Estado de Pernambuco teve forte influência de várias culturas européias, incluindo portugueses, holandeses e Franceses, que poderiam ter introduzido sementes carregando *R. leguminosarum* e/ou *R. etli* via Europa. Contudo, os genes *nod* e *fix* de *R. etli* no Brasil foram muito distintos daqueles detectados nas estirpes de referência dessas espécies. O fluxo de europeus para o Estado do Paraná ocorreu um pouco mais tarde e incluiu europeus e asiáticos, como alemães, poloneses, russos, japoneses, que também poderiam ter introduzido sementes. Contudo, não foram constatadas diferenças entre os *R. etli* de Pernambuco ou do Paraná, forte indicativo de que a co-evolução no Brasil deve ter sido anterior a essas colonizações, bem como de que materiais que possam ter sido introduzidos não chegaram a alterar significativamente a estrutura das populações de *R. etli*. Finalmente, ficou evidenciado que os genes *nod* e *nif* de *R. etli* do Brasil não foram transferidos lateralmente de *R. tropici* nativo e, talvez, venham a representar um novo biovar.

Embora este trabalho tenha confirmado os resultados obtidos por Grange & Hungria (2004), que apontaram a existência de uma população numerosa e de ocorrência ampla de *R. etli* em solos brasileiros, outros levantamentos a campo indicam predominância de *R. tropici* (Hungria et al., 1997, 2000; Mercante et al., 1998). Uma hipótese seria a de que *R. tropici* é, na verdade, simbiote preferencial de outra leguminosa

nativa do Brasil, que se adaptou plenamente ao feijoeiro. Contudo, embora muito pouco se saiba sobre a taxonomia de rizóbios nativos do Brasil, na análise de 68 estirpes de rizóbios microsimbiontes de 46 leguminosas hospedeiras, muitas delas nativas do Brasil, apenas duas apresentaram maior semelhança com *R. tropici*, sendo uma delas capaz de nodular *Leucaena* e a outra *Mimosa caesalpinifolia* (Menna, 2005). É possível, ainda, que *R. etli* tenha se tornado simbiote de alguma outra leguminosa nativa, ainda não identificada.

Além disso, talvez a hipótese mais provável seria a de que *R. tropici* tenha sido introduzido no Brasil em uma das migrações que ocorreram do centro sul andino pois, conforme demonstrado por Freitas (2001), o material brasileiro também aponta semelhança alélica relacionada às populações dessa região. Diversas características de *R. tropici*, como tolerância à acidez e a temperaturas elevadas, bem como maior capacidade de FBN sob essas condições estressantes (Martinez-Romero et al., 1991; Graham et al., 1994; Hungria et al., 1993, 1997, 2000), além da maior competitividade sob condições ácidas (Anyango et al., 1995), predominantes no Brasil, resultaram em que *R. tropici* passasse a ser o simbiote preferencial a campo. As propriedades saprofíticas de *R. etli*, porém, permitiram a sobrevivência dessa espécie em solos brasileiros e, inclusive, o crescimento dessas bactérias pode ser estimulado pela rizosfera do feijoeiro, competindo por substratos e afetando a nodulação. Outras pesquisas precisam ser conduzidas, portanto para avaliar a importância ecológica da convivência dessas populações na rizosfera do feijoeiro.

V. CONCLUSÃO I

Estudo 1

- ✓ LPS:Foi encontrada maior diversidade de perfis em áreas nativas e em áreas cultivadas sem leguminosas;
- ✓ LPS: Sistemas agrícolas interferem na estrutura gênica envolvida na produção de LPS;
- ✓ *rep*-PCR: O índice de diversidade também foi maiores para as áreas nativas e cultivadas com leguminosas;
- ✓ *rep*-PC : O nº de perfil esperados em um futuro levantamento indicam a presença de outros Microrganismos presentes nos solos dos Cerrados;
- ✓ O sequenciamento da região 16S rRNA apontou a presença de bactérias da subclasse beta nodulando feijoeiro;
- ✓ O sequenciamento também aponta que há uma maior presença das *Burkholderias* nas áreas nativas enquanto que os isolados das áreas cultivadas apresentaram maior semelhança com *Rhizobium*;
- ✓ A transferência lateral representa um importante mecanismo para a manutenção da diversidade nos solos dos Cerrados;
- ✓ É provável que os genes de nodulação tem se ligado aleatoriamente aos genes de manutenção específicos da espécie e herdado compulsoriamente durante a multiplicação bacteriana;
- ✓ Em interações mais específicas, como a simbiose, a seleção nas comunidades microbianas acontece de forma mais drástica em busca de um novo equilíbrio genético;
- ✓ Em termos evolutivos este estudo demonstrou que uso dos solos dos cerrados promove mudanças qualitativas e quantitativas na diversidade das bactérias dos Cerrados.

Estudo 2

- ✓ *R. etli* isolados por Grange & Hungria (2004) ocorreram de modo generalizado em pelo menos dois ecossistemas brasileiros (clima semi-árido-Pernambuco e tropical-Paraná;
- ✓ *R. etli* brasileiro formam grupos distintos com variabilidade intra-específica para as três regiões analisadas por RFLP-PCR (*nodA*, *nodB*, *nodC*, *nifH*);
- ✓ *R. etli* apresenta baixa similaridade com CFN42, isolada do México, através das análises com os genes de nodulação e fixação, isolada do México;
- ✓ Pela análise polifásica, os *R. etli* brasileiros se agruparam com 64,1% de similaridade unindo-se ao CFN42 com 53,7%;
- ✓ Para os *R. etli* brasileiros, a presença do hospedeiro pode ter levado a adaptação às condições ambientais por co-evolução com a planta a partir da e recombinação genética dos *R. etli* provenientes da Mesoamérica;
- ✓ Os genes *nod* e *nif* das estirpes analisadas foram distintas das espécies de referência;
- ✓ Os genes de nodulação e fixação dos *R. etli* brasileiros não foram transferidos horizontalmente porque não se assemelham aos genes dos *R. tropici*, podendo representar um novo biovar;

VI. REFERÊNCIAS

ACHTMAN, M. & HAKENBECK, R. Recent developments regarding the evolution of pathogenic bacteria. In: HORMAECHE, C.E. (Ed.). **Molecular biology of bacterial infection: Current status and future perspective**, Cambridge: Cambridge University Press, p. 13–31, 1992.

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

AGUILAR, O., M.; TAORMINO, J.; THÖNY, B.; RAMSEIER, T.; HENNECKE, H.; SZALAY, A., A. The *nifEN* genes participating in FeMo cofactor biosynthesis and genes encoding dinitrogenase are part of the same operon in *Bradyrhizobium* species. **Molecular Genetics and Genomics (Historical Archive)**, New York, n.3, v.224, p.413-420, 1990.

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

ALBERTON, O.; KASCHUK, G.; HUNGRIA, M. Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, 2005 (aceito).

ALVARENGA, M., I., N.; SIQUEIRA, J., O.; DAVIDE, A., C. Teor de carbono, biomassa microbiana, agregação e micorriza em solos de cerrado com diferentes usos. **Ciência Agroecológica**, v.23, p.617-625, 1999.

AMARAL, E.S.; OLIVARES, F.L.; BALDANI, J.I. Symbiotic performance and survival of plasmid-cured derivatives of the rhizobial strain BR 855 in soil under heat stress. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS – THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, 1995. **Abstracts**. Angra dos Reis: Embrapa-CNPBS, p.104-105, 1995.

AMARGER, N. Rhizobia in the field. **Advances in Agronomy**, v. 73, p.109–168, 2001.

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, p. 593, 1993.

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

AMARGER, N.; GENIAUX, E.; LAGUERRE, G. *Rhizobium* associated with field-grown *Phaseolus vulgaris*. In: 7th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MICROBIAL ECOLOGY, 1995. **Abstracts**. Santos: SBM, 1995, p. 2-14

AMARGER, N.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.47, n.4, p.996-1006, 1997.

ANDRADE L.A.Z.; FELFILI, J.M. ; VIOLATTI, L. Fitossociologia de uma área de cerrado denso na RECOR-IBGE, Brasília-DF. **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v.16, n.2, 2002.

ANTOUN, H.; BEAUCHAMP, C.J.; GOUSSARD, N.; CHABOT, R.; LALANDE, R. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 204, n.1, p.57-67, 1998.

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

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

ATKINSON, E.M.; PALCIC, M.M.; HINDSGAUL, M.; LONG, S.R. Biosynthesis of *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide Nod factors: NodA is required for an N-acyltransferase activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.**, Washington., v.91, p.8418-8422, 1994.

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

BAEV, N.; ENDRE, G.; PETROVICS, G.; BANFALVI, Z.; KONDOROSI, A. Six nodulation genes of *nod* box locus 4 in *Rhizobium meliloti* are involved in nodulation signal production: *nodM* codes for D-glucosamine synthetase. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v.228, p.113-124, 1991.

BANFALVI, Z.; NIEUWKOOP, A.; SCHELL, M.; BESL, L.; STACEY, G. Regulation of *nod* gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v.214, p.420-424, 1988.

BARNY, M.P.; DOWNIE, J.A. Identification of the NodC protein in the inner but not the outer membrane of *Rhizobium leguminosarum*. **Molecular Plant Microbe Interaction**, Saint Paul, v.6, p.669-672, 1993.

BARRERA, L.L.; TRUJILLO, M.E.; GOODFELLOW, M.; GARCÍA, F.J.; HERNÁNDEZ-LUCAS, I.; DÁVILA, G.; van BERKUM, P.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.

Biodiversity of bradyrhizobia nodulating *Lupinus* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.47, p.1086-1091, 1997.

BECKING, J. The *Rhizobium* symbiosis of the nonlegume Parasmonia. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H. (Ed.) **Biological nitrogen fixation**. New York: Chapman and Hall, p. 497-559, 1992.

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

BENDICH, A. J. & K. DRLICA. Prokaryotic and eukaryotic chromosomes: what's the difference? **BioEssays**, Cambridge, v.22, p.481-486, 2000.

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

BEYENE, D.; KASSA, S.; FRANKLIN, A.; AMPY, F.; AMHA, A.; GEBREMEDHIN, T.; van BERKUM, P. Ethiopian soils harbor natural populations of rhizobia that form symbioses with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Archives of Microbiology**, U.S.A., v. 181, n. 2, p. 129-136, 2004.

BROM, S.; GIRARD L.; GARCÍA-DE LOS SANTOS, A.; SANJUÁN-PINILLA J. M.; OLIVARES J.; SANJUÁN, J. Conservation of plasmid-encoded traits among bean-nodulating *Rhizobium* species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, p.2555-2561, 2002.

BROM, S.; MARTÍNEZ, E.; D'ÁVILA, G.; PALACIOS, R. Narrow and broad-range symbiotic plasmids of *Rhizobium* spp. strains that nodulate *Phaseolus vulgaris*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, p.1280-1283, 1988.

BROUGHTON, W.J.; JABBOURI, S.; PERRET, X. Keys to symbiotic harmony. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.182, p.5641–5652, 2000.

BULL, A.T.; GOODFELLOW, M.; SLATER, J.H. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.46, p.219-252, 1992.

CANTER CREMERS, H.C.J.; ESPANHAK, H.P.; WIJKJES, A.H.M.; PEES, E.; WIJFFELMAN, C.A.; OKKER, R.J.H.; LUGTENBERG, B.J.J. Additional nodulation genes on the Sym plasmid of *R. leguminosarum* biovar *viciae*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.13, p.163-174, 1990.

CHAN, C.L.; LUMPKIN, T.A.; ROOT, C.S. Characterization of *Bradyrhizobium* sp. (*Astragalus sinicus* L.) using serological agglutination, intrinsic antibiotic resistance, plasmid visualization and field performance. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.109, p. 85-91, 1988.

CHAO, A. & SHEN, T. Nonparametric estimation of Shannon's index of diversity when there are unseen species in sample. **Environmental and Ecological Statistics**, n.4, v.10, p.429-443, 2003.

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

CHAO, A.; CHAZDON, R., L.; COLWEE, R., K., SHEN, T. A new statistical approach for assessing similarity of species composition with incidence and abundance data. **Ecology Letters**, v.8, p.148-159, 2004.

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

CHEN, W. X.; TAN, Z. Y.; GAO, J. L.; LI, Y.; SUI, X. H.; WANG, E. T. *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. **Internacional Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 47, p. 870-873, 1997.

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

CIAT - Centro Internacional de Agricultura Tropical. Research constraints provisionally identified by CIAT. In: **Workshop On Advanced Phaseolus Beans Research Network**, CIAT: Cali, 1990. 30p.

COLWELL, R.R. Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.104, p.410-433, 1970.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Análise conjuntural de 2002. Disponível em <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 18 de fevereiro de 2004.

CORICH, V.; GIACOMINI, A.; OLLERO, F. J.; SQUARTINI, A.; NUTI, M. F. Pulsed-field electrophoresis in counter-clamped homogeneous electric fields (CHEF) for fingerprinting of *Rhizobium* spp. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 83, p. 193-198, 1991.

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

COUTINHO, H. L. C. 2003. Biodiversidade: perspectivas e oportunidades biotecnológicas. Disponível em <<http://www.bdtfat.org.br/publicações/padct/bio/cap9/1/>> Acesso em: 12 junho de 2005.

D'HAEZE W. & HOLSTERS M. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. **Glycobiology**, Oxford, v. 12, p. 79-105, 2002.

DAKORA, F.D.; JOSEPH, C.M.; PHILLIPS, D.A. Common bean root exudates contain elevated levels of daizein and coumestrol in response to *Rhizobium* inoculation. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v.6, p.665-668, 1993.

De BRUIJN, F. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and entero-bacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.2180-2187, 1992.

DE MAAGD, R. A.; VAN ROSSUM, C.; LUGTENBERG, B. J. J. Recognition of individual strains of fast-growing rhizobia by using profiles of membrane proteins and lipopolysaccharides. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, p. 3782-3785, 1988.

DE WEGER, L.A.; JANN B.; JANN K.; LUGTENBERG, B. Lipopolysaccharides of *Pseudomonas* spp. that stimulate plant growth: composition and use for strain identification. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.169, p. 1441-1446, 1987.

DEAN, D.R. & JACOBSON, M.R. Biochemical genetics of nitrogenase. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H. (Ed) **Biological nitrogen fixation**, New York: Chapman and Hall, 1992, p. 763-834.

DEBELLÉ, F.; PLAZANET, C.; ROCHE, P.; PUJOL, C.; SAVAGNAC, A.; ROSENBERG, C.; PROMÉ, J.C.; DÉNARIÉ, J. The NodA proteins of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium tropici* specify the N-acylation of Nod factors by different fatty acids. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.22, p.303-314, 1996.

DEMEZAS, D.H.; REARDON, T.B.; STRAIN, S.R.; WATSON, J.M.; GIBSON, A.H. Diversity and genetic structure of a natural population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* isolated from *Trifolium subterraneum* L. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 4, p. 209-220, 1995.

DÉNARIÉ, J.; DEBELLÉ, F.; PROMÉ, J. C. Rhizobium lipochitooligosaccharide nodulation factors: signalling molecules mediating recognition and morphogenesis. **Annual Review Biochemistry**, Palo Alto, v. 65, p. 503- 535, 1996.

DICKER, I.B. & SEETHARAM, S. Cloning and nucleotide sequence of the *firA* gene and the *firA200* (Ts) allele from *Escherichia coli*. **Journal Bacteriology**, Washington, v.173, p.334-344, 1991.

DOOLITTLE, W.F. You are what you eat: a gene transfer ratchet could account for bacterial genes in eukaryotic nuclear genomes. **Trends in Genetics**, London, v.14, p. 307-311, 1998.

DOWNIE, J.A. Functions of rhizobial nodulation genes. In: ESPANHAK, H.P.; KONDOROSI, A.; HOOYKAAS, P.J.J. (Ed.) **The Rhizobiaceae, molecular biology of model plant-associated bacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998, p. 387-402.

- DREYFUS, B.; GARCIA, J.L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov, a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.38, p.89-98, 1988.
- DROZDOWICZ, A. G. Microbiologia ambiental. In: ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L. R.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) **Tratado de microbiologia**. Rio de Janeiro: Manole, v. 2, 1991, p. 1-102.
- DRUMMOND, M.; CLEMENTS, J.; MERRICK, M.; DIXON, R. Positive control and autogenous regulation of the *nifLa* promoter in *Klebsiella pneumoniae*. **Nature**, v.301, p.302-7, 1983.
- DUDLEY, M.E.; JACOBS, T.W.; LONG, S.R. Microscopic studies of cell divisions induced in alfafa roots by *Rhizobium meliloti*. **Plant**, Berlin, v.171, p.289-301, 1987.
- DUPUY, N.C. & DREYFUS, B.L. *Bradyrhizobium* populations occur in deep soil under the leguminous tree *Acacia albida*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.2415-2419, 1992.
- DUTTA, C. & PAN, A. Horizontal gene transfer and bacterial diversity. **Journal of Biosciences**, Karnataka, v. 27, p. 27-33, 2002.
- EADY, R.R. The Mo⁻, V⁻, and Fe- based nitrogenase systems of *Azotobacter*. **Advances in Inorganic Chemistry**, San Diego, v.36, p.77-102, 1991.
- EARDLY, B.D.; MATERON, L.A.; SMITH, N.H.; JOHNSON, D.A.; RUMBAUGH, M.D.; SELANDER, R.K. Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium meliloti*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, p.187-194, 1990.
- EARDLY, B.D.; YOUNG, J.P.W.; SELANDER, R.K. Phylogenetic position of *Rhizobium* sp. strain OR 191, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, based on partial sequences of the 16S rRNA and *nifH* genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.1809-1815, 1992.
- ECKHARDT, T. A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. **Plasmid**, v.1, p.584-588, 1978.
- EMBRAPA, 2005. **Origem e História do feijão**. Disponível em <<http://www.cnpaf.embrapa.br>> Acesso em 23 de junho de 2005.
- ESPANHAK, H.P. & LUGTENBERG, B.J..J. Role of rhizobial lipo-chitin oligosaccharide signal molecules in root nodule organogenesis. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.26, p.1413-1422, 1994.
- ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; BUSTILLOS-CRISTALES, R.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia*, a Genus Rich in Plant-Associated Nitrogen Fixers with Wide Environmental and Geographic Distribution. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 6, p. 2790-2798, 2001.

ESTRADA, P.; MAVINGUI, P.; COURNOYER, B.; FONTAINE, F.; BALANDREAU, J.; CABALLERO-MELLADO, J. A N₂-fixing endophytic *Burkholderia* sp. associated with maize plants cultivated in México. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.48, p.285-294, 2002.

EVANS, H.J.; HARKER, A.R.; PAPEN, H.; RUSSEL, S.A.; HANUS, F.J.; ZUBER, M. Physiology, biochemistry and genetics of the uptake hydrogenase in rhizobia. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.41, p.335-361, 1987.

EWING, B. & GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v.8, p.186-194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v.8, p.186-194, 1998.

FAGERIA, N.K. & BALIGAR, V.C. Lowland rice response to nitrogen fertilization. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v.32, p.1405-1429, 2001.

FALKOW, S. The evolution of pathogenicity in *Escherichia*, *Shigella* and *Salmonella*. In.: NEIDHARDZ, F., C. (Ed.) **Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology**. Washington: American Society for Microbiology Press, 1996, p. 2723-2729.

FAO. **Statistical Databases**. Disponível em <<http://faostat.fao.org/>> Acesso em: 11 de janeiro de 2005.

FEIJE, F. & ANGER, V. Spot test in inorganic analysis. **Analytical Chemistry Acta**, v.149, p. 363-367, 1972.

FELLE, H.H.; KONDOROSI, E.; KONDOROSI, A.; SCHULTZE, M. Nod signal-induced plasma membrane potential changes in alfalfa root hairs are differentially sensitive to structural modifications of the lipochitooligosaccharide. **Plant Journal**, Oxford, v.7, p.939-947, 1995.

FERREIRA, C., M.; PELOSO, M., J.; FARIA, L.C. **Feijão na economia nacional**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2002, 48p.

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

FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA, 1996, 220p

FISHER, R.F.; TU, J.K.; LONG, S.R. Conserved nodulation genes in *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium trifolii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.49, p.1432-1435, 1985.

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

FREITAS, F. O. **Estudo genético-evolutivo de amostras modernas e arqueológicas de milho (*Zea mays*, L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris*, L.)**. Piracicaba, 2001, 125f. (Dissertação de Mestrado - Genética e Nutrição de Plantas) – USP - ESALQ.

FUNGARO, M.H.P. & VIEIRA, M.L.C. Aplicações da PCR em ecologia molecular. In: MELO, I.S. & AZEVEDO, J.L. (Ed.) **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998, p.205-225.

GARRITY, G. M. & HOLT, J. G. The road map to the Manual. In: KRIEG, N.R. & HOLT, J.G. (Ed.) **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 2 ed., Baltimore: TheWilliams & Wilkins, p. 119-154, 2001.

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

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

GEORGIADIS, M. M.; KOMIYA, H.; CHAKRABARTI, P.; WOO, D.; KORNUC, J. J.; REES, D. C. Crystallographic structure of the nitrogenase iron protein from *Azotobacter vinelandii*. **Science**, Washington, v. 257, p. 1653–1659, 1992.

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

GILLIS, M.; VAN, T., V.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HEBBAR, P.; WILLEMS, A.; SEGERS, P.; KERSTERS, K.; HEULIN, T.; FERNANDEZ, M., P. Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂-fixing isolates from rice in Vietnam. **Int. Journal Systematic of Bacteriology**, v.45, p.274-289, 1995.

GIRARD, M.L.; FLORES, M.; BROM, S.; ROMERO, D.; PALACIOS, R.; DÁVILA, G. Structural complexity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.173, p.2411-2419, 1991.

GORDON, D.; ABAJIAN, C; GREEN, P. Consed: A graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v.8, p.195-202, 1998.

GÖTTFERT, M.; HITZ, S.; HENNECKE, H. Identification of *nodS* and *nodU*, two, inducible genes inserted between the *Bradyrhizobium japonicum nodYABC* and *nodII* genes. **Molecular Plant-microbe Interaction**, Saint Paul, v.3, p.308-316, 1990.

GRAHAM, P.H. & VANCE, C. P. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. **Field Crops Research**, v. 65, p. 93-107, 2000.

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

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

GUTIERREZ-ZAMORA, M.L.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Natural endophytic association between *Rhizobium etli* and maize (*Zea mays* L.). **Journal of Biotechnology**, v.91, p.117-126, 2001.

HACKER, J.; BLUM-OEHLER, G.; MÜHLDORFER, I.; TSCHÄPE, H. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. **Molecular Microbiology**, v. 23, p.1089-1097, 1997.

HAEZE, D., W. & HOLSTERS M. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. MINI REVIEW. **Glycobiology**, Belgium, 2002.

HARRISON, P.; MYTTON, L.R.; SKØT, L.; DYE, M.; CRESSWELL, A. Characterization of *Rhizobium* isolates by amplification of DNA polymorphisms using random primers. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.38, p.1009-1015, 1992.

HAUKKA, K. & LIDSTRÖM, K. Pulsed-field electrophoresis for genotypic comparison of *Rhizobium* bacteria that nodulate leguminous trees. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 119, p. 215-220, 1994.

HAUKKA, K. **Genetic diversity and phylogeny of rhizobia isolated from tropical tree legumes**. Helsinki, 1997, 94f. (Ph.D. Thesis) - University of Helsinki.

HAUKKA, K.; LINDSTRÖM, K.; YOUNG, J.P.W. Diversity of partial 16S rRNA sequences among and within strains of African rhizobia isolated from *Acacia* and *Prosopis*. **Systematic and Applied Microbiology**, v.19, p.352-359, 1996.

HAUKKA, K.; LINDSTRÖM, K.; YOUNG, J.P.W. Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolated from leguminous trees growing in Africa and Latin America. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, p.419-426, 1998.

HITCHCOCK, P.J. & T.M. BROWN. *In vitro* selected fluoroquinolone-resistant mutants of *Citrobacter freundii*: analysis of the quinolone resistance acquisition. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 154, p. 269-277, 1983.

HOFFMANN, R. Elasticidade-renda das despesas com alimentos em regiões metropolitanas do Brasil em 1995-86. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.30, n.2, 2000, p.17-24.

HONMA, B.; BACHEM, C.W.B.; AUSUBEL, F.M. *Rhizobium meliloti* has three functional copies of the *nodD* symbiotic regulatory gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.**, Washington, v.84, p.8558-8562, 1987.

HOOVER, T.R.; IMPERIAL, J.; LUDDER, P.W.; SHAH, V.K. Homocitrate is a component of the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. **Biochemistry**, New York, v.28, p.2768-2771, 1989.

HORVATH, B.; BACHEM, C.W.B.; BACHEM; SCHELL, J.; KONDODOSI, A. Host-specific regulation of nodulation genes in *Rhizobium* is mediated by a plant signal, interacting with *nodD* gene product. **The EMBO Journal**, Oxford, v.6, p.841-848, 1987.

HUGHES, D. Evaluating genome dynamics: the constraints on rearrangements within bacterial genomes. **Genome Biology**, London, v.1, n.6, p.1-8, 2000.

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

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

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.19, p.819-830, 1997.

HUNGRIA, M. In: HUNGRIA, M. & ARAUJO, R., S. (Ed.) **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA-CNPAP, 1994b, 542p.

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

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

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

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

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

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, p.103-109, 1993.

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, p.103-109, 1993.

JAIN, R.; RIVERA, M. C.; LAKE, J.A. Horizontal gene transfer among genomes: the complexity hypothesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.**, v. 96, p.3801–3806, 1999

JARVIS, B.D.W.; DOWNER, J.L.; YOUNG, J.P.W. Phylogeny of fast-growing soybean-nodulating rhizobia supports synonymy of *Sinorhizobium* & *Bradyrhizobium* and assignment to *Rhizobium fredii*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.42, p.93-96, 1992.

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

JOHN, M.; ROHIRIG, H.; SCHMIDT, J.; WIENEKE, U.; SCHELL, J. *Rhizobium* NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a chitooligosaccharide deacetylase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.**, Washington, v.90, p.625-629, 1993.

JOHNSON, D.; ROTH, L.E.; STACEY, G. Immunogold localization of the NodC and NodA proteins of *Rhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.171, p.4583-4588, 1989.

JOHNSON, J. L. DNA reassociation and RNA hybridization of bacterial nucleic acids. **Methods in Microbiology**, London, v. 28, p. 33-74, 1985.

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

JORGENSEN, R.A. & CLUSTER, P.D. Modes and temps in the evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. **Annual Missouri Botanical Garden**, St. Louis, v. 75, p.1238-1247, 1989.

JOURNET, E. P.; PICHON, M.; DEDIEU, A.; DE BILLY, F.; TRUCHET, G.; BARKER, D. G. *Rhizobium meliloti* Nod factors elicit cell-specific transcription of the *ENOD12* gene in transgenic alfalfa. **Plant Journal**, Oxford, v. 6, p. 241- 249, 1994.

JUDD, A.K.; SCHNEIDER, M.; SADOWSKY, M.J.; DE BRUIJN, F.J. Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* Serocluster 123 strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.1702-1708, 1993.

JUNQUEIRA, P. C.; CANCEGLIERO, L. F. B.; MATSUNAGA, M.; YAMAGUISHI, C. T. Aspectos econômicos da produção e comercialização do feijão. **Agricultura em São Paulo**, São Paulo, v.18, n.7/8, p.1-64, 1971.

KAFETZOPOULOS, D.; THIREOS, G.; VOURNAKIS, J.N.; BOURIOTIS, V. The primary structure of a fungal chitin deacetylase reveals the function for tow bacterial gene products. **Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.**, Washington, v.90, p.8005-8008, 1993.

KAMST, E.; ESPANHAK, H. P.; KAFETZOPOULOS, D. Biosynthesis and secretion of rhizobial lipochitin-oligosaccharide signal molecules. **Subcellular Biochemistry**, London, v. 29, p. 29-71, 1998.

KAMST, E.; PILLING, J.; RAAMSDONK, L.M.; LUGTENBERG, B.J.J.; ESPANHAK, H.P. *Rhizobium* nodulation protein NodC is an important determinant of chitin oligosaccharide chain length in Nod factor biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, Washington. v.179, p.2103-2108, 1997.

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

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; CAMPO, R.J. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean grown under the no-tillage and conventional systems in South Brasil. **Applied Soil Ecology**, Columbus, 2005a (no prelo).

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; PIRES SANTOS, J.C.; BERTON-JUNIOR J.F. Differences in common bean rhizobial populations associated with soil tillage management in southern Brasil. **Soil & Tillage Research** , Oxford, 2005a (no prelo).

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; SANTOS, J.C.; BERTON-JUNIOR, J.F. Differences in common bean rhizobial populations associated with soil tillage management in southern Brasil. **Soil & Tillage Research**, Oxford, 2005b (on line, 05/2005).

KIERS, E.T.; WEST, S.A.; DENISON, F. Mediating mutualisms: farm management practices and evolutionary changes in symbiont co-operation. **Journal of Applied Ecology**, London, v.39, p.745-754, 2002.

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

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

KONDOROSI, E. & KORONDOSI, A. Control of root nodule organogenesis. In: **Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for analysis of a biological process**. Wymondham: Horizon Scientific Press, 2000, p. 449-465.

LAFAY, B. & BURDON, J.J. Molecular diversity of rhizobia occurring on native shrubby legumes in southeastern Australia. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, p.3989-3997, 1998.

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.

LAGUERRE, G.; FERNANDEZ, M.P.; EDEL, V.; NORMAND, P.; AMARGER, N. Genomic heterogeneity among French *Rhizobium* strains isolated from *Phaseolus Vulgaris* L. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.43, p.761-767, 1993.

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

LAGUERRE, G.; MAZURIER, S.I.; AMARGER, N. Plasmid profiles and restriction length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in field populations. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.101, p.17-26, 1992.

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

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

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

LAJUDIE, P. ; LORTET, G.; NEYRA, M.; BADJI, S.; NDOYE, I.; BOIVIN, C.; GILLIS, M.; DREYFUS, B. Etude taxonomique des *Rhizobium* sp. d'Acacia et des Sesbania. **Interactions Plantes Microorganismes**. IFS/ORSTOM, p.238-245, 1992.

LAJUDIE, P.; LAURENTE-FULELE, E.; WILLEMS, A.; TORCK, U.; COOPMAN, R.; COLLIMS, M.D.; KERSTERN, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixation bacteria nodulate *Neptunia natans* in Senegal.

International Journal of Systematic Bacteriology, Washington, v.58, p.1277-1290, 1998.

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

LAWRENCE, J. G. & ROTH, J. R. Roles of horizontal transfer in bacterial evolution. In: SYVANEN, M. & KADO, C.I. **Horizontal transfer**, London: Chapman and Hall, 1998, p.208-225.

LAWRENCE, J. G. & ROTH, J. R. Selfish operons: horizontal transfer may drive the evolution of gene clusters. **Genetics**, Pittsburgh, v. 143, p.1843-1860, 1996

LAWRENCE, J. G. Gene transfer, speciation, and the evolution of bacterial genomes. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 2, p.519-523, 1999

LAWRENCE, J. G. Selfish operons and speciation by gene transfer. **Trends in Microbiology**, London, v. 5, p.355-359, 1997

LEROUGE, P.; ROCHE, P.; FAUCHER, C.; MAILLET, F.; TRUCHET, G.; PROMÉ, J.C.; DÉNARIÉ, J. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. **Nature**, London, v.344, p.781-784, 1990.

LEUNG, K. & BOTTOMLEY, P.J. Growth and nodulation characteristics of subclover (*Trifolium subterraneum* L.) and *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii at different water potentials. **Soil and Biology Biochemistry**, Oxford, v.26, p.805-812, 1994.

LIE, T., A.; GÖKTAN, D.; ENGIN, M.; PIJNENBORG, J; ANLARSAL, E. Co-evolution of the legume-rhizobium association. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.100, p. 171-181, 1987.

LINDSTRÖM, K. & ZAHRAN, H. H.. Lipopolysaccharide patterns in SDS-PAGE of rhizobia infecting leguminous trees. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 107, p.327-330, 1993.

LINDSTRÖM, K.; LAGUERRE, G.; NORMAND, P.; RASMUSSEN, U.; HEULIN, T.; JARVIS, B.D.W.; de LAJUDIE, P.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; CHEN, W.X. Taxonomy and phylogeny of diazotrophs. In: ELMERICH, C.; KONDOROSI, A.; NEWTON, W.E. (Ed.) **Biological nitrogen fixation for the 21st century - Proceedings of the 11th International Congress on Nitrogen Fixation, Institut Pasteur, Paris, França, July 20-25, 1997**. Dordrecht: Kluwer, 1998. p. 559-570.

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

LONG, R.S.; BUIKEMA, W.J.; AUSUBEL, F.M. Cloning of *Rhizobium meliloti* nodulation genes by direct complementation of Nod⁻ mutants. **Nature**, London, v.289, p.485-488, 1982.

LONG, S.R. Genetic analysis of *Rhizobium* nodulation. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H.J. (Ed.) **Biological Nitrogen Fixation**, New York: Chapman & Hall, 1992, p.560-597.

LONG, S.R. *Rhizobium*-Legume nodulation: life together in the underground. **Cell**, Cambridge, v.56, p.203-214, 1989.

LOPES, A.S. Solos sob "Cerrado". **Características, propriedades e manejo**. Piracicaba: Instituto da Potassa & Fosfato, 1983. 162p.

LOUREIRO, M.F. Caracterização das estirpes por técnicas moleculares: o uso dos métodos de PCR e RAPD. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R.S. (Ed.) **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994, p.183-199.

LUCAS, I.H.; L. SEGOVIA, L.; MARTINEZ-ROMERO, E.; PUEPPKE, S.G. Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.2775-2779, 1995.

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

MARIOT, E.J. Ecofisiologia do feijoeiro. In: **O feijão no Paraná**. Londrina: IAPAR, Circular 63, 1989, p.25-41.

MARTINEZ, 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**, London, v.131, p.1779-1786, 1985.

MARTINEZ, E.; ROMERO, D.; PALACIOS, R. The *Rhizobium* genome. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.9, p.59-93, 1990.

MARTÍNEZ-ROMERO, E. Microbiología General. Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM. Apdo. postal 565-A. Cuernavaca, México. Disponível em: http://www.microbiologia.org.mx/microbiosonline/CAPITULO_01/Capitulo01.pdf. Acesso em: 18 de julho de 2005.

MARTÍNEZ-ROMERO, E. Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.161, p.11-20, 1994.

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, p.417-426, 1991.

MARVEL, D.J.; KULDAU, G.; HIRSCH, A.; RICHARDS, E.; TORREY, J.G.; AUSUBEL, F.M. Conservation of nodulation genes between *Rhizobium meliloti* and a slow-growing *Rhizobium* strain that nodulates a nonlegume host. **Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.**, Washington, v.82, p.5841-5845, 1985.

MENNA, P. **Filogenia de rizóbios utilizados em inoculantes comerciais brasileiros, com base no sequenciamento do gene ribossomal 16S**. Londrina, 2005 (Dissertação de Mestrado – Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina.

MENSINK, R.E. & HAAKER, H. Temperature effects on the MgATP induced electron transfer between the nitrogenase protein from *Azotobacter vinelandii*. **European Journal of Biochemics**, Heidelberg, v.208, p.295-99, 1992.

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

MERCANTE, F.M.M.; CUNHA, C.O.; STRALIOTTO, R.; RIBEIRO-JÚNIOR, W.Q.; 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.

MERRICK, M.J. Organisation and regulation of nitrogen fixation in *Klebsiella* and *Azotobacter*. In: BOTRHE, H.; BRUIJN, F.J.; NEWTON, W.E. **Nitrogen fixation: hundred years after**. Stuttgart: Gustav Fisher Verlag, 1988, p.203-303.

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

MIFLIN, B.J.; CULLIMORE, J.V. Nitrogen assimilation in the legume-*Rhizobium* symbiosis: a joint endeavour. In: VERMA, D.P.S. & HOHN, T. (Ed.) **Genes involved in microbe plant interactions**. Wien: Springer-Verlag, 1984, p.129-178.

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

MORGANTE, P.G., 2003. Fixação biológica e assimilação de nitrogênio. Disponível em: <<http://www.ciagri.usp.br/~lazropp/FisoVegGrad/NetNito.htm>>. Acesso em: 14 de junho de 2005.

MOSTASSO, L.; MOSTASSO, F., L.; VARGAS, M., A., T.; HUNGRIA, M. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, v. 73, n. 2, p. 121–132, 2002.

MOULIN L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the B-subclass of Proteobacteria. **Nature**, London, v.411, p.948-950, 2001.

MULLIGAN, J.T. & LONG, S.R. Induction of *Rhizobium meliloti nodC* expression by plant exudates requires *nodD*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.**, Washington, v.82, p.6609-6613, 1985.

MÜNCHBACH, M.; ANDREAS, N.; FRANZ, N. Multiple small heat shock proteins in rhizobia. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.181, p.83-90, 1999.

MURPHY, P.J.; WILSON, K.J.; ANYANGO, B.; GILLER, K.E. *Rhizobium tropici*, *R. leguminosarum* and *Sinorhizobium fredii* are all *Phaseolus*-nodulating rhizobia indigenous to Kenyan soils. In: CONGRÈS INTERNATIONAL DE FIXATION DE L'AZOTE. 11, 1997, Paris. **Résumés**. Paris: Institut Pasteur, INRA, CNRS, CEA, ORSTOM, CIRAD, 1997. p.01-11.

MURRAY, R. G. E.; BRENNER, D. J.; COLWELL, R. R.; De VOS, P.; COODFELLOW, M.; GRIMONT, P. A. D.; PFENING, N.; STACKEBRANDT, E.; ZAVARSIN, G. A. Report of the ad hoc committee on approaches to taxonomy within the *Proteobacteria*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 40, p. 213-215, 1990.

NAP, J.P. & BISSELING, T. Developmental biology of a plant-prokaryote symbiosis: the legume root nodule. **Science**, Washington, v.250, p.948-954, 1990.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinic Microbiology Review**, v.11, p.142-201, 1998.

NELSON, K.E.; CLAYTON, R.A.; GILL, S.R.; GWINN, M.L.; DODSON, R.J.; HAFT, D.H.; HICKEY, E.K.; PETERSON, J.D.; NELSON, W.C.; KETCHUM, K.A.; MCDONALD, L.; UTTERBACK, T.R.; MALEK, J.A.; LINHER, K.D.; GARRETT, M.M.; STEWART, A.M.; COTTON, M.D.; PRATT, M.S.; PHILLIPS, C.A.; RICHARDSON, D.; HEIDELBERG, J.; SUTTON, G.G.; FLEISCHMANN, R.D.; EISEN, J.A.; WHITE, O.; SALZBERG, S.L.; SMITH, H.O.; VENTER, J.C.; FRASER, C.M. Evidence for lateral gene transfer between Archaea and Bacteria from the genome sequence of *Thermotoga maritima*. **Nature**, London, v.399, p.323-329, 1999

NEWTON, W.E. Isolated iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. In: STACEY, G.; BURRIS, R.H.; EVANS, H. (Ed.) **Biological nitrogen fixation**, New York: Chapman and Hall, 1993, 943p.

NOTI, J.D.; DUDAS, B.; SZALAY, A.A. Isolation and characterization of nodulation genes from *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) strain IRC78. **Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.**, Washington, v.82, p.7379-7383, 1985.

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

OLIVEIRA, I.A.; VASCONCELLOS, M.J.; SELDIN, L.; PAIVA, E.; VARGAS, M.A.; SÁ, M.N.H. Random amplified polymorphic DNA analysis of effective *Rhizobium* sp. associated with beans cultivated in Brazilian Cerrado soils. **Brasilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.31, p.39-44, 2000.

OLSEN, G. J.; WOESE, C. R.; OVERBEEK, R. The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 176, p. 1-6, 1994.

PAFFETTI, D.; SCOTTI, C.; GNOCCHI, S.; FANCELLI, S.; BAZZICALUPO, M. Genetic diversity of an italian *Rhizobium meliloti* population from different *Medicago sativa* varieties. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.2279-2285, 1996.

PALACIOS, R.; CASTILLO, M.; FLORES, M.; HERNÁNDEZ, G.; MAVINGUI, P.; ROMERO, D. Dynamics of the *Rhizobium* genome. In: TIKHONOVICH, I.A.; ROMANOV, V.J.; PROVOROV, N.A.; NEWTON, W.E. (Ed.) **Nitrogen fixation: fundamentals and applications**. Dodrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995, p.353-357.

PANDEY, P.; KANG, S.C.; MAHESHWARI, D.K. Isolation of endophytic plant growth promoting *Burkholderia* sp. MSSP from root nodules of *Mimosa pudica*. **Current Science**, Bangalore, v.89, n.1, p. 177-180, 2005.

PAPADOPOULOS, D., SCHNEIDER, D.; J. ARBER, M., W.; LENSKI, R., E.; BLOT, M. Genomic evolution during a 10,000-generation experiment with bacteria. **Proceeding National Academic Science**. USA, v.96, p.3807-3812, 1999.

PHILLIPS, D. A. Flavonoids: plant signals to microbes. In: STAFFORD, H.A. & R. K. IBRAHIM (Ed.). **Metabolism in plants**, New York: Plenum, 1992, p.201-231.

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

POSTGATE, J.R.. **The Fundamentals of Nitrogen Fixation**. London:Cambridge University Press, 1982, 252p.

POUPOT, R.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; GAUTIER, N.; PROMÉ, J. C. Wild type *Rhizobium etli*, a bean symbiont, produces acetylfucosylated, *N*-methylated, and carbamoylated nodulation factors. **Journal Biology Biochemistry**, Oxford, v. 270, p. 6050-6055, 1995.

PRINCE, N., P., J.; TALMONT, F.; WIERUSZESHI, J., M.; PROMÉ, D.; PROMÉ, J., C. Structural determination of symbiotic nodulation factors from the broad host-range *Rhizobium* species NGR234. **Carbohydrate Research**, v.289, p.115-136, 1996.

PROVOROV, N. A. & VOROB'EV, N. I. Evolutionary genetics of nodule bacteria: molecular and population aspects. **Russian Journal of Genetics**, Moscow, v.36, p.1323-1335, 2000.

QUEIROZ NETO, J.P. Solos da região dos Cerrados e suas interpretações. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.6, n.1, p.1-12, 1982.

QUINTO, C.; FLORES, M.; LEEMANS, J.; CEVALLOS, M.A.; PARDO, M.A.; AZPIROZ, R.; GIRARD, M.L.; CALVA, E.; PALACIOS, R. Nitrogenase reductase: A

functional multigene family in *Rhizobium phaseoli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.**, Washington, v.82, p.1170-1774, 1985.

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. (Ed.) **Molecular Microbial Ecology Manual**, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998, p. 1-26.

REIS, V.M. Ecology of diazotrophic bacteria other than rhizobia. In: XXI REUNIÓN LATINOAMERICANA DE RHIZOBIOLOGÍA. VI CONGRESO NACIONAL DE LA FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO, 2002. **Resumos**. Cocoyoc, Morelos, México, 2002, p.42.

REIS, V.M.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; TENORIO-SALGADO, S.; VOGEL, J.; STOFFELS, M.; GUYON, S.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V.L.D.; SCHMID, M.; BALDANI, J. I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; CABALLERO-MELLADO, J. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.54, p.2155-2162, 2004.

RITSEMA, T.; WIJFJES, A.H.; LUGTENBERG, B.J.J.; ESPANHAK, H.P. *Rhizobium* nodulation protein NodA is a host-specific determinant of the transfer of fatty acids in Nod factor biosynthesis. **Molecular and General Genetics**, New York, v.251, p.44-51, 1996.

RIVERA, M.C.; JAIN, R.; MOORE, J.E.; LAKE, J.A. Genomic evidence for two functionally distinct gene classes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.**, Washington, v. 95, p.6239–6244, 1998

ROBERTS, G.P.; MacNEIL, T.; MacNEIL, G.; BRILL, W.J. Regulation and characterization of protein coded products by the *nif* (nitrogen fixation) genes of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.136, p.267-279, 1978.

ROBINSON, A.C.; DEAN, D.R.; BURGESS, B.K. Iron-molybdenum cofactor biosynthesis in *Azotobacter vinelandii* requires the iron protein of nitrogenase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.262, p.14327-14332, 1987.

ROMERO, D.; SINGLETON, P.W.; SEGOVIA, L.; MORETT, E.; BOHLOOL, B.B.; PALACIOS, R.; DÁVILA, G. Effect of naturally occurring *nif* reiterations on symbiotic effectiveness in *Rhizobium phaseoli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, p.848-850, 1988.

ROSADO, A.S.; AZEVEDO, F.S.; CRUZ, D.W.; VAN ELSAS, J.D.; SELDIN L. Phenotypic and genetic diversity of *Paenibacillus azotofixans* strains isolated from the rhizoplane or rhizosphere soil of different grasses. **Journal Applied of Microbiology**, Washington, v. 84, p.216-226, 1998.

ROSSBACH, S.; RASUL, G.; SCHNEIDER, M; EARDLEY, B.; de BRUIJN, F.J. Structural and functional conservation of the Rhizopine catabolism (*moc*) locus limited to selected *Rhizobium meliloti* strains and unrelated to their geographical origin. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v.8, p.549-559, 1995.

SÁ, N.M.H; SILVA, K.L.; SELDIN, L.; VASCONCELOS, M.J.V.; PAIVA, E. Genomic heterogeneity within bean nodulating *Rhizobium* strains isolated from Cerrado soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, p.1011-1014, 1997.

SADOWSKY, M.J. & MOAWAD, H.A. The use of rep-PCR DNA fingerprinting to examine competition for nodulation among genetically-related *Bradyrhizobium japonicum*. In: TIKHONOVICH, I.A.; PROVOROV, V.A.; ROMANOV, V.I.; NEWTON, W.E. (Ed.) **Nitrogen fixation: Fundamental and applications**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995, p.673.

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, v.230, p.1350-1354, 1985.

SALLES, J., F.; Van VEEN, J. A.; Van ELSAS, J., D. Multivariate Analyses of *Burkholderia* Species in Soil: Effect of crop and land use history. **Applied and Environmental Microbiology**. Washington, v. 70, n. 7, p. 4012–4020, 2004.

SCHLAMMAN, H.R.M.; OKKER, R.J.H.; LUGTENBERG, B.J.J. Regulation of nodulation gene expression by NodD in rhizobia. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.174, p.5177-5182, 1992.

SCHOLLA, M.H. & ELKAN, G.H. *Rhizobium fredii* sp nov, a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.34, p.484-486, 1984.

SCOTT, K.F. Conserved nodulation genes from the non-legume symbiont *Bradyrhizobium* sp. (*Parasponia*). **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.14, p.2905-2919, 1986.

SEGOVIA, L.; PIÑERO, D.; PALACIOS, R.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, 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**, Washington, v.43, p.374-377, 1993.

SELENSKA-POBELL, S.; GIGOVA, L.; PETROVA, N. Strain-specific fingerprints of *Rhizobium galegae* generated by PCR with arbitrary and repetitive primers. **Journal of Applied Bacteriology**, Washington, v. 79, p. 425-431, 1995.

SHANNON, C.E.; WEAVER, W. **The mathematical theory of communication**. Urbana: University Illinois Press, 1949. 117 p.

SHEN, T., J.; CHAO, A.; LIN, C., F. Predicting the number of new species in further taxonomic sampling. **Ecology**, Ecological Society of America , n.84, v.3,p.798–804, 2003.
SILVA, C.; VINUESA, P.; EGUIARTE, L.E.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SOUZA, V. *Rhizobium etli* and *Rhizobium gallicum* Nodulate Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) in a

traditionally managed Milpa plot in México: population genetics and biogeographic implications. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 884-893, 2003.

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

SIVERIO, F.; CAMBRA, M.; GORRIS, M.T.; CORZO, J.; LÓPEZ, M.M. Lipopolysaccharides as Determinants of Serological Variability in *Pseudomonas corrugata*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.1805-1812, 1993.

SKERMAN, V.B.D.; MCGOWAN, V.; SNEATH, P.H.A. Approved lists of bacterial names. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.30, p.225-420, 1980.

SMITH, B.E. Recent studies on the biochemistry and chemistry of nitrogenase. In: GRESSHOFF, P.M.; ROTH, L.E.; STACEY, G.; NEWTON, W.E. (Ed). **Nitrogen fixation: achievements and objectives**. New York: Chapman and Hall, 1990, p.3-13.
SNEATH, P.H.A. & SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy**. San Francisco: Freeman, 1973. 573p.

SNEL, B.; BORK, P.; HUYNEN, M.A. Genome phylogeny based on gene content. **Nature Genetics**, London, v.21, p. 108-110, 1999.

SOBRAL, B.W.S.; HONEYCUTT, R.J.; ATHERLY, A.G. The genomes of the family *Rhizobiaceae*: size, stability, and rarely cutting restriction endonucleases. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p. 704-709, 1991.

SOUZA, D., M., G. & LOBATO, E. (Eds.). **Cerrado: Correção do solo e adubação**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2002. 416p.

SOUZA, V., ROCHA, M.; VALERA, A.; EGUIARTE, L., E. Genetic structure of natural populations of *Escherichia coli* in wild hosts on different continents. **Applied Environmental Microbiology**. Washington, v.65, p.3373-3385, 1999.

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

SPRENT, J.I. Evolution and diversity in the legume-*Rhizobium* symbiosis: chaos theory? **Plant and Soil**. Dordrecht, v.161, p.1-10, 1994.

STACKEBRANDT, E. & GOEBEL, B.M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v. 44, p. 846-849, 1994.

STACKEBRANDT, E. & LIESACK, W. Nucleic acids and classification. In.: GOODFELLOW, M. & O'DONNELL, A. (Ed.) **Handbook of new bacterial systematics**. London: Academic Press, 1993, p. 151-194.

STAEHELIN, C.; GRANADO, J.; MULLER, J.; WIEMKEN, A.; MELLOR, R.B.; FELIX, G.; REGENASS, M.; BROUGHTON, W.J. & BOLLER, T. Perception of *Rhizobium* nodulation factors by tomato cells and inactivation by root chitinases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.**, Washington, v. 91, p. 2196-2200, 1994.

STRALIOTTO, R. & RUMJANEK, N.G. **Aplicação e Evolução dos Métodos Moleculares para o Estudo da Biodiversidade do Rizóbio**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, Documento 93, 1999, p. 58.

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

STRALIOTTO, R.; CUNHA, C.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.

STRICKER, O.; MASEPOHL, B.; KLIPP, W.; BOHME, H. Identification and characterization of the *nifV-nifZ-nifT* gene region from the filamentous *Cyanobacterium Anabaena* sp. strain PCC 7120. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.179, p.2930-2937, 1997.

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

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

TEIXEIRA, K.R.S.; WULLING, M.; MORGAN, T.; GALLER, R.; ZELLERMANN, E.M.; BALDANI, J.I.; KENNEDY, C.; MELETZUS, D. Molecular analysis of the chromosomal region encoding the *nifA* and *nifB* of *Acetobacter diazotrophicus*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.176, p.301-309, 1999.

TEREFEWOR, Z., LORTET, G., SUOMINEN, L. AND LINDSTRÖM, K. Molecular evolution of interactions between rhizobia and their legume hosts. In.: TRIPLETT, E.W. **Prokaryotic nitrogen fixation**. Wymondham: Horizon Scientific Press, 2000, p.187-206.

THOMAS, P.M.; GOLLY, K.F.; ZYSKIND, J.W.; VIRGINIA, R.A. Variation of clonal, mesquite-associated rhizobial and bradyrhizobial populations from surface and deep soils by symbiotic gene region restriction fragment length polymorphism and plasmid profile analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.1146-1153, 1994.

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

TORO, N. & OLIVARES, J. Analysis of *Rhizobium meliloti* sym mutants obtained by heat treatment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.51, p.11-48, 1986.

ULLMANN, J.S. & McCARTHY, B.J. The relationship between mismatched base pairs and the thermal stability of DNA duplexes. **Biochimica Biophysica Acta**, Amsterdam, v.294, p. 416-424, 1973

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

VAN BERKUN, P.; NAVARRO, R.B.; VARGAS, A.A.T. Classification of the uptake hydrogenase-positive (Hup^+) bean rhizobia as *Rhizobium tropici*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.554-561, 1994.

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

VARGAS, M., A., T.; MENDES, I., C.; CARVALHO, A., M.; LOBO-BURLE, M.; HUNGRIA, M. Inoculação de leguminosas e manejo de adubos verdes. In: SOUZA, D., M., G. & LOBATO, E. (Ed.). **Cerrado: correção do solo e adubação**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2002, 416p.

VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. (Ed.) **Biologia dos solos dos Cerrados**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1997, 524p.

VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R.; MENDES, I.C.; PERES, J.R.R. **Fixação biológica de nitrogênio em solos de Cerrados**. Planaltina:Embrapa Cerrados, 1994, 83p.

VÁSQUEZ, M.; DÁVALOS, A.; DE LAS PEÑAS, A.; SÁNCHEZ, F.; QUINTO, C. Novel organization of the common nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strains. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.173, p.1250-1258, 1991.

VELAZQUEZ, 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**, Rio Piedras, v.72, p.427-436, 1988.

VERSALOVIC, J.; SCNEIDER, 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**, New York, v.5, p.25-40, 1994.

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

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

WANG, E.T.; TAN., Z.Y.; REINHOLD-HUREK, B.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. A multiple antibiotic resistant *Sinorhizobium* group from *Leucaena leucocephala*. In: 17TH NORTH AMERICAN CONFERENCE ON SYMBIOTIC NITROGEN FIXATION, Québec, Canada. **Scientific Publications**, Oxford and Edinburgh, 2000, p.25.

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

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

WERNEGREEN, J.J. & RILEY, M.A. Comparison of the evolutionary dynamics and symbiotic and housekeeping loci: A case for the genetic coherence of rhizobial lineages. **Molecular Biology Evolution**, Arizona, v.16, p.98-113, 1999.

WEST, S.A.; KIERS, E.T.; PEN, I.; DENISON, R.F. Sanctions and mutualism stability: when should less beneficial mutualists be tolerated? **Journal of Evolutionary Ecology** v.15, p.830-837, 2002.

WHITTAM, T.S. Genetic variation and evolutionary processes in natural populations *Escherichia coli*. In: NEIDHARDT, F.C.; CURTISS, R.; INGRAHAM, J.L.; LIN, E.C.C.; LOW, K.B.; MAGASANIK, B.; REZNIKOFF, W.S.; RILEY, M.; SCHAECHTER, M.; UMBARGER, H.E. (Ed.) **Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and molecular biology**. Washington: American Society for Microbiology, 1996, p.2708-2720. WILLIAMS, G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.L.; RAFALSKI, J.A.; TIGEY, S.V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, London, v.18, p.6531-6535, 1990.

YAMAOKA-YANO, D.M.; VALARINI, P.J. Métodos de identificação de bactérias. In: MELO, I.S. & AZEVEDO, J.L. (Ed.) **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998, p.369-389.

YANG, G.P.; DEBELLE, F.; SAVAGNAC, A.; FERRO, M.; SCHILTZ, O.; MAILLET, F.; PROMÉ, D.; TREILHOU, M.; VIALAS, C.; LINDSTROM, K.; DENARIE, J.; PROMÉ, J.C.. Structure of the *Mesorhizobium huakuii* and *Rhizobium galegae* Nod factors: a cluster of phylogenetically related legumes are nodulated by rhizobia producing Nod

factors with alpha, beta-unsaturated N-acyl substitutions. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 34, p. 227–237, 1999.

YANNI, Y.; RIZK, R.; ABD EL FATTAH, F.; SQUARTINI, A.; CORICH, V.; GIACOMINI, A.; DE BRUIJN, F.; RADEMAKER, J.; MAYA-FLORES, J.; OSTROM, P.; VEGA-HERNANDEZ, M.; HOLLINGSWORTH, R.; MARTINEZ-MOLINA, E.; MATEOS, P.; VELAZQUEZ, E.; WOPEREIS, J.; TRIPLETT, E.; UMALI-GARCIA, M.; ANARNA, J.; ROLFE, B.; LADHA, J.; HILL, J.; MUJOO, R.; NG, P.; DAZZO, F. The beneficial plant growth-promoting association of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii with rice roots. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v.28, p.845-870, 2001.

YANNI, Y.G.; RIZK, R.; CORICH, V.; SQUARTINI, A.; NINKE, K.; PHILIP-HOLLINGSWORTH, S.; ORGAMBIDE, G.; DE BRUIJN, F.; STOLTZFUS, J.; BUCKLEY, D.; SCHMIDT, T.; MATEOS, P.; LADHA, J.K.; DAZZO, F.B. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.194, p.99-114, 1997.

YOKOYAMA, L.P. & STONE, L.F. Qualidade, classificação comercial e manejo pós-colheita. In: YOKOYAMA, L.P. & STONE, L.F. (Ed.) **Cultura do feijoeiro no Brasil: Características da Produção**. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA-Arroz e feijão, 2000 p.51-64.

YOKOYAMA, M.; BANNO, K.; KLUTHCOUSKI, J. Aspectos socioeconômicos da cultura. In: ARAUJO, R.S.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J.O. (Ed.) **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba: POTAFOS, 1996, p.771-786.

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

YOUNG, J.P.W. *Rhizobium* population genetics: enzyme polymorphism in isolates from peas, clover, beans, and lucerne grown at the same site. **Journal of General Microbiology**, London, v.131, p.2399-2408, 1985.

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

ZHANG, X. X., TURNER, S. L., GUO, X. W., YANG, H. J., DEBELLÉ, F., YANG, G. P., DÉNARIÉ, J., YOUNG, J. P. W. & LI, F. D. The common nodulation genes of *Astragalus sinicus* rhizobia are conserved despite chromosomal diversity. **Applied Environmental Microbiology**. Washington, v.66, p.2988-2995, 2000.