

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LARICE CAROLINA TAVARES ARMSTRONG

**ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE RIZÓBIOS
ISOLADOS DE FEIJOEIRO COMUM (*Phaseolus vulgaris*
L.) DE DOIS CENTROS DE ORIGEM POR MEIO
DE BOX-PCR**

CURITIBA
2007

LARICE CAROLINA TAVARES ARMSTRONG

**ESTUDO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DE RIZÓBIOS
ISOLADOS DE FEIJOEIRO COMUM (*Phaseolus vulgaris*
L.) DE DOIS CENTROS DE ORIGEM POR MEIO
DE BOX-PCR**

Monografia apresentada à disciplina de
Estágio em Genética como requisito parcial à
conclusão do curso de Ciências Biológicas,
Setor de Ciências Biológicas, da Universidade
Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr. Lygia Galli Terasawa

Co-Orientadora: Mariângela Hungria

CURITIBA

2007

Aos meus pais por todo o sacrificio, dedicaçãõ e amor.

*“...mas os que esperam no Senhor
renovarão as suas forças, subirão com asas
como águias, correrão e não se cansarão,
caminharão e não se fatigarão.”
(Isaiás 40:31)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me amparado em seus braços e me concedido forças e entendimento para chegar até este momento.

Agradeço ao meu pai Ivan Armstrong por ter me dado esperança, apoio, amor e feito do meu sonho o seu também. A minha mãe Rosimeri Armstrong, luz da minha vida.

As minhas irmãs Lillian e Laila pelo cuidado, incentivo e afeto.

A minha querida avó Terezinha Baldão, exemplo de coragem e superação.

As minhas sobrinhas Natacha, Jheovanna e ao pequeno Davi por terem iluminado a minha vida nos momentos mais difíceis e por me fazerem acreditar no futuro.

Aos meus tios Wilson e Terezinha por terem estado ao meu lado em todos os momentos.

A empresa Semilla-Genética e Melhoramento pelo suporte técnico, sem o qual esse trabalho não teria sido realizado.

As professoras Chirlei e Vanessa por me ajudarem nos momentos de desespero.

A minha grande amiga Lisandra, pela companhia, apoio e verdadeira amizade.

As amigas de laboratório Josiane, Juliana F., Josiele, Renata, Maysa, Fernanda, Danyelle e Tatiane pelos conselhos, gargalhadas e ajuda no dia-a-dia. A agregada mais querida do LabGem, Franciele, por ter me ouvido nas horas difíceis.

Ao pessoal do laboratório: Camila, Carol S., Carol, Douglas, Flávia, Patrícia, Rosana pela ótima convivência.

A minha querida orientadora Lygia por ter aberto as portas do mundo da ciência a mim, pela confiança e, principalmente, pela amizade.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	vi
RESUMO.....	vii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVO.....	2
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
3.1. A CULTURA DO FEIJOEIRO.....	3
3.1.1. Histórico.....	3
3.1.2. Origem e Domesticação.....	4
3.1.3. Importância Socioeconômica.....	5
3.2 A IMPORTÂNCIA DO NITROGÊNIO.....	7
3.3 FIXAÇÃO INDUSTRIAL DO NITROGÊNIO.....	9
3.4 TAXONOMIA DOS RIZÓBIOS.....	10
3.5. DIVERSIDADE GENÉTICA EM RIZÓBIOS QUE NODULAM O FEIJOEIRO COMUM.....	13
3.6. ESTRUTURA GENÉTICA DO RIZÓBIO.....	14
3.7. INFECÇÃO E NODULAÇÃO DAS RAÍZES DE LEGUMINOSAS.....	15
3.8 FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO.....	17
A UTILIZAÇÃO DE INOCULANTES.....	18
BOX- PCR.....	19
MATERIAL E MÉTODOS.....	21
MEIOS DE CULTURA.....	21
Meio YMA (VINCENT, 1970).....	21
Meio YMA- Vermelho Congo.....	21
Meio YMA-Azul de Bromotimol.....	21
Meio YMA- Rosa de Bengal.....	22
SOLUÇÕES E REAGENTES.....	22
NaCl 0,25 M.....	22
Acetato de Sódio 0,3 M.....	22
SDS 10%.....	22
Solução Salina 0,85%.....	22
EDTA 0,5 M.....	23
Tris HCl-EDTA (TE) 10:1.....	23
Tris HCl-EDTA (TE) 50:20.....	23
Tris HCl-EDTA (TE) 100:50.....	23
4.2.10. PBS.....	23
4.2.11. DNA polimerase.....	24
dNTPs.....	24
4.2.13. Gel de Agarose (0.8%).....	24
4.2.14. Gel e Agarose (1,5%).....	24
4.2.15. Marcador de peso molecular (DNA <i>Ladder</i> 100pb LUDWIG BIOTEC).....	24
4.2.16. Marcador de peso molecular (DNA de fago lambda clivado com <i>Hind</i> III Gibco).....	24
4.2.17. Solução de Brometo de Etídio (SAMBROOK <i>et al.</i> , 1998).....	25
4.2.18. Tampão de Corrida TBE 10x pH 8,0.....	25
4.2.19. Tampão de Corrida TBE 1x pH8,0.....	25
4.2.20. RNase.....	25
4.2.21. Proteinase K (20 mg/mL).....	25

4.2.22 Lizosima (5mg/mL).....	26
4.2.23. Solução Nutritiva Livre de Nitrogênio.....	26
4.3 EXPERIMENTO A CAMPO.....	26
4.4. EXPERIMENTOS EM VASOS CONTENDO SOLUÇÃO NUTRITIVA ISENTA DE NITROGÊNIO.....	27
4.4.1 NMP (Número mais Provável).....	27
4.4.2. Vasos de Leonard.....	28
4.5. ISOLAMENTO	29
4.6. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS COLÔNIAS	30
4.6.1. Coloração de Gram	31
4.7 EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL.....	31
4.8. OTIMIZAÇÃO DA BOX-PCR.....	32
4.9. ANÁLISE DE CLUSTER	32
4.10. DIVERSIDADE GENÉTICA	32
4.11. MATERIAL BIOLÓGICO.....	33
5. RESULTADOS.....	34
5.1. EXPERIMENTO A CAMPO.....	34
5.2. NMP (Número mais provável).....	35
5.3. VASOS DE LEONARD.....	36
5.4. ISOLAMENTO.....	36
5.5. CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS.....	36
5.6 EXTRAÇÃO DE DNA.....	38
5.7 OTIMIZAÇÃO DA BOX-PCR.....	39
5.7.1 Teste da Diluição do <i>primer</i> BOX-AIR.....	39
5.7.2 Teste da Diluição do DNA.....	39
5.8. BOX -PCR.....	40
5.9 análise da Diversidade Genética.....	42
6. DCUSSÃO.....	44
7. CONCLUSÃO.....	48
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Etapas que compõem o ciclo do Nitrogênio.....	8
Figura 02. Nódulos de raízes de Feijão Comum (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.).....	10
Figura 3. Infecção e Nodulação de raízes de Leguminosas.....	15
Figura 4a. Pêlo radicular sendo infectado por <i>Rhizobium</i>	16
Figura 4b. Complexo Nitrogenase e a Fixação Biológica do Nitrogênio.....	17
Figura 05. Planta à esquerda inoculada com bactérias do gênero <i>radyrhizobium</i> e planta à direita sem inoculação.	18
Figura 06. Vasos contendo solução nutritiva isenta de Nitrogênio.....	27
Figura 07. Montagem dos vasos de Leonard.....	29
Figura 08. Desinfestação dos nódulos coletados. As setas indicam os nódulos.....	30
Figura 09. Primeira (A) e segunda(B) época de Plantio.....	34
Figura 10. Coleta dos Nódulos.....	34
Figura 11. Transferência do experimento da casa de Vegetação	35
Figura 12. Planta com evidente deficiência de Nitrogênio.....	35
Figura 13. Plantas com deficiência de nitrogênio em Vasos de Leonard.....	36
Figura 14. Isolados de <i>Rhizobium</i> de Diamante Negro no Segundo dia de Crescimento.....	36
Figura 15. Morfologia Colonial.....	37
Figura 16. À esquerda <i>Bradirhizobium</i> , no centro controle e à direita isolado de <i>Rhizobium</i>	37
Figura 17. Bacilos Gram Negativo.....	37
Figura 18. Gel de Quantificação Diamante Negro.....	38
Figura 19. Gel de Quantificação Diamante Negro e Goiano Precoce.....	38
Figura 20. Gel de Quantificação. Goiano Precoce e Diamante Negro.....	38
Figura 21. Gel de Quantificação Diamante Negro.....	38
Figura 22. Teste diluição primer	39
Figura 23. Teste diluição DNA.....	40
Figura 24. BOX-PCR de isolados de Goiano Precoce C.O.Andino).....	41

Figura 25. BOX-PCR de isolados de Diamante Negro (C.O.Mesoamericano).....	41
Figura 26. Dendograma mostrando linhagens de rizóbios isolados de feijão comum Goiano Precoce (C.O.Andino).....	42
Figura 27. Dendograma mostrando linhagens de rizóbios isolados de feijão comum Diamante Negro (C.O.Mesoamericana).....	43
Figura 28. Dendograma extraído do trabalho de ALBERTON <i>et al.</i> (2006).....	46
TABELA 01.Código do isolados e origem.....	33

RESUMO

O feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma importante cultura para países em desenvolvimento. No entanto, apesar de o Brasil ser o maior produtor e consumidor mundial desta leguminosa, a sua produtividade ainda é baixa. O feijoeiro é uma leguminosa capaz de se beneficiar de relações simbióticas com bactérias do gênero *Rhizobium*, refletindo incrementos nas taxas de Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN) e conseqüente aumento na produtividade e redução do impacto ambiental decorrente da utilização de fertilizantes. Sabe-se que o feijoeiro comum possui basicamente dois centros de origem: o Andino e o Mesoamericano. Um melhor entendimento a respeito da historia evolutiva da associação bactéria x planta é essencial para a seleção de novas associações simbióticas que resultem em interações mais estáveis e produtivas, do ponto de vista da FBN. O presente trabalho visa um melhor entendimento da variabilidade genética entre os grupos de rizóbios que nodulam feijoeiros de dois centros de origem. Os resultados obtidos indicam que feijoeiros de origem Mesoamericana parecem estabelecer relações mais estáveis com rizóbios, indicando o sentido da seleção para combinações mais eficientes para a FBN.

1. INTRODUÇÃO

O estabelecimento da agricultura foi uma das maiores inovações tecnológicas já observadas, permitindo o desenvolvimento e progresso das civilizações (MAARTEM, 2003). As mudanças decorrentes desta inovação foram tão profundas que marcaram definitivamente a história da humanidade.

A agricultura é a principal base de sustentação de qualquer país, sendo que algumas culturas são particularmente importantes para a manutenção das populações de inúmeros continentes. Como maior produtor e consumidor mundial, grande importância econômica é atribuída ao feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) no Brasil. Trata-se de uma leguminosa que se beneficia da fixação biológica do nitrogênio (FBN), sendo capaz de estabelecer nodulação com bactérias pertencentes à família Rhizobiaceae, coletivamente chamadas de rizóbios. Anteriormente classificado como uma cultura marginal constata-se recentemente uma mudança no perfil do produtor nacional, com crescente utilização de novas tecnologias e ampliação das épocas de cultivo.

Uma perspectiva capaz de contribuir para o incremento dos índices produtivos é o conhecimento da diversidade genética das bactérias do solo. Possibilitando, assim, a identificação de combinações simbióticas mais eficientes com a planta hospedeira, para subsequente produção de inoculantes comerciais. Considerando-se o custo dos fertilizantes nitrogenados e o seu impacto sobre o meio ambiente, estudos visando à 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.

Abre-se assim, uma real perspectiva ao nosso produtor em desfrutar de bons resultados na lavoura, a um custo acessível, decorrente da substituição dos caríssimos adubos nitrogenados e sem causar danos ao meio ambiente.

2. OBJETIVOS

- Caracterizar morfofisiologicamente, simbióticas e geneticamente isolados de feijoeiro comum representativo de dois centros de origem (andino e mesoamericano).
- Otimizar a reação de BOX-PCR.
- Investigar a variabilidade genética de bactérias que nodulam o feijoeiro comum dos dois centros de origem (Andino e Mesoamericano).

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. A CULTURA DO FEIJOEIRO

3.1.1. Histórico

As leguminosas constituem um grupo de plantas que faz parte da história das civilizações. Os feijões (*Phaseolus vulgaris* L.) estão entre os alimentos mais antigos, aparecendo nos primeiros registros da história da humanidade (EMBRAPA, 2007), cujo vestígio arqueológico mais antigo encontrado foi na Idade do Bronze, na Suíça, e no Peru a cerca de 10.000 a.C (GEPTS & DEBOUCK, 1991).

Também há registros de cultivares no antigo Egito, na Grécia e no Império Romano onde, além de cultivados para alimentação, eram cultuados como símbolo da vida. Relata-se que nesses locais os feijões eram utilizados em festas gastronômicas, para pagamento de apostas e, em algumas situações, para votar, sendo que o feijão branco representava um sim e o feijão preto um não (BOTELHO, 2007).

Tribos indígenas do México e do Peru cultivavam o feijoeiro há mais de 7.000 anos. Inclusive aparecendo nas tumbas destas civilizações, panelas de barro decoradas com desenhos de homens e mulheres segurando milho em das mãos e feijão na outra (KAPLAN, 1965). Este fato evidencia que o feijão já se constituía numa espécie domesticada entre os nativos do Peru, sugerindo ter sido a espécie diferenciada das formas nativas, através de seleção para o cultivo (KAPLAN *et al.*, 1973). Acredita-se que o feijão foi levado para a Europa em 1540, livrando o continente da fome e aumentando assim a expectativa de vida da população (VIEIRA, 1967).

A maioria dos historiadores acredita que a disseminação dos feijões no mundo ocorreu devido às guerras, pois esse alimento era parte essencial da dieta dos guerreiros. Nas ruínas da antiga Tróia encontram-se evidências de que os feijões eram o prato favorito dos robustos guerreiros troianos. Além da disseminação pelas guerras, os grandes exploradores foram decisivos na difusão da cultura do feijão para as mais remotas regiões do globo (EMBRAPA, 2007).

Índios brasileiros, por volta do século XVI, chamavam o feijão de “comiãcã”, o qual era preparado juntamente com farinha. Os portugueses incorporaram este hábito na sua refeição e a espalharam por todo o Brasil (BOTELHO, 2007). Atualmente, o feijão constitui um dos principais componentes da dieta alimentar brasileira, sendo a principal fonte de proteínas para grande parte da população.

3.1.2. Origem e Domesticação

A origem evolutiva do feijão comum e sua diversificação primária ocorreu nas Américas (DEBOUCK, 1991), mas o local exato onde isto se deu é ainda motivo de controvérsia (GEPTS & DEBOUCK, 1991).

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

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

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

Análises dos padrões eletroforéticos da faseolina, sugerem que as variedades atuais de feijão são resultados de múltiplos eventos de domesticação, com dois centros primários de domesticado e diversificação genética: O Mesoamericano (México, Colômbia, América Central, Equador e Norte do Peru) e o Andino (Sul Peru, Bolívia e Norte da Argentina). Um terceiro centro é ainda sugerido na região da Colômbia (DEBOUCK, 1986; GEPTS & DEBOUCK, 1991). Além destes centros americanos primários, podem ser identificados vários outros centros secundários em algumas regiões da Europa, Ásia e África, onde foram introduzidos genótipos americanos. No Brasil, a falta de estudos com amostras arqueológicas locais de

feijão dificulta a reconstituição da história regional desta espécie, como, por exemplo, quais tipos foram introduzidos, quando, por onde, por quais grupos humanos, entre outros questionamentos (FREITAS, 2006).

FREITAS (2006) verificou que os padrões de faseolina de sementes encontradas em sítios arqueológicos em Minas Gerais possuíam uma maior influência do centro Mesoamericano. Esses resultados também foram obtidos em milho (*Zea mays*) quando o gene que codifica para a enzima álcool -deidrogenase foi analisado. Os resultados são fortes indicativos de que as sementes de feijão comum e de milho foram introduzidas no País, por viagens ou migração, entre a população indígena brasileira e a mesoamericana no período pré-colonial (GRANGE *et al.*, 2006).

3.1.3. Importância Socioeconômica

O feijão se constitui um importante componente nutricional na dieta alimentar de milhões de pessoas em todo mundo (VELAZQUEZ *et al.*, 1988), sendo uma importante cultura de subsistência e principal fonte de proteínas e aminoácidos essenciais na alimentação de populações pobres, especialmente nas Américas, países africanos e asiáticos (CIAT, 1990).

Seu alto teor protéico e alto teor de lisina exercem efeito complementares às proteínas dos cereais (LAJOLO *et al.*, 1996). As fibras dietéticas encontradas em sua composição têm importantes implicações terapêuticas no tratamento de diabetes e hiperglicemia e preventiva em doenças cardiovasculares e hipertensão arterial (COSTA & VIEIRA, 2000). O feijão também é uma importante fonte de vitaminas, principalmente do complexo B, as quais previnem certos defeitos fetais, cardiovasculares e certos tipos de câncer. (COSTA & VIEIRA, 2000). Devido a estes e outros componentes, o feijoeiro é considerado a leguminosa mais importante para a nutrição humana.

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

A presente importância histórica, cultural e social é inquestionável na sociedade brasileira. A íntima relação do brasileiro com esta leguminosa coloca o

Brasil como maior produtor e consumidor mundial, sendo responsável por 17,6% (3.436.530 milhões de toneladas) da produção mundial, seguido da Índia com 16,2% (FAO, 2007). De acordo com estatísticas divulgadas pela FAO (Food and Agriculture Organization) em 2007, aproximadamente 90,1 % de toda a produção mundial ocorre nos países em desenvolvimento e apenas 9,9 % nos países desenvolvidos. A América Latina e a Ásia juntas são responsáveis por aproximadamente 76% da produção, sendo que o continente europeu é responsável por apenas 2% (FAO, 2007). Através destas estatísticas, percebe-se claramente a importância dos feijões como cultura de subsistência e principal fonte nutricional para populações de baixa renda em todo o mundo.

Apesar de o Brasil ser o grande produtor e consumidor mundial, sua produção interna tem sido insuficiente para abastecer o mercado. Isto ocorre principalmente devido à redução na área plantada, da ordem de quase 28%, nos últimos 17 anos (CONAB, 2007). Esta redução pode ser atribuída a vários fatores, mas especialmente à substituição desta cultura por outras mais rentáveis e voltadas ao mercado externo, como, por exemplo, a soja. Mesmo ocorrendo um aumento de 48% na produtividade, verificado nos últimos 17 anos, ainda assim houve uma diminuição de 4% na produção, não atendendo ainda sua demanda (CONAB, 2007).

Apesar desta insuficiência, a média do consumo "per capita" brasileiro chega a 43,76 g /dia, contra apenas 7,4 g/dia de média mundial (FAO, 2007).

A cultura do feijoeiro no Brasil caracteriza-se como sendo de subsistência, pouco tecnificada e com grande fragilidade agrônômica da lavoura, a qual não resiste bem à seca, ao excesso de chuvas e ainda é facilmente acometida por pragas e doenças (EMBRAPA, 2007). Essa instabilidade resultou em constante oscilação e depreciação dos preços desestimulando os produtores. Apesar deste cenário, tem-se observado nos últimos 20 anos uma mudança do perfil dos produtores, com a crescente implantação de tecnologias avançadas, incluindo a irrigação e a colheita mecanizada (TERASAWA, 2007, comunicação pessoal). Atualmente, seus produtores podem ser classificados em dois grupos: os pequenos, que ainda usam baixa tecnologia e têm sua renda associada às condições climáticas, concentrando a produção no período das águas; e um segundo grupo, mais tecnificado, que obtém altos índices de produtividade, com plantio irrigado por pivô-central, concentrado nas safras da seca e do inverno (TERASAWA, 2007, comunicação pessoal). Apesar do desenvolvimento crescente à produtividade

média nacional tem permanecido em torno de 700 Kg/ha (FAO, 2007), embora o potencial da cultura, sob condições ótimas de manejo, atinja até 5.000 Kg/ha (EMBRAPA, 2007). Entre os fatores limitantes incluem-se: o cultivo em solos marginais, a falta de tecnologia e o fornecimento adequado de nutriente, principalmente de nitrogênio (N) e fósforo (P).

3.2. A IMPORTÂNCIA DO NITROGÊNIO

O nitrogênio (N) é um elemento essencial para a constituição da massa total dos sistemas vivos, pois é componente indispensável na biossíntese de moléculas fundamentais para a vida, tais como ácidos nucleotídeos e aminoácidos (NELSON & COX, 2002). Aproximadamente 78% da atmosfera terrestre é constituída por nitrogênio molecular (N₂) ou dinitrogênio, sendo esta a fonte mais abundante deste elemento (NELSON & COX, 2002). Mas, apesar de sua abundância, as formas solúveis e biologicamente assimiláveis desta molécula são escassas. Nenhum animal ou planta é capaz de utilizá-lo diretamente da atmosfera, devido à tripla ligação existente entre os átomos de nitrogênio (MANYANI, 2000). Esta ligação é uma das mais fortes encontradas na natureza com uma energia de ligação de 942kJ/mol (NELSON & COX, 2002). Assim, a quebra do nitrogênio tem uma energia de ativação extremamente alta e o nitrogênio atmosférico é quase quimicamente inerte nas condições normais (NELSON & COX, 2002).

Entretanto, existe, um número relativamente pequeno de espécies vivas capazes de converter o nitrogênio atmosférico em formas orgânicas assimiláveis para os demais seres vivos, através do processo conhecido como fixação biológica do nitrogênio (FBN). Esses organismos incluem as cianobactérias e algumas bactérias simbiotes de raízes de leguminosas, conhecidas coletivamente como Rizóbios.

O reduzido número desses organismos faz com que os processos metabólicos de todas as espécies viventes funcionem de uma forma interdependente, de maneira a recuperar e reempregar o nitrogênio biologicamente disponível (NELSON & COX, 2002). Este processo de interdependência, faz com que organismos capazes de incorporar nitrogênio atmosférico à moléculas orgânicas

interajam com outros organismos desprovidos desta condição para a reutilização e recuperação do nitrogênio (Figura 01).

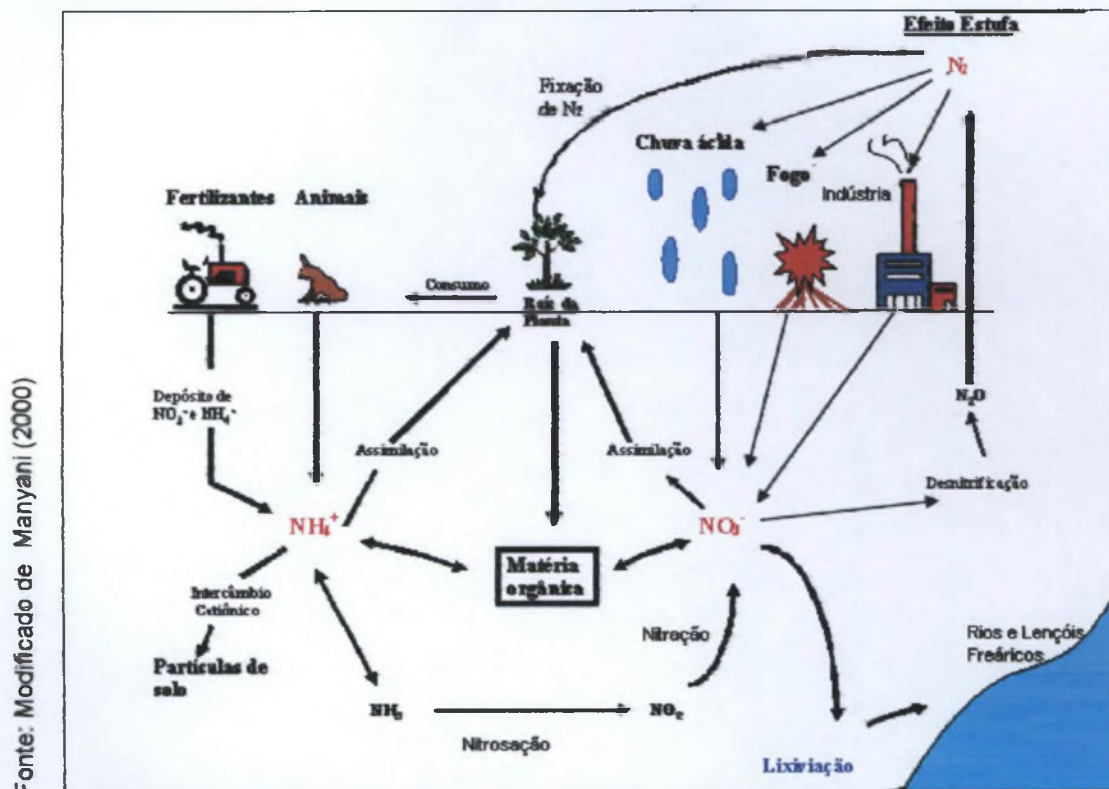


Figura 1. Etapas que compõem o ciclo do Nitrogênio.

A primeira etapa do ciclo é conhecida como fixação (ou redução) e consiste na quebra deste gás atmosférico por bactérias fixadoras de nitrogênio. O produto resultante da fixação é a amônia (NH_3 ou NH_4^+), que pode ser utilizada pelos vegetais, mas pela grande abundância de bactérias do solo, a amônia é convertida por oxidação em nitrito (NO_2^-) pelo processo de nitrosação e, em seguida em nitrato (NO_3^-) pelo processo de nitrificação. Tanto a amônia, quanto o nitrito podem ser absorvidos pelos organismos vegetais, mas a maioria emprega o Nitrato na síntese de aminoácidos e, posteriormente, de proteínas e ácidos nucleicos. Ocorrendo a morte dos organismos sua degradação pela ação dos microrganismos, devolve a amônia ao solo, aonde as bactérias nitrificantes irão convertê-lo novamente em nitrito e nitrato. Para que o equilíbrio entre nitrogênio fixado e nitrogênio atmosférico seja mantido, bactérias anaeróbicas do solo convertem o nitrato novamente em

nitrogênio atmosférico. Esse processo é conhecido como desnitrificação (NELSON & COX, 2002).

Os principais compostos nitrogenados encontrados no solo são: a amônia (ou o íon amônio) e os íons nitrato. Estima-se que cerca de 10% do nitrogênio atmosférico que é trazido para o solo, sob a forma de NO_3^- ou NH_4^+ , foi convertido a tais formas principalmente pelos processos de combustão industrial, atividade vulcânica, queima de florestas e chuva ácida. Além disso, o N_2 pode ser fixado pela indústria (fertilizantes) ou por organismos procariontes (fixação biológica) como visto anteriormente (Figura 1).

Os fertilizantes contribuem com aproximadamente 15% do nitrogênio atmosférico colocado no solo, enquanto que o processo biológico se encarrega de obter os 75% restantes. Portanto, a fixação biológica é de vital importância para a nutrição nitrogenada dos solos (FOSKET, 1994). Devido à estabilidade da molécula de nitrogênio este elemento constitui, juntamente com a água, um dos principais fatores limitantes da produção agrícola mundial (MANYANI, 2000).

3.3. FIXAÇÃO INDUSTRIAL DO NITROGÊNIO

Os teores de nitrogênio encontrados em solos brasileiros não são significativamente elevados, situando-se na faixa de 0,03% a 0,05%. Com o crescimento da agricultura há um aumento na redução dos teores de nitrogênio dos solos, caso estes não sejam repostos (HUNGRIA *et al*, 1994).

Geralmente, a reposição do nitrogênio nos solos é feita através da utilização de fertilizantes nitrogenados. A amônia é produzida industrialmente pelo processo de Haber (de Fritz Haber, seu inventor) que, para obter a energia de ativação necessária para a quebra da tripla ligação entre os átomos de nitrogênio, emprega uma mistura de H_2 (derivado de gás de petróleo) e N_2 submetidos a temperaturas de 400 a 500°C e a pressões de dezenas de milhares de quilopascals (200 a 800 atm) (NELSON & COX, 2002). Assim, os custos para a síntese química de produtos nitrogenados são extremamente elevados, principalmente devido à utilização de componentes provenientes de petróleo. Além do que, a lixiviação dos fertilizantes, particularmente do nitrato, eleva a poluição de rios e lençóis freáticos. Mas, apesar dos custos elevados dos fertilizantes e das conseqüências drásticas que seu uso

causa ao meio ambiente, a sua utilização vem aumentando gradativamente. No período de janeiro a agosto de 2007, segundo dados da CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), as entregas de fertilizantes no Brasil somaram 14,50 milhões de toneladas, superior em 44,8% do volume de igual período do ano passado. Estima-se que as entregas totais deste ano alcançarão o volume historicamente jamais registrado, podendo chegar a 24,0 milhões de toneladas, ou 5,3% superior aos 22,8 milhões de toneladas entregues em 2003 (CONAB, 2007).

Neste contexto adquire grande importância a FBN, pois as tecnologias baseadas neste processo refletem um baixo custo de produção e contribuem de maneira significativa para preservação ambiental.

3.4. TAXONOMIA DOS RIZÓBIOS

Dentre os poucos organismos capazes de fixar o nitrogênio atmosférico encontram-se algumas bactérias simbiotes presentes nas raízes de plantas leguminosas pertencentes à família Rhizobiaceae, coletivamente chamadas de rizóbios (TIGHE *et al*, 2000). Essas bactérias são capazes de formar estruturas altamente específicas nas raízes da planta hospedeira, conhecidas como nódulos, onde ocorre a conversão de nitrogênio atmosférico a amônia (Figura 02). O processo de quebra da tripla ligação da molécula de nitrogênio é possível graças à ação de um complexo enzimático chamado de dinitrogenase (HUNGRIA *et al*, 1997).



Figura 02. Nódulos de raízes de Feijão Comum (*Phaseolus vulgaris* L.)

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

Atualmente os gêneros são separados baseados em seqüências do gene 16S rDNA. Mas, segundo YOUNG & HAUKKA (1996) o agrupamento rizóbio não forma um grupo coerente devido à miscigenação que estes organismos sofrem com outras bactérias não simbiossantes e também ao pouco conhecimento acumulado a respeito desses tipos de bactérias.

Sabe-se que existem no mundo 750 gêneros de leguminosas, contendo 16000-19000 espécies, mas um pequeno número dessas são economicamente exploradas e crescem em grandes áreas, sendo que um percentual pequeno de bactérias que nodulam estas leguminosas foram estudados (ELKAN, 1992). Acredita-se que somente 15% das espécies foram analisadas quanto a sua capacidade nodulatória (ALLEN & ALLEN, 1981).

Existem três espécies, cuja posição filogenética não está suficientemente esclarecida, as quais podem constituir dois novos gêneros em potencial: um representado por *Rhizobium galegae* (LINDSTRÖM, 1995) e *Rhizobium huautlense* (WANG *et al.*, 1998) e um segundo representado por *Rhizobium giardinii* (AMARGER *et al.*, 1997).

Mesmo com a utilização de análises moleculares, a taxonomia rizobial não reflete suas características simbiossantes, particularmente quando trata-se da variedade da planta hospedeira que determinado rizóbio é capaz de nodular. A dificuldade na análise das características simbióticas ocorre devido à complexidade dos mecanismos moleculares envolvidos com a especificidade do hospedeiro. Assim, a

classificação requer um incremento nos testes de nodulação e uma otimização das condições de crescimento da planta (LAGUERRE *et al.*, 2001).

Atualmente, pesquisadores tentam classificar os rizóbios baseando-se não apenas em genes cromossômicos estruturais, como o 16S rDNA, mas também em genes específicos encontrados nos rizóbios que refletem suas características simbiotes, um exemplo é o gene de nodulação (genes *nod*) e o gene de codificação do complexo dinitrogenase (genes *nif*). Mas comparações entre as árvores filogenéticas obtidas das análises destes genes apresentam inúmeras incongruências. Muitas delas devem - se a grande instabilidade genômica dos rizóbios, visto que os genes *nod* e *nif* estão frequentemente localizados em elementos transmissíveis, como plasmídeos ou transposons. Isto permite um intenso intercâmbio entre rizóbios e outras bactérias não nodulantes, resultando numa enorme variedade genotípica (YOUNG & HAUKKA, 1996).

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

Em 1993, isolados americanos obtidos de feijoeiro passaram a constituir uma nova espécie, denominada *Rhizobium etli* (SEGOVIA *et al.*, 1993), a qual possui pelo menos um biovar, *Rhizobium etli* bv. *phaseoli*. Essa nova espécie foi descrita como aeróbica, gram-negativa, com temperatura máxima de crescimento de 35°C. Segundo que esta espécie nodula apenas *Phaseolus vulgaris* e possui como estirpe padrão a CFN42 (USDA 9032). Existem ainda outras espécies e biovars descritas como sendo rizóbio de feijoeiro: *R.gallicum* bv. *gallicum* e *R.giardinii* bv. *giardinii*. Mas

com as constantes mudanças que vem ocorrendo na classificação destas bactérias, outras estirpes sem posição taxonômica podem representar novas espécies.

3.5. DIVERSIDADE GENÉTICA EM RIZÓBIOS QUE NODULAM O FEIJOEIRO COMUM.

O feijão comum é uma leguminosa que possui uma grande habilidade de perceber sinais de nodulação de diferentes tipos de rizóbio. Assim diferentes tipos de rizóbios podem ser isolados do feijão comum, incluindo *R. leguminosarum*, *R. tropici*, *R. etli* (MARTINEZ-ROMERO, 2003; GRANGE & HUNGRIA, 2004), *R. giardinii* (MOSTASSO et al., 2002), *Sinorhizobium spp.*, *Mesorhizobium spp.* (STRALIOTTO et al., 1999; GRANGE & HUNGRIA, 2004), e *Bradyrhizobium* (HUNGRIA et al., 1993), bem como outras estirpes que podem representar novas espécies (MOSTASSO et al., 2002; GRANGE & HUNGRIA, 2004). No entanto, essa grande promiscuidade não se reflete numa alta eficiência na FBN, especialmente com rizóbios de origem indígena, como *Rhizobium tropici* (MICHIELS et al., 1998; HUNGRIA et al., 2000; MARTINEZ-ROMERO, 2003).

De todos os microsimbionte capazes de estabelecer relação simbiótica com o feijoeiro, *R. etli* é a espécie dominante em ambos os centros de diversificação. Em contraste, *R. tropici*, originalmente resgatado de feijões da Colômbia, é a espécie predominante em nodulação à campo de plantas brasileiras (GRANGE et al., 2006).

Estudos recentes realizados por GRANGE et al. (2006) sugerem que *R. tropici* pode ter sido introduzido no Brasil em solos mais antigos ou pode ser um simbionte de alguma espécie de legume indígena que devido a sua tolerância a solos ácidos e condições de alta temperatura transformou-se no microsimbionte predominante de feijão comum.

As altas concentrações de *R. tropici* em nódulos isolados em condições de campo, não são observada quando o solo é diluído, sendo nesta condição *R. etli* a população predominante (GRANGE & HUNGRIA, 2004). Essas diferenças podem ser explicadas por estudos realizados por ALBERTÓN et al. (2006) que evidenciaram uma clara diferença entre as concentrações de rizóbios encontrados em condições de campo e rizóbios encontrados em diluições de solo. Essa diferença de concentrações entre os microsimbionte nessas duas condições, demonstra que

R. tropici pode bloquear a nodulação de *R. etli*, sendo que este bloqueio pode ser a causa da baixa eficiência na FBN observada nos trópicos.

3.6. ESTRUTURA GENÉTICA DO RIZÓBIO

Diversos genes de rizóbios são descritos, sendo os mais importantes os genes de nodulação (*nod*, *nol* e *noe*) e os genes de fixação do nitrogênio (*nif* e *fix*). Os genes *nif* e *fix* apresentam as mesmas funções, ou seja, síntese e regulação da enzima dinitrogenase. Existem também outros genes envolvidos com a superfície das bactérias e que alteram o processo de nodulação, como os genes: *exo* (exopolysaccharides), *lps* (lipopolysaccharides) e *ndv* (1,2-B-glucans, nodule development), além dos genes *hem* (heme) relacionados com a síntese de hemoglobina (HUGHES, 2000).

O genoma de bactérias do gênero *Rhizobium* é constituído de um cromossomo e plasmídios de alto peso molecular. O plasmídio pode estar presente em número de um a seis e pode, ainda, conter até 25% do DNA total da bactéria (BROM *et al.*, 2002)

Apesar de algumas bactérias deste gênero possuírem mais de um plasmídio, observa-se que os genes estruturais da enzima dinitrogenase e grande parte dos genes determinantes da nodulação encontram-se sempre em um único plasmídio, chamado plasmídio simbiótico (*pSym*), sendo que os demais plasmídios, quando presentes, são chamados plasmídios crípticos (MARTINEZ *et al.*, 1990). Nas estirpes dos gêneros *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* as informações, de modo geral, as informações estão contidas do DNA cromossomal (NOTI *et al.*, 1985)

O genoma de *Rhizobium* pode apresentar seqüências reiteradas de DNA, que são regiões genômicas onde ocorre uma cópia de um gene inteiro ou parte deste. Essas cópias podem ser necessárias para a expressão e efetividade do processo de FBN, mas também podem representar sítios de recombinação genética. Este processo de recombinação foi observado na construção de um mapa físico de *R. etli* (CFN42), no qual foram encontrados 700 elementos reiterados pertencentes a 200 famílias diferentes (GIRARD *et al.*, 1991).

A recombinação pode ter inúmeras conseqüências como: ampliações, deleções e co-integração de plasmídios (HUNGRIA *et al.*, 1997). Estes rearranjos

gênicos significam a base da variabilidade e, em alguns casos, da perda da capacidade de nodular e/ou fixar o N_2 (MARTINEZ-ROMERO, 1994).

A dinamicidade genômica pode também possibilitar algumas vantagens como, por exemplo, melhor adaptação frente a alterações do meio e incrementos nas taxas de FBN (ROMERO *et al.*, 1988)

3.7. INFECÇÃO E NODULAÇÃO DAS RAÍZES DE LEGUMINOSAS

A relação existente entre a planta hospedeira e o rizóbio é de mutualismo ou simbiose. Nesta relação ambas as espécies são beneficiadas com a associação. No entanto, é essencial que ambas sofram mudanças prévias necessárias para o estabelecimento de uma associação benéfica. As mudanças na bactéria visam o recebimento de fontes de carbono da planta hospedeira, para prover ATP e poder redutor para a fixação do nitrogênio. Já as mudanças na planta hospedeira visam assimilar a amônia produzida pelas bactérias. A formação e o estabelecimento do nódulo é um processo muito complexo, que ocorre em várias etapas e que requer uma ampla troca de sinais entre ambos os organismos (HUNGRIA *et al.*, 1994) (Figura 03).

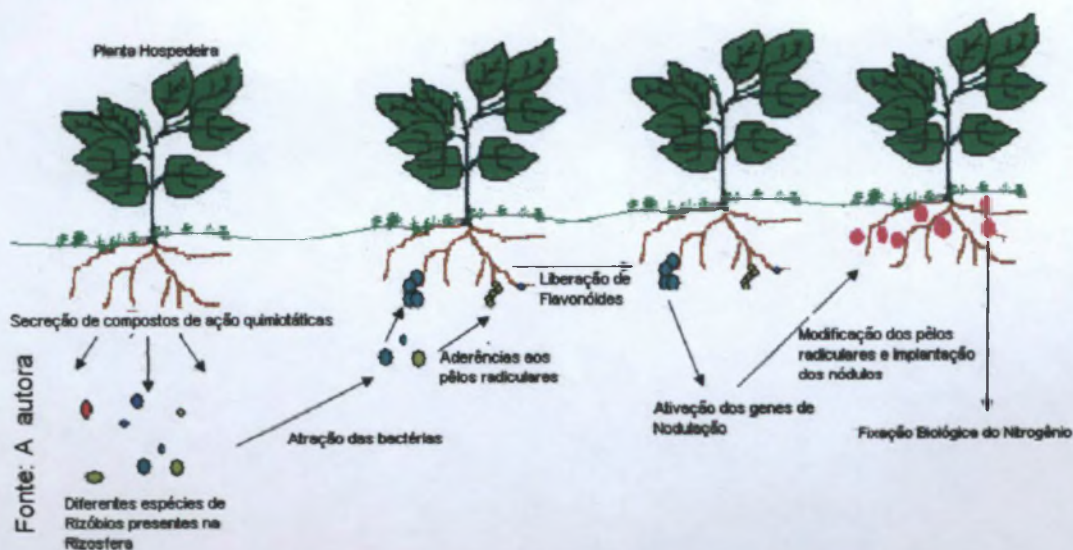


Figura 3. Infecção e Nodulação de raízes de Leguminosas.

Inicialmente, a planta hospedeira excreta sobre o rizóbio compostos de ação quimiotática (açúcares, aminoácidos e ácidos dicarboxílicos) que facilitam a colonização rizosférica e estimulam o crescimento bacteriano (HUNGRIA & STACEY, 1997). Estes compostos atraem as bactérias até as raízes da planta hospedeira que, em seguida, aderem-se aos pêlos radiculares em um processo estável e irreversível. O processo de aderência aos pêlos radiculares da planta ocorre em duas etapas. Na primeira as células bacterianas isoladamente aderem-se a superfície radicular, provavelmente a sítios específicos. Em seguida, outras bactérias aderem-se as que já estão presas aos pêlos radiculares. Simultaneamente à adesão das bactérias inicia-se uma troca de sinais moleculares entre os dois organismos (HUNGRIA *et al.*, 1997). A planta hospedeira libera sinais (principalmente, flavonóides) que são responsáveis pela ativação de genes rizobiais de nodulação, *nod*, *nol* e *noe* (HUNGRIA *et al.*, 1994). Assim, inicia-se a transcrição dos genes de nodulação na bactéria, que produzem sinais específicos para cada planta hospedeira. Estes sinais produzidos pelas bactérias e codificados pelos genes de nodulação foram identificados como oligossacarídeos lipo-quitínicos (LCO), denominados genericamente de fator "Nod" ou molécula sinal. As moléculas sinal estimulam modificações radiculares como: deformação, aumento e encurvamento dos pêlos radiculares, formação de raízes curtas e grossas. (HUNGRIA *et al.*, 1994)

Em seguida, pela da extremidade do pêlo radicular, ocorre a invaginação da membrana plasmática e a posterior penetração dos rizóbios na raiz. Ao redor do local de penetração ocorre deposição de um material semelhante á parede celular, chamado cordão de infecção sobre o qual bactérias proliferam-se (HUNGRIA *et al.*, 1997),

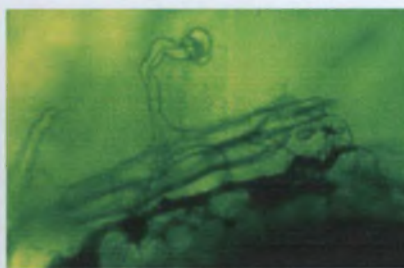


FIGURA 4 a. Pêlo radicular sendo infectado por *Rhizobium*

Após o estabelecimento dos nódulos as bactérias transformam-se em bacterióides (HUNGRIA *et al.*, 1997), que são bactérias sem parede celular, com maior volume e com uma membrana peribacteroidal, que controla o Intercâmbio de metabólitos entre as bactérias e a planta. Na seqüência, genes de fixação são ativados, produzindo as enzimas relacionadas com a quebra da tripla ligação do nitrogênio, iniciando-se efetivamente o processo de FBN (HUNGRIA *et al.*, 1997),

A troca de sinais moleculares entre planta hospedeira e a bactéria constitui um processo intenso e complexo, carecendo de uma ampliação do seu entendimento para o desenvolvimento de novas tecnologias relacionadas à área de Rizobiologia.

3.8. FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO

A fixação biológica do Nitrogênio envolve uma complexa rede de reações químicas (Figura 4). A nitrogenase ou dinitrogenase é o complexo enzimático responsável por estas reações, ou seja, pela redução do N_2 a amônia (NELSON & COX, 2002).

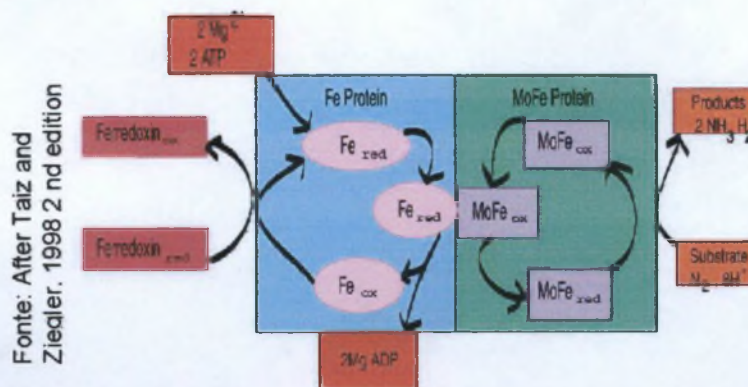


Figura 4b. Complexo Nitrogenase e a Fixação Biológica do Nitrogênio.

Em *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* foram encontradas dinitrogenases-molibdênio (HUNGRIA, 1994). Este complexo enzimático é formado por dois componentes. O componente I é conhecido como redutase da dinitrogenase (proteína Ferro), sendo

formada por um dímero de subunidades idênticas (γ_2). Estas subunidades são codificadas pelo gene *nifH* (EADY, 1991).

O componente II é um tetrâmero $\alpha_2\beta_2$, que possui 2 átomos de molibdênio, 30 de ferro e 30 de enxofre por tetrâmero. As subunidades α são codificadas pelo gene *nifD* e a β pelo gene *nifK* (EADY, 1991). O componente II é também conhecido como dinitrogenase (proteína Mo-Fe).

Estima-se que são fixados anualmente no mundo cerca que 44-66 milhões de toneladas de N_2 , sendo que quase a metade é utilizada na agricultura (ALBERTON *et al.*, 2006). Diante do contexto atual, a FBN e a utilização de tecnologias relacionadas a este processo são de essencial importância para a preservação ambiental e para o desenvolvimento de uma economia sustentável.

3.9. A UTILIZAÇÃO DE INOCULANTES

Um das tecnologias baseadas na FBN é a utilização de inoculantes em diversas culturas de leguminosas. Este corresponde a todo o material contendo microrganismos que atua favoravelmente no desenvolvimento das plantas (EMBRAPA, 2007). Os inoculantes contêm bactérias específicas para cada espécie de leguminosa. Por este motivo, o produto preparado para uma leguminosa não pode ser utilizado em outras espécies. Como o nitrogênio é um dos elementos essenciais para o crescimento das plantas, a utilização destes produtos atua de maneira a aumentar a produtividade da cultura (Figura 5).



Figura 05. Planta à esquerda inoculada com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* e planta à direita sem inoculação. (Foto cedida por Lygia Galli Terasawa).

O mercado brasileiro de inoculantes com estirpes de rizóbio é um dos maiores do mundo, tendo sido comercializados na safra 2001/2002, 14 milhões de doses, sendo que mais de 95 % destinados para a cultura da soja e cerca de 4 % para a cultura do feijoeiro (CHUEIRO *et al.*, 2003). Além do aumento da produtividade a utilização de inoculantes promove outros benefícios, tais como: melhoria da qualidade dos solos, redução de custos, redução da quantidade de adubos nitrogenados e, conseqüente, preservação ambiental (EMBRAPA, 2007)

3.10. BOX- PCR

A técnica da PCR (do inglês *polimerase chain reaction*) é um advento relativamente recente na história da biologia molecular representado um dos maiores passos das Ciências Biológicas durante o século XX. Esta técnica é tão importante que, em 1994, seu inventor ganhou o prêmio Nobel, pois seu feito possibilitou o sequenciamento de genomas, a expressão de genes recombinantes, estudo de genética molecular, entre outros (MICKLOS *et al.*, 2005). A técnica foi desenvolvida por Mullis, *et al.* em 1987, que conseguiu desenvolver um mecanismo que permitia obter cópias específicas de segmentos específicos. Mullis conseguiu essa especificidade introduzindo o conceito de *primer* de PCR e na utilização de uma DNA polimerase termoestável. A DNA polimerase escolhida foi a "Taq"-polimerase uma enzima termoestável isolada de bactérias de fontes termais *Thermus aquaticus*. Esta consegue manter-se estável em temperaturas de até 117°C, com temperatura ótimas de 72°C. Os primers, por sua vez, são oligonucleotídeos, normalmente, de 20 pares de bases que são sintetizados *in vitro*. Estes primers são complementares às extremidades da região de DNA que se pretende amplificar, sendo, portanto, utilizados para iniciar a síntese de DNA nas fitas simples geradas pelo aquecimento do DNA do genoma inteiro. (MATIOLI & PASSOS-BUENO, 2003)

Em 1989 desenvolveu-se o termociclador automático. A invenção deste equipamento trouxe maior agilidade e eficiência à técnica.

A idéia básica da técnica de PCR é bastante simples. Trata-se de uma metodologia *in vitro* que possibilita a reprodução de milhares de cópias de um determinado fragmento de DNA. Através desta técnica, uma seqüência particular de

interesse pode ser amplificada, tornando-se majoritária na amostra de DNA (MATIOLI & PASSOS-BUENO, 2003).

A PCR permite que o DNA de uma região selecionada do genoma seja amplificado um bilhão de vezes. Cada ciclo duplica a quantidade de DNA do ciclo anterior (crescimento exponencial). Após cada ciclo da síntese de DNA os fragmentos novos gerados servem como molde e, dentro de poucos ciclos o produto predominante é uma única espécie de fragmento de DNA, cujo comprimento corresponde à distância entre os dois iniciadores originais. Aproximadamente 20 a 30 ciclos de reação são suficientes para a amplificação efetiva do DNA. Estima-se que ao final de 30 ciclos de amplificação existem, tipicamente, um milhão de moléculas do DNA de interesse para cada molécula molde original da amostra inicial (MATIOLI & PASSOS-BUENO, 2003).

A multiplicação destes trechos específicos se dá alternando-se a temperatura entre: a desnaturação das cadeias de DNA genômico, anelamento dos primers e temperatura ótima específica da enzima: (72°C).

A análise genética por meio de PCR utilizando "primers" específicos na rizobiologia tem desempenhado importante papel nos estudos de diversidade genética. Sequências repetitivas intergênicas, de consenso, dispersas no genoma bacteriano, conhecidas como ERIC, REP e BOX, geram padrões altamente característicos quando separados em gel de agarose (DE BRUIJN, 1992; VERSALOVIC *et al.*, 1994). As seqüências BOX possuem aproximadamente 154 pares de base, parecendo estar envolvidas na duplicação do DNA. Sua ação seria com a DNA girase e terminação da transcrição (MEHTA, 2000). Os padrões de amplificação são menos complexos que os obtidos com REP/ERIC, mas permitem uma boa discriminação ao nível de estirpe (OLIVE & BEAN, 1999).

A BOX-PCR é mais umas das variações que baseiam-se nos conceitos básicos da PCR. Esta técnica utiliza-se de apenas um "primer" (como no RAPD), mas de seqüência conhecida. O resultado é a obtenção de vários padrões de bandas e de "fingerprints" genômicos de indivíduos, variedades e populações. A análise dos produtos da BOX-PCR permite estabelecer as relações filogenéticas entre diferentes espécies.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MEIOS DE CULTURA

4.1.1. Meio YMA (VINCENT, 1970)

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

Completou-se o volume para 1000mL com água destilada. O pH foi ajustado entre 6,7-6,9 com NaOH 1 mol/L e/ou HCl 1N conforme a necessidade. O meio foi autoclavado e armazenado à temperatura ambiente.

4.1.2. Meio YMA- Vermelho Congo

Adicionou-se ao Volume final de 1000 mL do Meio YMA 2,5 mL do corante Vermelho Congo (1%). O pH foi ajustado entre 6,7-6,9 e o meio foi autoclavado e armazenado à temperatura ambiente.

4.1.3. Meio YMA-Azul de Bromotimol

Adicionou-se ao Volume final de 1000 mL do Meio YMA 5 mL do corante Azul de Bromotimol (0,5%). O pH foi ajustado entre 6,7-6,9 e o meio foi autoclavado e armazenado à temperatura ambiente.

4.1.4. Meio YMA-Rosa de Bengal

Adicionou-se ao Volume final de 1000 mL do Meio YMA 0,003 g do fungicida Rosa de Bengal. O pH foi ajustado entre 6,7-6,9 e o meio foi autoclavado e armazenado à temperatura ambiente.

4.2. SOLUÇÕES E REAGENTES

4.2.2. NaCl 0,25 M

NaCl	14,61g
Água Milli-Q	p/1000 mL

A solução foi autoclavada e mantida a 4 °C.

4.2.3. Acetato de Sódio 0,3 M

Acetato de Sódio Anidro	24,63g
Água Milli-Q	p/1000 mL

A solução foi autoclavada e mantida a 4 °C.

4.2.4. SDS 10%

Dodecil sulfato de sódio	10g
H ₂ O Milli-Q	p/100mL

A solução foi autoclavada e mantida a temperatura ambiente.

4.2.5. Solução Salina 0,85%

NaCl	85g
Água Destilada	p/ 1000mL

A solução foi autoclavada e mantida a 4 °C.

4.2.6. EDTA 0,5 M

EDTA	37,22g
Água Destilada	p/200 mL

Ajustou-se o para pH 8,0 com a adição de NaOH 1M.

4.2.7. Tris HCl-EDTA (TE) 10:1

Tris-HCl 1M pH8,0	1mL
EDTA 0,5 M pH8,0	0,2mL
Água Milli-Q	p/98,8 mL

4.2.8. Tris HCl-EDTA (TE) 50:20

Tris-HCl 1M pH8,0	5mL
EDTA 0,5 M pH8,0	4mL
Água Milli-Q	p/ 91 mL

4.2.9. Tris HCl-EDTA (TE) 100:50

Tris-HCl 1M pH8,0	10mL
EDTA 0,5 M pH8,0	10mL
Água Milli-Q	p/ 80 mL

4.2.10. PBS

NaCl	1,745g
Na ₂ HPO ₄ anidro	0,568g
Água Destilada	p/ 100 mL

Ajustou-se o pH para 7,4 com HCl 1M. A solução foi autoclavada e mantida a 4°C.

4.2.11. DNA polimerase

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

4.2.12 dNTPs

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

4.2.13. Gel de Agarose (0.8%)

Agarose	0,8g
Tampão TBE1x	100mL

4.2.14. Gel e Agarose (1,5%)

Agarose	1,5g
Tampão TBE 1x	100mL

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

O marcador de peso molecular foi diluído no momento do uso na proporção de: 1 μ L de marcador : 1 μ L do tampão da amostra : 4 μ L de água Milli-Q autoclavada.

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

O marcador de peso molecular foi diluído no momento do uso na proporção de: 1 μ L de marcador : 1 μ L do tampão da amostra : 4 μ L de água Milli-Q autoclavada.

4.2.17. Solução de Brometo de Etídio (SAMBROOK *et al.*, 1989)

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

4.2.18. Tampão de Corrida TBE 10x pH 8,0

Trizma base	54g
Ácido Bórico (H ₃ BO ₃)	27,5g
EDTA	4,65g
H ₂ O Milli-Q	p/ 500mL

4.2.19. Tampão de Corrida TBE 1x pH8,0

TBE 10x	100 mL
Água Milli-Q	p/ 900 mL

4.2.20. RNase

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

4.2.21. Proteinase K (20 mg/mL)

Adicionou-se 200 mg de Proteinase K à 10 mL de Água Milli-Q. A solução foi estocada a -20°C.

4.2.22 Lizozima (5mg/mL)

Adicionou-se 5 mg de Lizozima à 1mL de Tampão TE 100:50. A solução foi estocada a -20°C.

4.2.23. Solução Nutritiva Livre de Nitrogênio

Soluções estoques

1. CaCl ₂ . 2H ₂ O	14,05g
Água Destilada	p/1000mL
2. KH ₂ PO ₄	68,05g
Água Destilada	p/1000mL
3. Fe-EDTA	3,67g
MgSO ₄ .7H ₂ O	61,65g
K ₂ SO ₄	43,50g
MnSO ₄ .H ₂ O	0,169g
Água Destilada	p/1000mL
4. H ₃ PO ₃	0,124g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,144g
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,05g
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0,0553g
Água Destilada	p/1000mL

Adicionou-se 1,0 mL de cada solução estoque para um volume final de 1000mL de Água destilada. O pH foi ajustada para 6,8 e a solução foi autoclavada.

4.3 EXPERIMENTO A CAMPO

Utilizou-se variedades de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.), cv Goiano Precoces (GP) e o cv Diamante Negro (DN), de origem andina e mesoamericana, respectivamente. O plantio foi realizado na empresa de melhoramento Semília – Genética e Melhoramento, localizada em Bateias, Campo Largo, PR.

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

O plantio das sementes foi distribuído em duas linhas de 4,0 m para cada uma das duas variedades, contendo uma planta a cada 20 centímetros, totalizando 20 plantas por linha. Cerca de quarenta dias após o plantio, foram coletadas as raízes das plantas para o isolamento dos rizóbios a partir de 50 nódulos destacados ao acaso, por variedade, compondo a primeira coleção de isolados ICA (isolados de campo).

4.4. EXPERIMENTOS EM VASOS CONTENDO SOLUÇÃO NUTRITIVA ISENTA DE NITROGÊNIO

4.4.1 NMP (Número mais Provável)

Para a montagem desse experimento utilizaram-se vasos com capacidade para 500mL, preparados com solução nutritiva estéril isenta de nitrogênio (Item 4.2.23), papel absorvente poroso utilizado como suporte para a planta, papel alumínio para cobertura. Após a montagem os vasos foram esterilizados a 121°C e 1,5 atm, durante 20 minutos (Figura 06) (ANDRADE & HAMAKAWA, 1994).

As sementes foram desinfestadas utilizando álcool comercial, hipoclorito de sódio a 10% e água deionizada estéril, conforme VINCENT (1970) e mantidas em estufa a 22°C por três dias. Após a pré-germinação as sementes foram transferidas para os vasos.



Figura 06. Vasos contendo solução nutritiva isenta de Nitrogênio

Para a diluição seriada de solo para produção de inóculo, foi amostrado o ~~mesmo~~ solo do experimento a campo (Item 4.3). Para tanto se preparou uma suspensão com 10 g da amostra de solo diluída em 95 mL de solução de NaCl a 0,85% que, após agitação por 30 minutos, seguiu a série de diluição até 10^{-8} .

A inoculação foi realizada aproximadamente 5 dias após a transferência das sementes pré-germinadas para os vasos. De cada passo da série de diluições foi retirada uma alíquota de 500 μ L que foi inoculada na região da radícula de cada planta. Cada fator de diluição teve quatro repetições para cada uma das duas variedades representantes de cada centro de origem (Andino e Mesoamericano), resultando num total de 64 vasos (dois centros de origem x oito fatores de diluição x quatro repetições). Os vasos foram mantidas em casa de vegetação na Empresa Semília –Genética e Melhoramento.

A diluição em série deste solo permitirá quantificar a população bacteriana presente usando o método NMP, número mais provável (SOMASEGARAN & HOBEN, 1985).

4.4.2. Vasos de Leonard

Para a montagem dos vasos foram utilizadas garrafas de vidro com volume de aproximadamente 1000 mL, solução nutritiva isenta de nitrogênio (Item 4.2.23), mistura de areia e vermiculita(1/2, v/v), papel alumínio e gases. Depois de preparados os vasos foram esterilizados por 121°C e 1,5 atm, durante 20 minutos (Figura 06) (ANDRADE & HAMAKAWA, 1994) (Figura 07).

Em cada vaso foram plantadas duas sementes dos cv Goiano Precoce (andino) e cv Diamante Negro (mesoamericano), desinfestadas com álcool comercial (3 minutos) e hipoclorito de sódio a 10% (1 minuto) e água deionizada estéril (6 lavagens). Para a diluição seriada de solo para o inóculo das duas variedades de feijoeiro, foi amostrado o mesmo solo do experimento a campo (Item 4.3).



Figura 07. Montagem dos vasos de Leonard

Preparou-se uma suspensão com 10 g da amostra de solo diluída em 95mL de solução de NaCl a 0,85% que, após agitação por 30 minutos com pérolas de vidro, seguirá a série de diluição até 10^{-4} .

A inoculação foi realizada aproximadamente 10 dias após o plantio, quando as sementes já haviam emitido a sua parte aérea. Nos vasos foi inoculado 1 mL por semente da cultura de cada tratamento. Para este experimento utilizou apenas os fatores de diluição 10^{-2} e 10^{-4} .

Cada fator de diluição teve duas repetições para cada uma das duas variedades representantes de cada centro de origem (Andino e Mesoamericano), resultando num total de 16 vasos (dois centros de origem x quatro fatores de diluição x duas repetições). Os vasos foram mantidas em casa de vegetação na Empresa Semilla-Genética e Melhoramento, sendo que a solução nutritiva (Item 4.2.23) era repostada a cada sete dias.

4.5. ISOLAMENTO

Os nódulos foram destacados das raízes das plantas com pinças e, em seguida, lavados sob água corrente. Em uma placa de ELISA, os nódulos foram desinfestados com hipoclorito de sódio a 10% (1 minuto), álcool comercial (3 minutos) e água deionizada estéril (6 lavagens) (Figura 08).



Figura 02. Desinfestação dos nódulos coletados. As setas indicam os nódulos.

Na última lavagem com água deionizada estéril os nódulos foram *macerados* e transferidos para uma placa contendo meio YMA- Rosa de Bengal e cultivados durante cinco dias a 28°C. As placas que apresentassem crescimento bacteriano, livre de contaminação, tiveram suas bactérias transferidas para placas contendo meio YMA-Vermelho Congo. Após a confirmação do isolamento de bactérias do gênero *Rhizobium*, pela análise da não absorção do corante vermelho Congo a coleção foi montada.

4.6. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS COLÔNIAS

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

4.6.1. Coloração de Gram

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

- Preparo do esfregaço (diluído em uma gota de água destilada) em lâmina.
- Esperar Secar
- Fixar três vezes na Chama

- Cobrir o esfregaço com Violeta de Genciana por 2 minutos.
- Escorrer o excesso e cobrir com lugol por 1 minuto
- Lavar para retirar o excesso de corante
- Descorar com álcool comercial por 15 segundos
- Lavar e cobri com Fucsina básica por 4 minutos.
- Lavar e deixar secar ao ar
- Observar em Microscópio Óptico em Objetiva de Imersão.

4.7 EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL

O DNA dos isolados foi extraído como descrito por KASCHUK *et al.*(2005), com algumas modificações. As bactérias foram crescidas em tubos de 2,0 mL contendo meio líquido YMA e mantidas sobre agitação durante três dias a 28°C. Após o crescimento a cultura de bactérias foi centrifugada a 15000rpm por 20 minutos e, lavadas por três vezes com PBS. Após a última lavagem o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 500µL de TE 50:20 (50 mM de Tris, pH 7,5; 10 mM de EDTA, pH 8,0)

Em seguida, adicionou-se 50µL de SDS 10%, 10µL de Lisozima (5mg/mL de água, mantida no congelador), 5µL de Proteinase K (20mg/mL de água, mantida no congelador) e 1µL de RNase (10mg/mL). A mistura foi homogenizadas e e seguia a incubação a 37°C por uma hora (até clarear). Após a incubação, com uma micropipeta de 1000µL homogenizou-se a mistura, com movimento de sucção/liberação a fim de retirar a viscosidade. A seguir foi acrescentado 30µL de NaCl 0,25M e 60 µL de AcNa 0,3M. As amostras foram bem homogeneizadas e deixadas em repouso por 1 hora a 4°C

Em seguida, centrifugou a 12000rpm por 15 minutos e recolheu-se o sobrenadante, que foi transferido para tubos de 1,5 mL novos e adicionou-se 2 vezes o volume de Etanol 95% (à frio). Incubou-se a -20°C overnight. 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 em estufa a 37°C por 30-40 minutos e, em seguida, ressuspenso em TE 10:1. O DNA extraído foi estocado a -20 °C. Todas as soluções foram previamente autoclavadas.

O DNA obtido foi quantificado e sua integridade verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8% (Item 4.2.13.), e visualizada com brometo de etídeo (Item 4.2.17.) sob luz ultra-violeta e fotografados com aparato Kodak Digital Science 120.

4.8. OTIMIZAÇÃO DA BOX-PCR

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

Para a otimização da BOX-PCR, tanto as concentrações de DNA, como de dNTP e primers foram testadas. Os ciclos utilizados também foram testados até se obter os parâmetros ideais para a reação. A reação foi realizada de acordo com as condições descritas por KASCHUK *et al.* (2005), contendo: 50ng da DNA, tampão PCR 1x, 0,3 U de *Taq* DNA polimerase, 0,1 mM de *primers*, 0,5 mM de cada dNTP, 2,4 mM de MgCl₂ e um volume final de 25 µl. A amplificação seguiu uma desnaturação inicial a 95° C por 7 minutos; 35 ciclos de 1 min a 94° C, 1 minuto a 53° C, e 1 minuto a 72° C; e extensão final de 4 minutos a 72° C. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese a 98V em gel de agarose 1,5% (4.2.14), em tampão TBE 1 X que, após 3 horas, foi corado com brometo etídeo (4.2.17) e visualizado em um transluminador com lâmpada UV. Os géis foram fotografados por uma câmera digital Kodak Digital Science 120.

4.9. ANÁLISE DE CLUSTER

As análises de "cluster" dos produtos de amplificação com BOX-PCR serão submetidas ao programa de análise Bionumerics (Applied Mathematic, Kortrijk, Belgium), com o método de agrupamento algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method, Método de agrupamento de Médias Aritméticas) e com o coeficiente de Jaccard (J) (SNEATH & SOKAL, 1973), com uma tolerância de 2%.

4.10. DIVERSIDADE GENÉTICA

Índices de diversidade (SHANNON & WEAVER, 1949) e de riqueza (MARGALEF, 1958), serão estimados baseados no número de isolados

pertencentes ao grupo de perfis BOX-PCR, considerando 70% de similaridade na análise do cluster com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard (J).

4.11. MATERIAL BIOLÓGICO

O material biológico utilizado neste trabalho compreende uma coleção de 88 isolados de bactérias isoladas feijoeiro comum do gênero *Rhizobium*, e quatro estirpes de referência. A coleção foi montada a partir dos isolados do solo no experimento a campo (ICA) e conservadas a 4° C em tubos contendo meio YMA (Tabela 01).

TABELA 1: CÓDIGO DAS LINHAGENS E ORIGEM.

Código	Origem	Total
Diamante Negro DN2, DN3, DN7, DN8, DN9, DN10, DN11, DN12, DN15, DN16, DN18, DN19, DN20, DN21, DN23, DN24, DN33, DN35, DN36, DN38, DN42, DN44, DN45, DN49, DN50, DN51, DN52, DN53, DN51, DN52, DN53, DN54, DN44, DN56, DN58, DN59, DN60, DN61, DN62, DN 63, DN 65, DN66, DN67, DN70, DN71, DN72, DN 74, DN75	Mesoamericana SEMILIA- Genética e Melhoramento /Paraná- Brasil	48
Goiano Precoce GP1, GP2, GP3, GP4, GP5, GP7, GP8, GP9, GP10, GP11, GP12, GP13, GP14, GP15, GP17, GP18, GP19, GP20, GP22, GP23, GP24, GP25, GP26, GP27, GP28, GP29, GP31, GP32, GP33, GP34, GP35, GP36, GP40, GP41, GP42,GP43, GP44, GP45, GP46, GP47	Andina SEMILIA-Genética e Melhoramento / Paraná-Brasil	40
Linhagens Referência¹	04	
<i>Rhizobium tropici</i> type B CIAT 899	Colômbia	
<i>Rhizobium tropici</i> type A CFN 299	México	
<i>Rhizobium tropici</i> PRF 81	Brasil	
<i>Rhizobium etli</i> bv phaseoli CFN 42	México	
Total		92

¹Linhagens gentilmente cedidas pela Embrapa Soja-Londrina/Pr
Fonte: A autora.

5. RESULTADOS

5.1. EXPERIMENTO A CAMPO

O primeiro plantio a campo foi realizado no mês de Agosto, coincidindo com o inverno (Figura 09). Por este motivo muitas das plantas não sobreviveram, resistindo apenas algumas plantas da cv Diamante Negro. No segundo e terceiro plantios foi montada uma estrutura em forma de arco coberto com um material plástico, com o objetivo de proteger as plantas das geadas, que funcionava como uma estufa (Figura 09). Esse procedimento foi bastante favorável, pois as plantas apresentaram-se mais vigorosas e suas raízes desenvolvidas com bastante nódulos. De modo geral, as variedades de feijão Diamante Negro apresentavam mais nódulos que as variedades de Goiano Precoce.



Fonte: A autora

Figura 09. Primeira (A) e segunda(B) época de Plantio.



Fonte: A autora

Figura 10. Coleta dos Nódulos

5.2. NMP (Número mais provável)

A montagem desse experimento ocorreu no mês de Outubro, coincidindo com um período de elevada temperatura. As sementes pré-germinadas demoraram mais tempo que o esperado (7 dias) para emitir as plântulas. Após sete dias do plantio, os vasos foram retirados da casa de vegetação e colocados no laboratório da Semilia-Melhoramento e Genética, onde a temperatura estava mais adequada em torno de 22°C (Figura 11).



Figura 11. Transferência do experimento da casa de Vegetação (à esquerda) para o Laboratório (à direita)

Após as transferências as plantas iniciaram o crescimento, mas após 10 dias observou-se uma grande debilidade das plantas e uma evidente deficiência de Nitrogênio (Figura 12). As poucas plantas que resistiram foram coletadas e suas raízes não apresentaram nódulo (Figura 12).



Figura 12. Planta com evidente deficiência de Nitrogênio e ausência de nódulos nas raízes.

5.3. VASOS DE LEONARD

Os vasos de Leonard, como os de NMP, também foram mantidos inicialmente em casa de vegetação e após transferidos para um ambiente com temperatura mais estável. Inicialmente as plantas se desenvolveram bem, mas a partir do 15 dias começaram a apresentar uma nítida deficiência de nitrogênio, com amarelidão das folhas (Figura 13). As plantas que resistiram foram coletadas e não apresentavam nódulos.



Figura 13. Plantas com deficiência de nitrogênio em Vasos de Leonard

5.4. ISOLAMENTO

Apenas nódulos do experimento a campo (ICA) foram coletados devido à ausência de nódulos nos experimentos em Vaso (ISN). Foram coletados aproximadamente 120 nódulos, sendo que apenas 88 isolados foram resgatados, dando origem a coleção apresentada na TABELA 01.

5.5. CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS

Todos os isolados apresentaram crescimento rápido, com períodos variando de dois a cinco dias (Figura 14).



Figura 14. Isolados de *Rhizobium* de Diamante Negro no Segundo dia de Crescimento.

As bactérias foram analisadas quanto à morfologia colonial (cor, mucosidade, transparência, diâmetro, forma, bordo e elevação), capacidade de acidificar ou basificar o meio e coloração de Gram. As bactérias apresentaram-se bastante homogêneas na caracterização morfológica, sendo que a amplitude de variação do diâmetro das colônias variou entre 0,3cm a 2,2cm. Todas apresentaram-se esbranquiçadaa e opacas, com formato circular, bordos lisos, consistência cremosa. A elevação das colônias variou de convexa baixa a convexa elevada, e a produção de goma de moderada a alta (Figura 15)



Fonte: A autora

Figura 15. Morfologia Colonial

Todos os isolados acidificaram o meio e foram identificadas como bacilos e Gram Negativos (Figuras 16)



Fonte: A autora

Figura 16. À esquerda *Bradirhizobium*, no centro controle e à direita isolado de *Rhizobium*.

A cor verde indica pH Neutro, a azul pH básico e a amarela pH ácido.



Fonte: A autora

Figura 17. Bacilos Gram Negativo

5.6 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA de todas as amostras foi extraído, quantificado e sua integridade verificada por eletroforese em gel de agarose 0,8% (item 4.2.13), conforme mostra as FIGURAS 18,19, 20 e 21.

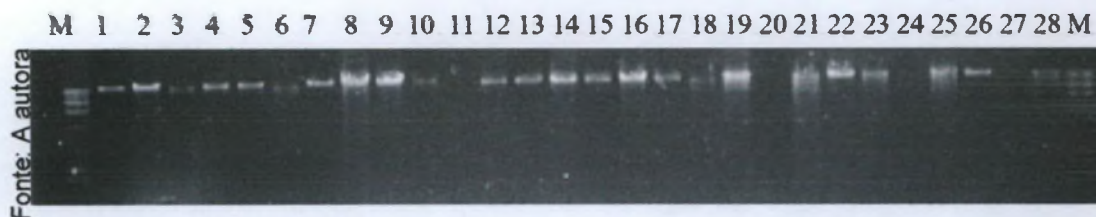


Figura 18. Gel de Quantificação. M: marcador de peso molecular DNA λ /HindIII. Amostras do 1-26 isolados de Diamante Negro.

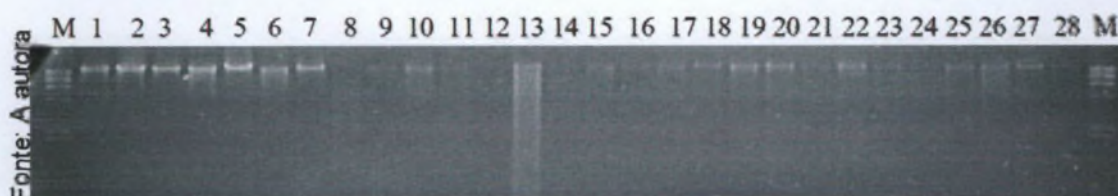


Figura 19. Gel de Quantificação. M: marcador de peso molecular DNA λ /HindIII. Amostras do 1-26 isolados de Diamante Negro, amostras do 9-28 isolados de Goiano Precoce.



Figura 20. Gel de Quantificação. M: marcador de peso molecular DNA λ /HindIII. Amostras do 1-21 isolados de Goiano Precoce, amostras do 22-28 isolados de Diamante Negro.

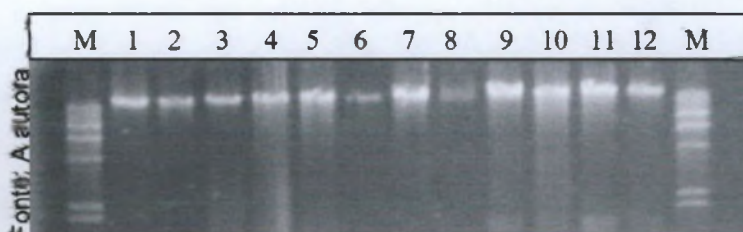


Figura 21. Gel de Quantificação. M: marcador de peso molecular DNA λ /HindIII. Amostras do 1-8 isolados de Diamante Negro. 9) CIAT 899, 10)CFN 299, 11)PRF81 e 12) CFN41.

5.7 OTIMIZAÇÃO DA BOX-PCR

5.7.1 Teste da Diluição do *primer* BOX-AIR

Com o objetivo de otimizar a reação de amplificação, testou-se qual a diluições do *primer* BOX-AIR seria mais adequada. Foram testadas as diluições 2 μ M e 4 μ M. A diluição de 2 μ M promoveu a amplificação das amostras (Figura 22).

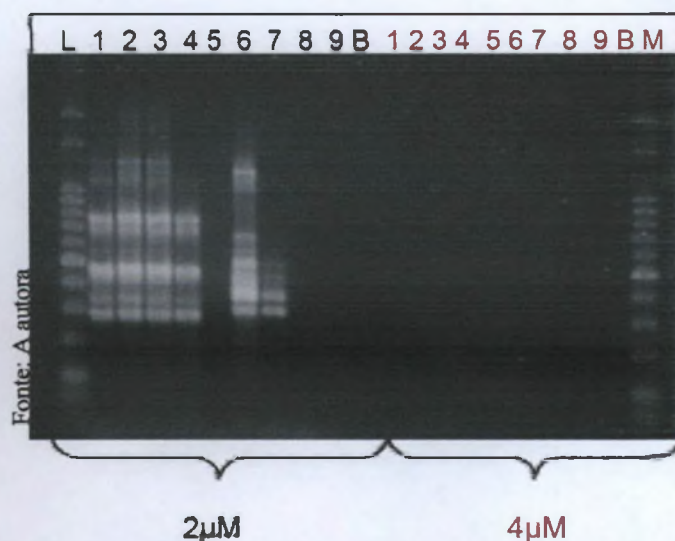


Figura 22. Ladder: marcador de peso molecular Ladder de 100pb. Amplificação das amostras quando utilizado primer diluído em 2 μ M.

5.7.2 Teste da Diluição do DNA

Como observado nos géis de quantificação de DNA (Figura 18 a 21) existem diferentes padrões de bandas. Foram identificados cinco padrões básicos de bandas: bandas muito fortes, bandas Moderamente fortes, bandas pouco Fortes, bandas Fracas e ausência de banda. Partindo das análises dos géis de quantificação realizou-se uma BOX-PCR com três diluições diferentes de cada padrão de Banda (Figura 23).

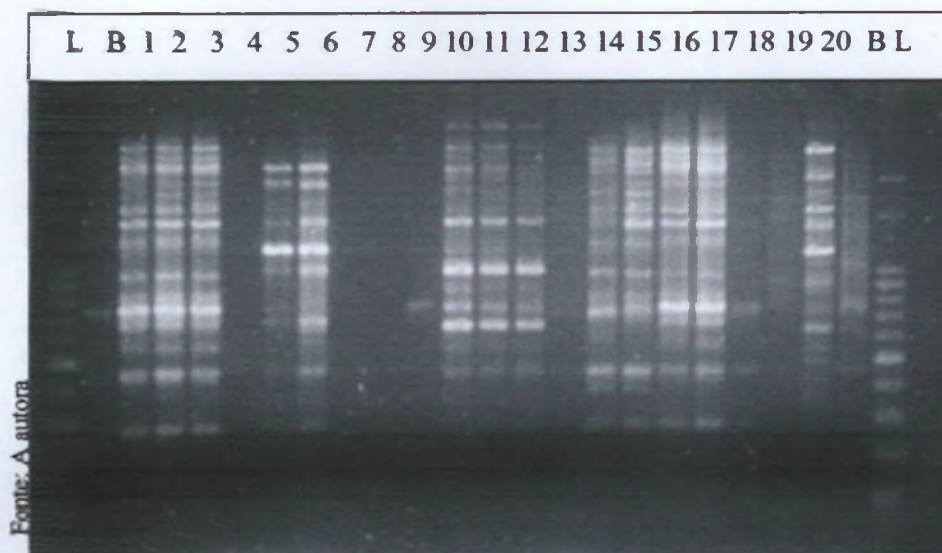


Figura 23. L: marcador de peso molecular Ladder de 100pb. B: Branco; 1)DN50 1/20; 2) DN50 1/50; 3) DN50 1/100; 4) GP1 1/5; 5) GP1 1/10; 6) GP1 1/20 7) DN57 conc.; 8)DN57 1/5; 9) DN57 1/10; 10) DN12 1/100; 11) DN12 1/200; 12) 1:300; 13)DN34 1/50, 14)DN34 1/100;15) DN 34 1/200; 16)DN2 1/20; 17)DN2 1/50; 18)DN2 1/100;19)GP8 1/20 e GP8 1/50.

5.8. BOX-PCR

A partir das análises dos testes e da otimização, realizou-se duas reações de BOX-PCR. As amostras que não continham bandas nos géis de quantificação de DNA e não amplificaram nas Box-PCR testes foram descartadas das demais análises.

As reações de amplificação correspondem a cada um dos centros de origem, Andino e Mesoamericano. Cada reação de amplificação possuía dois conjuntos das linhagens de referência (Figura 24 e 25). Devido ao primer BOX AIR utilizado ser muito velho percebe-se um rastro nos géis resultantes da amplificação por PCR.

Fonte: A autora

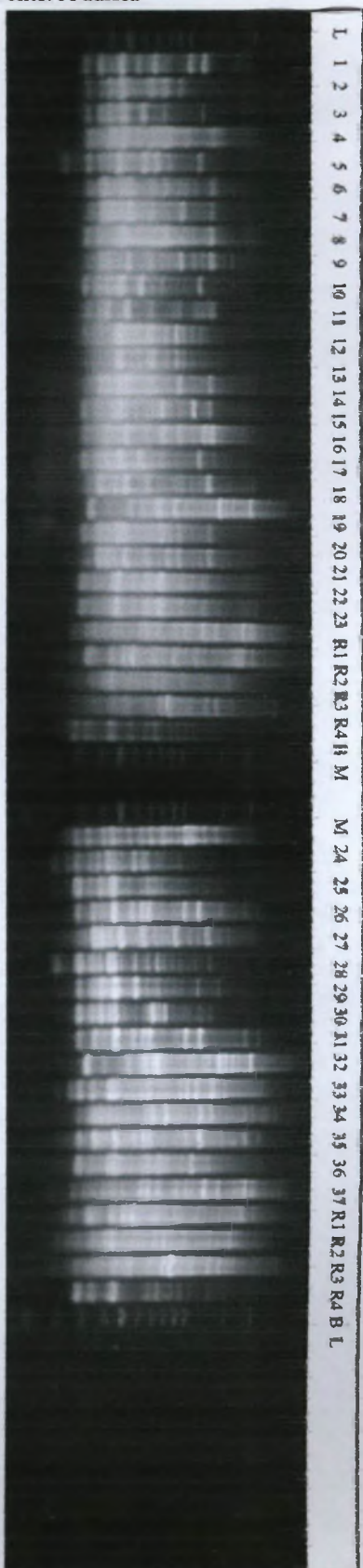


Figura 24. Padrões de Bandas obtidos por BOX-PCR de isolados de Goiãno Precocce (C. O. Andino). L: marcador de peso molecular Ladder da 100pb. B: Branco; R1) CIAT 899; R2) PRF 81; R3) CFN 42, R4) CFN 299; 1 ao 37 isolados do solo.

Fonte: A autora

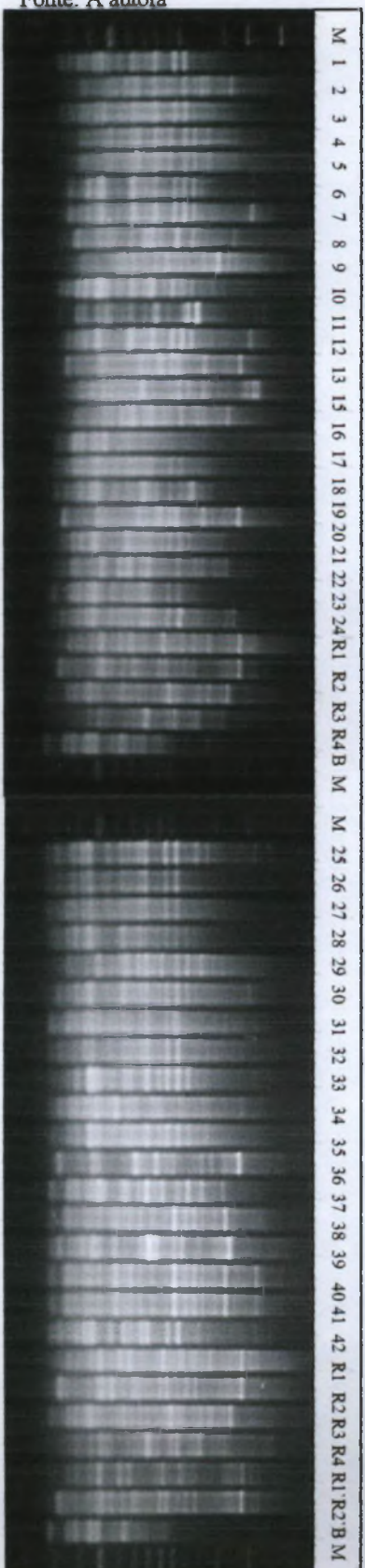


Figura 25. Padrões de Bandas obtidos por BOX-PCR de isolados de Diamante Negro (C. O. Mesoamericano). L: marcador de peso molecular Ladder de 100pb. B: Branco; R1) CIAT 899; R2) PRF 81; R3) CFN 42, R4) CFN 299; 1 ao 42 isolados do solo.

5.9 ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA

Para análise da diversidade genética foram utilizados os programas NTSys, Arlequin e Bood. Os dendogramas obtidos estão representados pelas FIGURAS 26 e 27.

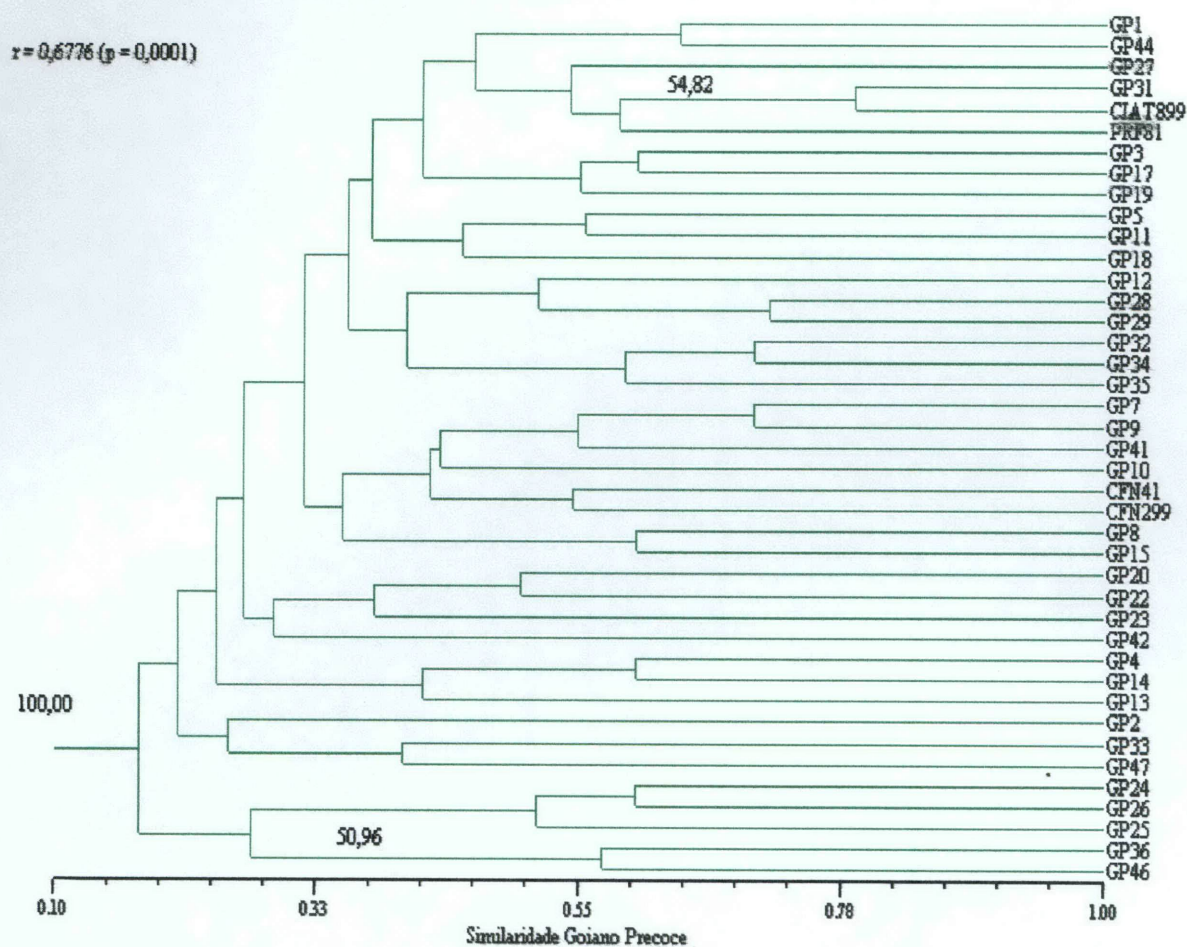


Figura 26 . Dendograma mostrando linhagens de rizóbios isolados de feijão comum Goiano Precoce (C.O.Andino), depois da análise de cluster dos produtos usando UPGMA algoritmo e coeficiente de Jaccard.

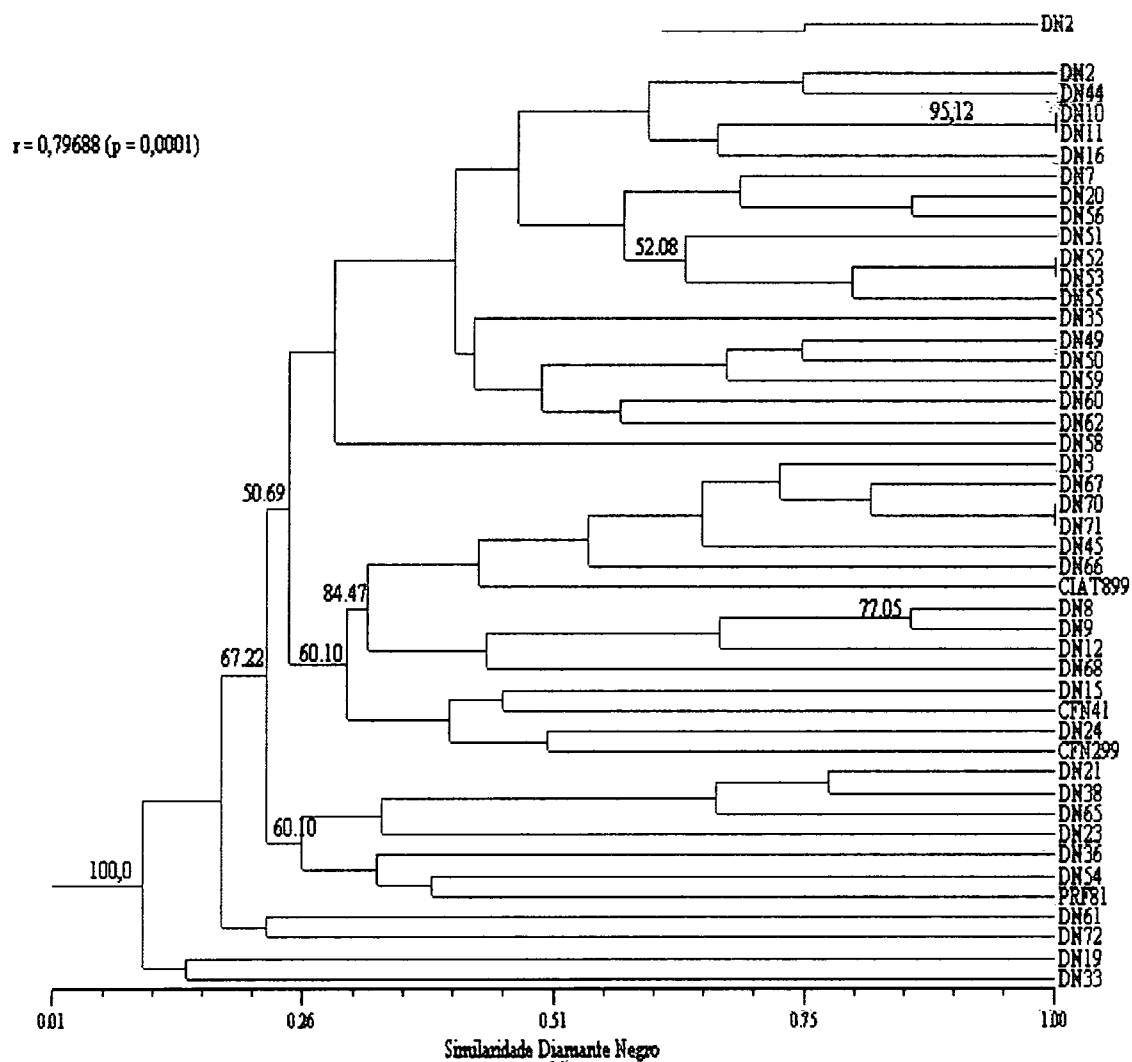


Figura 27. Dendrograma mostrando linhagens de rizóbios isolados de feijão comum Diamante Negro (C.O.Mesoamericana), depois da análise de cluster dos produtos da usando UPGMA algoritmo e coeficiente de Jaccard.

6. DISCUSSÃO

Apesar de o Brasil ser o maior produtor mundial de feijão comum, a sua produtividade ainda é baixa. Um melhor entendimento da relação simbiótica entre estirpes de rizóbios e as variedades da planta hospedeira, pode contribuir com uma diminuição de custos e com o desenvolvimento de uma economia sustentável (GRANGE *et al.*, 2006). Assim, a busca por interações mais estáveis e eficientes pode aumentar a produtividade da cultura sob condições simbióticas e sua adequação ao clima tropical.

O isolamento dos rizóbios colonial evidenciou homogeneidade das características morfofisiológicas das estirpes, confirmando o esperado, uma vez que pertencem ao mesmo gênero de bactérias.

Os resultados deste trabalho, com os experimentos em vaso, evidenciaram uma clara deficiência de nitrogênio das plantas. Como estas estavam sendo nutridas apenas com uma solução nutritiva isenta de nitrogênio, a única fonte possível de fornecimento desta molécula seria a associação simbiótica com rizóbios presentes na diluição do solo. Apesar da inoculação, as plantas continuaram a apresentar deficiência em seu desenvolvimento, indicando que provavelmente a concentração de rizóbio do solo coletado é muito baixa. Assim quando ocorreu a diluição do solo, para a produção de inoculo, reduziu-se ainda mais o número de bactérias capazes de atingir o sítio nodular. De fato a quantidade de nódulos resgatados a campo, foi de baixa frequência (média de 1,5nódulo/planta). Como resultado esperado não houve a resposta nodulatória em vasos de Leonard.

O estudo da diversidade genética, por meio análise de cluster dos perfis gerados por BOX-PCR, apresentou resultados contrastantes entre os isolados de diferentes centros de origem (Figura 26 e 27). Sendo importante salientar que tais diferenças não correspondem ao tratamento metodológica a que foram submetidas, pois estas condições foram idênticas a ambos os centros de origem. A diferença reside na origem evolutiva das plantas representativas de cada centro.

A BOX-PCR de 42 isolados do centro Mesoamericano gerou um dendograma com um valor de confiabilidade superior a 70%, mostrando que 40 dos 42 isolados agruparam-se com 67,22% de similaridade. Interessante notar que nenhuma das linhagens de referência (CFN 41, CFN 299 e CIAT 899) localizou-se no mesmo agrupamento da linhagem indígena (PRF 81). Ainda observa-se a formação de três grandes grupos: o primeiro contendo todos os padrões exóticos e mais 12 isolados agrupados com um nível de similaridade de 60,10%; um segundo contendo 19 isolados associados ao primeiro com um nível de similaridade de 50,19%; e um terceiro grupo contendo o padrão autóctone e mais 5 isolados agrupados com nível de similaridade de 60,10%. Este último grupo associou-se aos outros dois com um nível de similaridade de 67,22%.

Por outro lado, a BOX-PCR de isolados do Centro Andino gerou um dendograma com um valor de confiabilidade de 67,76%. Este valor impossibilita inferir hipóteses a respeito da relação entre os isolados, podendo ser um indicativo de uma alta variabilidade genética entre os isolados de plantas representantes deste centro de origem. O presente resultado impossibilita a associação destes em agrupamentos confiáveis.

Analisando-se comparativamente os dendogramas obtidos em cada centro de origem pode-se dizer que os isolados do centro de origem mesoamericano apresentam-se mais homogêneos do que os isolados do centro de Origem Andino.

ALBERTON *et al.* (2006) realizou um experimento com o objetivo de avaliar a diversidade genética de isolados do feijoeiro IAPAR 81 (C.O. Mesoamericano) por meio de dois tratamentos diferentes: isolados do solo e isolados de vasos contendo solução nutritiva isenta de nitrogênio (Vasos de Leonard), inoculados com solo diluído com fator 10^{-4} . A análise comparativa dos resultados evidenciou que existe uma maior variabilidade genética nos isolados dos vasos do que nos do solo. Isso é explicado devido a menor concentração de bactérias competidoras encontradas no inóculo, como *R. tropici* que bloqueia a nodulação de outras estirpes de rizóbios. O dendograma obtido por ALBERTON *et al.* (2006), por meio da

análise de cluster dos perfis gerados por BOX-PCR dos isolados de vaso é muito semelhante ao dendograma obtido neste trabalho para a mesma análise de isolados do solo de C.O. Mesoamericano (Figura 28). Neste dendograma, tal como no obtido para isolados de Diamante Negro (C.O.M), nenhuma das linhagens de referência localizou-se no mesmo agrupamento da linhagem indígena (PRF 81).

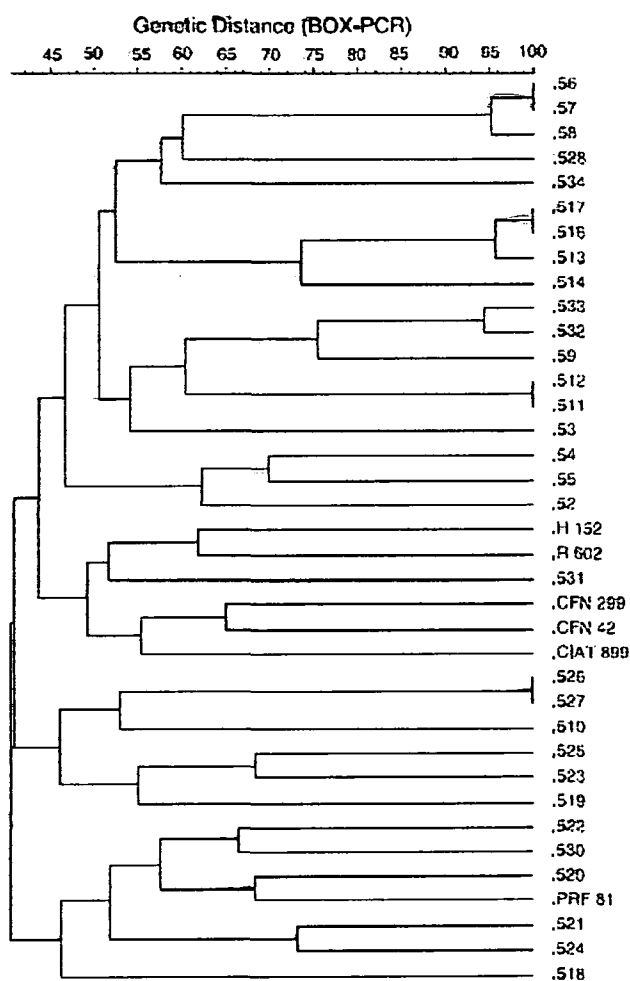


Figura 28. Dendograma extraído do trabalho de ALBERTON *et al.* (2006) mostrando linhagens de rizóbios isolados de feijão comum IAPAR 81 (C.O.Mesoamericano), isolados de vasos inoculos com diluição de solo 10^{-4} , depois da análise de cluster dos produtos da usando UPGMA algoritmo e coeficiente de Jaccard.

Partindo do pressuposto de que a concentração de rizóbios dos solos utilizada para a produção de inóculos neste experimento é muito baixa pode-se dizer que esta poderia se aproximar das concentrações destas bactérias encontradas na diluição de solo 10^{-4} dos experimentos de ALBERTON *et al.* (2006).

Assim, pode-se dizer que para uma mesma concentração de bactérias, os isolados do feijoeiro de C.O. Andino (C.O.A.) expressam maior diversidade genética do que os isolados do C.O. Mesoamericano (C.O.M.). Neste trabalho a cv Diamante Negro (C.O.M), demonstra possuir maior especificidade na relação simbiótica com os isolados do que a cv Goiano Precoce (C.O.A), que demonstra ser mais promíscuo.

Como já discutido a manutenção da simbiose está intimamente relacionada à associações estáveis da planta x bactéria. Assim, estudos mais aprofundados a respeito da maior especificidade de feijoeiros implicariam numa maior estabilidade simbiótica.

O resultado encontrado neste estudo indicou que os feijoeiros do C.O.M. seriam mais indicados para trabalhos de seleção de estirpes, em função de sua maior estabilidade e conseqüente benefício da FBN. Este se reflete através de incrementos nos índices de produtividade associados à redução de custos para a manutenção e viabilização da cultura do feijoeiro no Brasil.

7. CONCLUSÃO

- A otimização da BOX-PCR foi eficiente, permitindo a amplificação das amostras isoladas.
- Os isolados de feijoeiro comum de dois centros de origem diferentes apresentam características morfofisiológicas homogêneas.
- A concentração de rizóbios presentes no solo utilizado neste experimento é baixa, impedindo o estabelecimento da associação simbiótica com plantas isca quando o mesmo é diluído.
- Ocorreu uma maior variabilidade genética de rizóbios que nodulam feijoeiros de origem Andina.
- Feijoeiros de origem Mesoamericana parecem estabelecer relações mais estáveis com rizóbios, indicando o sentido da seleção para combinações mais eficientes para a FBN.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALLEN, O.N., and ALLEN, E.K. The Leguminosae. **University of Wisconsin Press**, 1981.

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

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

BOTELHO, I. **A história do Feijão**. Disponível em <<http://www.sociedadedigital.com.br/artigo.php?artigo=149&item=2>> Acesso em 06 de Dezembro de 2007.

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.

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.

CHUEIRO, L. M. O.; BANGEL, E. V.; MOSTASSO F. L.; CAMPO, R. J.; PEDROS, F. O.; HUNGRIA, M. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no seqüenciamento do gene 16S rRNA. **Revista Brasileira de Ciência do Solo** v.27 n.5. Viçosa: 2003.

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

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

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

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

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

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

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.

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.

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

EMBRAPA, 2007. Origem e História do feijão. Disponível em <<http://www.cnpaf.embrapa.br>> Acesso em 08 de Dezembro de 2007.

FAO, 2007. Food and Agriculture Organization. Disponível em <<http://www.fao.org/>> Acesso em 10 de Dezembro de 2007.

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

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

FOSKET, D. E. Plant growth and development: a molecular approach. **Academic Press**, p. 580, 1994

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

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

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, p.7-53, 1991.

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

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.

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

GRANGE, L., HUNGRIA, M., GRAHAM, P.H., MARTINEZ-ROMERO, E. New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, 2006.

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

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., ANDRADE, D.S., CHUEIRE, L.M.O., PROBANZA, A., GUTTIERREZ-MANERO, F.J., MEGIAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology & Biochemistry** 32, 1515–1528, 2000.

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.) **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, p. 9-89, 1994.

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

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.

JORDAN, D.C. Rhizobiaceae Conn 1938. In: Krieg, N.R., Holt, J.G. (Eds.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. The Williams & Wilkins Co., Baltimore-London, p. 235-244., 1984.

KAPLAN, L. Archeology and domestication in American *Phaseolus* (beans). **Econ.Bot.**, n.19, p.358-368, 1965.

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., SANTOS, J.C.P., BERTON-JUNIOR, J.F. Differences in common beans rhizobial populations associated with soil tillage management in southern Brazil. **Soil & Tillage Research**, 2005.

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

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

LAJUDIE, P.; LAURENTE-FULELE, E.; WILLEMS, A.; TORCK, U.; COOPMAN, R.; COLLIMS, M.D.; KERSTERS, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixation bacteria nodulate *Neptunia natans* in Senegal. 142 **International Journal of Systematic Bacteriology**, 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 sahelii* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. **International Journal of Bacteriology**, London, v.44, p.715-733, 1994.

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

MAARTEN J.; DAVID E. **Genes, and Crop Biotechnology** 2.ed. Sadava: Cidade, p.329, 2003.

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, 2000.

MATIOLI, S. R.; PASSOS-BUENO, M.R. DOS S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos. In: **Matioli, S.R. Biologia molecular e evolução**. Ed. Holos, 2003.

MARGALEF, D.R. Information theory in ecology. **General Systems**, n. 3, p. 36-71, 1958.

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

MARTINEZ-ROMERO, E. Diversity of *Rhizobium*–*Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. **Plant and Soil** 252, 11–23, 2003.

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

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

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

MICKLOS, D. A.; FREYER, G. A.; CROTTY, D. A. **A ciência do DNA**. 2º edição. ARTMED: Porto Alegre, 2005

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

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.

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

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

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.

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.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. 1989. **Molecular cloning: A laboratory manual**. 2ª edição. CSH Press.

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

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

SHANNON, C.E., WEAVER, W. **The Mathematical Theory of Communication**. University Illinois Press, Urbana, 1949

SNEATH, P.H.A., SOKAL, R.R. Numerical Taxonomy. Freeman, San Francisco, 1973.

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

STRALIOTTO, R., CUNHA, C.O., MERCANTE, F.M., FRANCO, A.A., RUMJANEK, N.G. Diversity of rhizobia nodulating common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) isolated from Brazilian tropical soils. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 71, 3-11, 1999.

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

TIGHE, S.W.; LAJUDIE, P.; DIPIETRO, K.; LINDSTRÖM, K.; NICK, G.; JARVIS, D.W. Analysis of cellular fatty acids and phenotypic relationship of *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* species using the Sherlock Microbial Identification System. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p787-801, 2000.

VAVILOV, N.I. Asia – the source of species. In: **Origin and geography of cultivad plants**. p. 367-370 (Reprint 1992; original 1937).

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

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.

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

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

YOUNG, J. P. W. & HAUKKA, K. E. Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytol* v.133, p. 87±94, 1996.

WANG, E. T., VAN BERKUM, P., BEYENE, D., SUI, X. H., DORADO, O., CHEN, W. X. & MARTINEZ-ROMERO, E. *Rhizobium huatlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. *Int J Syst Bacteriol* v. 48, p. 687±699, 1998.