

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA

CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS E ECOLÓGICAS DE
RIZÓBIOS ISOLADOS DE SOLOS ÁCIDOS E DE BAIXA
FERTILIDADE DA AMAZÔNIA

ALOÍSIO FREITAS CHAGAS JUNIOR

Manaus – Amazonas

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

**PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA**

**CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS E ECOLÓGICAS DE
RIZÓBIOS ISOLADOS DE SOLOS ÁCIDOS E DE BAIXA
FERTILIDADE DA AMAZÔNIA**

ALOÍSIO FREITAS CHAGAS JUNIOR

Orientador: Luiz Antonio de Oliveira

Tese apresentada ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia do Convênio UFAM-INPA, como parte dos requisitos para obtenção de título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologia para Agrofloresta.

Manaus – Amazonas

2007

À minha família, especialmente a minha esposa

Lillian França Borges Chagas

e meus pais

Ana Maria Sousa Chagas e

Aloísio Freitas Chagas.

As minhas irmãs e sobrinhas.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Quero expressar os meus sinceros agradecimento às pessoas, que de forma direta ou indireta, contribuíram para a realização deste estudo.

Ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) por possibilitar a realização deste curso e do presente estudo.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) por possibilitar a realização deste trabalho.

A CAPES pela bolsa concedida.

A FAPEAM pelo apoio financeiro através do projeto Temático 2004 – Estudos agronômicos e sociais de três comunidades rurais do Amazonas visando suas sustentabilidade a longo prazo – Processo n. 624/04.

Ao Dr. Luiz Antonio de Oliveira pela orientação, auxílio, atenção e ensinamentos durante a realização dos trabalhos.

Aos professores do curso pelos ensinamentos.

Aos colegas de curso, pela amizade, apoio e companheirismo em especial para Arlem N. de Oliveira e André Willerding.

Aos funcionários e estudantes do Laboratório de Microbiologia do Solo do INPA, pelo inestimável auxílio e colaboração na realização dos trabalhos, em especial para Adilson Dantas, Aurino Façanha, Benedita Correa, Francisco Wesen, Manoel Paulino e Manoel Cursino.

Aos funcionários do Laboratório Temático de Solos e Plantas do INPA, pelo auxílio e realização de etapas desse trabalho.

Agradeço.

CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS E ECOLÓGICAS DE RIZÓBIOS ISOLADOS DE SOLOS ÁCIDOS E DE BAIXA FERTILIDADE DA AMAZÔNIA

RESUMO

Para aumentar a contribuição de rizóbia na nutrição e desenvolvimento de plantas é necessário desenvolver pesquisas de seleção de estirpes mais eficientes quanto à fixação do N₂. Este trabalho teve como objetivos, realizar a caracterização morfológica de isolados de rizóbio oriundos de solos amazônicos; avaliar em laboratório, a tolerância à acidez e Al tóxico, a capacidade de solubilização de fosfato de cálcio (P-Ca) e alumínio (P-Al), a produção de ácido indol-acético (AIA); a capacidade de isolados em induzirem nodulação e fixarem nitrogênio sob as condições de acidez e baixa fertilidade dos solos regionais em casa-de-vegetação; caracterizar geneticamente os isolados selecionados usando a técnica de PCR-RFLP. Os testes de infectividade mostraram que houve aumento significativo na biomassa de caupi. Quanto à caracterização fenotípica, os 200 isolados mostraram uma grande diversidade. Dentre estes, 165 e 127 isolados apresentaram elevada tolerância nos meios de cultura com pH 4,5 e pH 4,5 + Al, respectivamente. Dos 200 isolados testados, 68 solubilizaram P-Ca e 47 P-Al, sendo que 32 solubilizaram tanto o P-Ca quanto o P-Al. A produção de AIA aumentou significativamente com as doses de triptofano adicionadas ao meio ($p < 0,01$) para 19 dos 92 isolados testados no experimento. Observou-se produção de matéria seca, número e massa seca dos nódulos e acúmulo de nitrogênio superiores ao tratamento testemunha e similares ao tratamento adubado para vários isolados de rizóbia. Os 20 isolados selecionados e avaliados apresentaram alta diversidade genotípica, onde o dendrograma derivado de perfis de PCR-RFLP mostrou que podem ser divididos dentro de dois gêneros principais, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. Associando-se os resultados de eficiência simbiótica e nodulação, observou-se que os isolados de rizóbio de solos da Amazônia apresentaram bom desempenho e podem ser recomendados para testes de eficiência agronômica em feijão caupi.

Palavras-chave: Tolerância à acidez e Al, Solubilização de fosfato, Ácido indol-acético, Nodulação, Caracterização genética, Ecologia microbiana.

AGRONOMIC AND ECOLOGICAL CHARACTERISTICS OF ISOLATED RHIZOBIA OF ACID SOILS AND OF LOW FERTILITY OF THE AMAZONIAN

ABSTRACT

To increase the rhizobia contribution to plants nutrition and development is necessary to develop researches for selecting more efficient nitrogen fixation strains. This research work had as objectives, to accomplish morphologic characterization of rhizobia isolated from Amazonian soils; laboratory evaluations about the tolerance to acidity and toxic Al, the capacity to solubilize calcium (P-Ca) and aluminum (P-Al) phosphates, the indole-acetic acid production (AIA); the ability of the isolates to induce nodulation and to fix nitrogen under the acidity and low fertility conditions of the regional soils in greenhouse experiment; to genetically characterize the isolated ones selected using the PCR-RFLP technique. The infectivity test showed that there was significant increase in the cowpea biomass. With relationship to the phenotypic characterization, the 200 isolates showed a great diversity. Among these, 165 and 127 presented high tolerance within the media with pH 4,5 and pH 4,5 + Al, respectively. From the 200 isolates, 68 solubilized P-Ca and 47 P-Al, and 32 isolates solubilized both P-Ca and P-Al. The AIA production significantly increased ($p < 0,01$) with tryptophan quantities added in the medium for 19 of the 92 isolates tested in the experiment. It was observed production of dry matter and nodule number and mass superior simbiotic to the control treatment and similar to the fertilized treatment for various rhizobia isolates. The 20 selected isolates evaluated presented high genotypic diversity, with the derived dendrogram PCR-RFLP profiles showing that they can be divided inside two main genders, *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. Associating the results of simbiotic efficiency and nodulation, it was observed that the isolates of rhizobia from Amazonian soils presented good results, and they can be recommended for tests of agronomic efficiency for cowpea bean.

Key-Word: Acidity and Al tolerance, Phosphate solubilization, Indole-acetic acid, Nodulation, Genetic characterization, Microbial ecology.

LISTAS DE FIGURAS

	Pg
ARTIGO 1: AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE DE POPULAÇÕES DE RIZÓBIO DE SOLOS E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DOS ISOLADOS QUE NODULAM FEIJÃO CAUPI (<i>VIGNA UNGUICULATA</i> (L.) WALP.) NA AMAZÔNIA	
Figura 1: Dendrograma das características morfofisiológicas de isolados de rizóbio associados a feijão caupi	36
ARTIGO 2: TOLERÂNCIA À ACIDEZ E ALUMÍNIO TÓXICO POR RIZÓBIO ISOLADOS DE SOLOS DA AMAZÔNIA.	
Figura 1: Ilustração do método de riscagem para teste de tolerância à acidez.....	51
Figura 2: Valores de crescimento para os isolados de rizóbio meio YMA.....	51
Figura 3: Crescimento de isolados de rizóbio ao longo de 15 dias de avaliação.....	58
Figura 4: Alteração do pH do meio pelos isolados de rizóbio.....	59
ARTIGO 3: CAPACIDADE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS DE CÁLCIO E ALUMÍNIO DE RIZOBIO ISOLADOS DE SOLOS DA AMAZÔNIA.	
Figura 1: Distribuição das colônias nas placas de Petri para verificação do halo de solubilização.....	66
Figura 2: Histograma de classes de índice de solubilização.....	74
ARTIGO 4: PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL ACÉTICO POR RIZÓBIOS ISOLADOS DE SOLOS DA AMAZÔNIA	
Figura 1: Produção média de AIA por isolados de rizóbio.....	85
Figura 2: Produção de AIA por concentração de L-triptofano.....	86
Figura 3: Produção de AIA em relação ao tempo de crescimento bacteriano.....	86
ARTIGO 5: CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E INOCULAÇÃO DE	

RIZÓBIO EM PLANTAS DE Feijão Caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)

Figura 1:	Dendrograma mostrando similaridade dos isolados estudados e das estirpes referência, considerando 12 características morfológicas.....	102
Figura 2:	Dendrograma mostrando similaridade dos isolados estudados e das estirpes referência, considerando 12 características fenotípicas.....	102
Figura 3:	Dendrograma mostrando similaridade dos isolados estudados e das estirpes referência, considerando 12 características morfológicas mais 12 características fenotípicas.....	103
Figura 4:	Índices de eficiência simbiótica dos tratamentos inoculados com isolados e estirpes-referências de rizóbios.....	108
ARTIGO 6:	CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE RIZÓBIO ISOLADOS DE SOLOS NA AMAZÔNIA BASEADA NA TÉCNICA DE PCR-RFLP	
Figura 1	Fragmentos obtidos por PCR-RFLP da região correspondente ao 16S rRNA utilizando a enzima de restrição <i>MSP</i> I.....	122
Figura 2	Fragmentos obtidos por PCR-RFLP da região correspondente ao 16S rRNA utilizando a enzima de restrição <i>HINF</i> I.....	123
Figura 3	Fragmentos obtidos por PCR-RFLP da região correspondente ao 16S rRNA utilizando a enzima de restrição <i>MBO</i> I.....	124
Figura 4	Dendrograma de isolados nativos da Amazônia e estirpes-referência de rizóbio obtido com os fragmentos resultantes da análise por RFLP - PCR da região ribossomal do gene 16S rRNA com três enzimas de restrição (<i>MSP</i> I, <i>HINF</i> I e <i>MBO</i> I).....	125

LISTA DE TABELAS

	Pg
ARTIGO 1: AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE DE POPULAÇÕES DE RIZÓBIO DE SOLOS E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DOS ISOLADOS QUE NODULAM FEIJÃO CAUPI (<i>Vigna unguiculata</i> (L.) WALP.) NA AMAZÔNIA	
Tabela 1: Local e amostras de solos coletadas em diferentes regiões no Amazonas, utilizadas como fonte de inóculos de rizóbio e isolados obtidos após os testes de infectividade, em plantas de feijão caupi.....	26
Tabela 2: Matéria seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e total (MST), número de nódulos (NN) e matéria seca dos nódulos (MSN) de raízes de feijão caupi, colonizadas por rizóbios provenientes de solos do Município de Novo Ayrão, AM.....	28
Tabela 3: Matéria seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e total (MST), número de nódulos (NN) e matéria seca dos nódulos (MSN) de raízes de feijão caupi, colonizadas por rizóbios provenientes de solos do Ramal do Brasileirinho, Manaus, AM.....	28
Tabela 4: Matéria seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e total (MST), número de nódulos (NN) e matéria seca dos nódulos (MSN) de raízes de feijão caupi, colonizadas por rizóbios provenientes de solos de terra preta do Rio Preto da Eva, Manacapuru e Iranduba, AM.....	29
Tabela 5: Matéria seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e total (MST), número de nódulos (NN) e matéria seca dos nódulos (MSN) de raízes de feijão caupi, colonizadas por rizóbios provenientes de solos do Catalão, Marchantaria e Careiro da Várzea, AM.....	29
Tabela 6: Matéria seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e total (MST), número de nódulos (NN) e matéria seca dos nódulos (MSN) de raízes de feijão caupi, colonizadas por rizóbios provenientes de solos do Município de Barreirinha, AM.....	30
Tabela 7: Grandes grupos (GG) e Sub-Grupos (SG) dos isolados de rizóbio associados a feijão caupi de acordo com a caracterização morfofisiológica.....	35
Tabela 8: Caracterização morfológica de isolados de rizóbios obtidos de feijão caupi.....	39
ARTIGO 2: TOLERÂNCIA À ACIDEZ E ALUMÍNIO TÓXICO POR	

RIZÓBIO ISOLADOS DE SOLOS DA AMAZÔNIA.

Tabela 1:	Escala de valores para a avaliação do crescimento de rizóbio nos meios YMA.....	51
Tabela 2:	Médias do crescimento de rizóbio em meio YMA com pH 4,5, pH 4,5 + Al e pH 6,5 isolados de amostras de solos na Amazônia.....	56
ARTIGO 3:	CAPACIDADE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS DE CÁLCIO E ALUMÍNIO DE RIZÓBIO ISOLADOS DE SOLOS DA AMAZÔNIA.	
Tabela 1:	Capacidade de solubilização de fosfato de cálcio dos isolados de rizóbio.	71
Tabela 2:	Capacidade de solubilização de fosfato de alumínio dos isolados de rizóbio.....	73
Tabela 3:	Relação do material biológico pesquisado por locais de coleta.....	74
ARTIGO 4:	PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL-ACÉTICO POR RIZÓBIO ISOLADOS DE SOLOS DA AMAZÔNIA.	
Tabela 1:	Produção de ácido indol-acético ($\mu\text{g mL}^{-1}$) por isolados de rizóbio em meio YM com ausência e presença de L-triptofano.....	82
ARTIGO 5:	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E INOCULAÇÃO DE RIZÓBIO EM PLANTAS DE Feijão Caupi (<i>Vigna unguiculata</i> L. (Walp.).	
Tabela 1:	Tolerância à acidez e Al tóxico, solubilização de fosfato, produção de AIA por isolados de rizóbio e estirpes referência.....	99
Tabela 2:	Grupos dos isolados e estirpes-referência de rizóbio associados a feijão caupi de acordo com a caracterização morfológica.....	103
Tabela 3:	Grupos dos isolados e estirpes-referência de rizóbio associados a feijão caupi de acordo com a caracterização fenotípicas.....	104
Tabela 4:	Grupos dos isolados e estirpes-referência de rizóbio associados a feijão caupi de acordo com a caracterização morfológicas mais fenotípicas.....	104
Tabela 5:	Matéria seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR), total (MST), número de nódulos (NN), matéria seca de nódulos (MSN), eficiência relativa (ER), acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) e eficiência simbiótica (ES) em caupi com inoculado de rizóbio.....	107
Tabela 6:	Matéria seca total (MST), número de nódulos (NN) fósforo total na	

	parte aérea (P total) e eficiência de utilização de fósforo (EFU-P) em feijão caupi inoculado com rizóbio.....	110
ARTIGO 6	CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE RIZÓBIO ISOLADOS DE SOLOS NA AMAZÔNIA BASEADA NA TÉCNICA DE PCR-RFLP	
Tabela 1:	Local e amostras de solos coletadas em diferentes regiões no Amazonas em áreas com e sem cultivo, utilizadas como fonte de inóculos de rizóbio em feijão caupi, e estirpes-referência utilizadas no estudo.....	116
Tabela 2:	Grupos dos isolados nativos da Amazônia e estirpes-referência de rizóbio de acordo com a caracterização genética através dos fragmentos resultantes da análise por RFLP - PCR da região ribossomal do gene 16S rRNA com três enzimas de restrição (<i>MSP I</i> , <i>HINF I</i> e <i>MBO I</i>).....	126

SUMÁRIO

	Pg.
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	
2.1. Objetivo Geral.....	4
2.2. Objetivos Específicos.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1. Características dos solos de terra-firme da região, limitações de uso e alternativas.....	5
3.2. Potencial de nodulação e fixação de nitrogênio atmosférico pela simbiose rizóbio-leguminosa.....	6
3.3. Seleção de estirpes nativas de rizóbio para uso em leguminosas.....	8
3.4. Fatores ambientais que afetam a capacidade competitiva de estirpes de rizóbio – pH e Alumínio	9
3.5. Capacidade de solubilização de fosfato por rizóbio.....	11
3.6. Produção de Ácido Indol-Acético (AIA) por Rizóbio.....	12
3.7. Caracterização Genética de Rizóbio.....	13
4. TRABALHOS CIENTÍFICOS	16
4.1. AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE DE POPULAÇÕES DE RIZÓBIO DE SOLOS E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DOS ISOLADOS QUE NODULAM FEIJÃO CAUPI (<i>VIGNA UNGUICULATA</i> L. WALP.) NA AMAZÔNIA	17
Resumo.....	17
Abstract.....	18
4.1.1. INTRODUÇÃO.....	19
4.1.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24

4.1.4. CONCLUSÕES.....	45
4.2. TOLERÂNCIA À ACIDEZ E ALUMÍNIO TÓXICO POR RIZÓBIO ISOLADOS DE SOLOS DA AMAZÔNIA.....	46
Resumo.....	46
Abstract.....	47
4.2.1. INTRODUÇÃO.....	48
4.2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
4.2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.2.4. CONCLUSÕES.....	60
4.3. CAPACIDADE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS DE CÁLCIO E ALUMÍNIO DE RIZOBIO ISOLADOS DE SOLOS DA AMAZÔNIA.....	61
Resumo.....	61
Abstract.....	62
4.3.1. INTRODUÇÃO.....	63
4.3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	65
4.3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
4.3.4. CONCLUSÕES.....	75
4.4. PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL-ACÉTICO POR RIZÓBIO ISOLADOS DE SOLOS DA AMAZÔNIA.....	76
Resumo.....	76
Abstract.....	77
4.4.1. INTRODUÇÃO.....	78
4.4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	79
4.4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
4.4.4. CONCLUSÕES.....	87

4.5. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E INOCULAÇÃO DE RIZÓBIO EM Feijão Caupi (<i>Vigna unguiculata</i> L. (Walp.).....	88
Resumo.....	88
Abstract.....	89
4.5.1. INTRODUÇÃO.....	90
4.5.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	92
4.5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	97
4.5.4. CONCLUSÕES.....	111
4.6. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE RIZÓBIO ISOLADOS DE SOLOS NA AMAZÔNIA BASEADA NA TÉCNICA DE PCR-RFLP.....	112
Resumo.....	112
Abstract.....	113
4.6.1. INTRODUÇÃO.....	114
4.6.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	115
4.6.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	119
4.6.4. CONCLUSÕES.....	127
5.0. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	128
6.0. BIBLIOGRAFIAS CITADAS	131
7.0 ANEXOS	
ANEXO 1: Solução nutritiva para plantas cultivadas em vasos com areia.....	153
ANEXO 2: Metodologia para extração do DNA genômico.....	154
ANEXO 3: Metodologia de seqüenciamento do gene 16S rDNA.....	155

1. INTRODUÇÃO

Grande parte dos avanços da agricultura e da biotecnologia moderna são derivados das descobertas recentes nas áreas de genética, fisiologia e metabolismo de microrganismos (Canhos & Manfio, 2001). A diversidade genética e metabólica dos microrganismos tem sido explorada há muitos anos visando à obtenção de diversos produtos biotecnológicos, destacando na agricultura, a fertilização de solos através da fixação biológica de nitrogênio atmosférico (Dobereiner, 1997; Canhos & Manfio, 2001). Uma abordagem clássica das etapas do processo de busca e descoberta biotecnológica passa resumidamente pela coleta de material biológico adequado, seguida da seleção e triagem de materiais com os atributos desejados, seleção final do(s) melhor (es) candidato(s) a partir de uma lista reduzida de opções, e culmina com o desenvolvimento de um produto comercial ou processo industrial (Bull *et al.*, 2000).

A fixação biológica do nitrogênio atmosférico (FBN) é um dos processos microbianos mais bem estudados e explorados tecnologicamente relacionados à agricultura. A inoculação de sementes de leguminosas com bactérias diazotróficas é prática comum em vários países. No Brasil, a inoculação da soja (*Glycine max* L. (Meril.)) com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* propicia economia em fertilizantes nitrogenados (Dobereiner, 1997), podendo ser estimado que na condição brasileira quase 2 bilhões de dólares tem sido economizados anualmente nesse contexto (Coutinho, 1996; Marin *et al.*, 1999; Hungria & Campo, 2005). Isto se deve em boa parte ao melhoramento vegetal direcionado para uma maior contribuição da FBN e de diversos trabalhos de seleção de rizóbios adaptados às condições dos solos brasileiros. No caso de outras leguminosas como o feijão (*Phaseolus vulgaris*), foram isoladas estirpes que são tolerantes à acidez e as altas temperaturas, podendo a inoculação com essas estirpes, duplicar a média da produtividade nacional (Hungria *et al.*, 1997). Além dos benefícios econômicos, a redução nas aplicações destes fertilizantes leva a uma melhoria da qualidade ambiental, com menor aporte de nitratos para as águas superficiais e subterrâneas. A maximização das contribuições da FBN nos agroecossistemas tornou-se, então, parte dos esforços de pesquisas visando a sustentabilidade das produções agrícolas.

A eficiência das bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico que estabelecem simbiose com leguminosas, e sua capacidade de sobreviver e formar nódulos depende de fatores genéticos inerentes aos simbiossitos e da interação com fatores edáfo-climáticos (Moreira & Siqueira, 2002).

A diversidade, inclusive de leguminosas, encontradas nos vários sistemas de uso da terra (capoeiras, pastagem tradicional, sistema agroflorestal, floresta e monocultura), na Amazônia, pode abrigar uma grande variabilidade de rizóbios (Pereira, 2000; Hara & Oliveira, 2005; Lima *et al.*, 2005), adaptados a condições de baixos valores de pH e temperaturas elevadas, predominantes nos solos da região, cujo imenso potencial ainda é pouco conhecido.

Várias são as técnicas dispostas para a seleção e caracterização de microrganismos, as quais levam em consideração tanto características fenotípicas como genotípicas. A identificação e a caracterização de estirpes de rizóbio têm sido feitas, tradicionalmente, baseadas nos resultados de especificidade por hospedeiro, análise da morfologia de colônias, tempo de formação de colônias isoladas, alteração do pH do meio de cultura com azul de bromotimol como indicação de diferenças fisiológicas (Hungria & Araújo, 1994, Martins *et al.*, 1997a,b; Zilli *et al.*, 2000). Além destas, outras características utilizadas é a produção de exopolissacarídeos, tolerância à acidez e alumínio tóxico (Mukherjee & Asanuma, 1998; Campo & Wood, 2001; Andrade *et al.*, 2002), bem como, capacidade de solubilizar fosfatos (Igual *et al.*, 2001; Gynaneshwar *et al.*, 2002; Nahas, 2002; Vessey, 2003) e sintetizar ácido indol-acético (Hameed *et al.*, 2004; Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004). Estas características foram utilizadas com sucesso no estudo da ecologia de rizóbios (Martins *et al.*, 1997b; Hara & Oliveira, 2004,2005), permitindo acessar a diversidade de rizóbio presentes em diferentes ecossistemas e usos da terra (Lima *et al.*, 2005; Jesus *et al.*, 2005).

Atualmente, a avaliação da diversidade e a seleção de rizóbio têm sido fortemente influenciadas pelo uso de técnicas moleculares. O emprego das modernas técnicas de DNA recombinante é uma ferramenta preciosa nas mãos dos pesquisadores das regiões tropicais, especialmente as técnicas baseadas em PCR (Reação da Polimerase em Cadeia), relativamente barata e de fácil manuseio (Felice & Alshinawi, 1996; Straliozzo & Rumjanek, 1999a) e tem se mostrado altamente informativa, permitindo a caracterização e diferenciação de isolados de rizóbio.

O cultivo e a produtividade de culturas na região amazônica são limitados devido a fatores químicos do solo, como a baixa fertilidade e elevada concentração de alumínio tóxico para as plantas (Oliveira, 1991b).

A pesquisa dos fatores que afetam a produtividade de culturas, como o feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L). Walp), sob condições simbióticas, reveste-se de significativa relevância sócio-

econômica, pela grande importância da cultura na dieta alimentar da população regional e pela adequação desta tecnologia aos sistemas agrícolas de subsistência, predominante no cultivo de feijão caupi no Brasil (Freire Filho *et al.*, 2005). Essa tecnologia também se adapta a alguns sistemas de produção associada à agricultura familiar, de menor nível tecnológico, e em ascendência em varias regiões produtoras.

A simbiose com leguminosas é complexa, devido à grande heterogeneidade encontrada entre as estirpes de rizóbio e à suscetibilidade das estirpes aos fatores ambientais (Mello & Faria, 1998; Zilli *et al.*, 1998; Straliozzo & Rumjanek, 1999b). A população nativa dos solos já colonizados, geralmente em número elevado, é caracterizada pela baixa eficiência e alta capacidade na formação de nódulos, o que é um fator limitante à nodulação com estirpes mais eficientes (Oliveira & Vidor, 1984a,b,c,d). Entretanto, diversos experimentos têm mostrado respostas positivas à inoculação, representando um estímulo a essa prática e à continuidade dos trabalhos de seleção de genótipos de bactérias e de plantas mais responsivos a fixação biológica do nitrogênio (FBN). Apesar da importância prática e econômica do uso da associação leguminosas-rizóbio, são necessários mais estudos básicos de como os fatores químicos dos solos regionais afetam a bactéria, a planta e a simbiose de ambos os organismos.

Devido à diversidade de espécies de plantas, microrganismos e condições regionais, este tipo de estudo deve ser intensificado, para que se compreendam melhor essas associações, permitindo que sejam eficazes e auxiliem na viabilidade ecológica e econômica de sistemas agrícolas e agroflorestais implantados na Amazônia. Esta região apresenta, ainda, um grande potencial para a seleção de estirpes mais eficientes e competitivas, visto que, nos poucos estudos realizados até o momento (Hara & Oliviera, 2004,2005; Jesus *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2005), já foi identificado um alto grau de diversidade entre as mesmas.

Desta forma, este trabalho visou estudar estirpes nativas da Amazônia, com o intuito de proporcionar material genético e informações científicas capazes de resultar em aumento no potencial da fixação biológica do nitrogênio atmosférico (FBN) em leguminosas e pelo crescimento vegetal em plantas não leguminosas para uso em solos ácidos e de baixa fertilidade da Amazônia, evidenciando os efeitos positivos da utilização de estirpes nativas selecionadas.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Selecionar isolados de rizóbio quanto às características agronômicas e ecológicas em condições de laboratório e casa-de-vegetação.

2.2. Específicos

- Avaliar a infectividade por rizóbio oriundos de amostras de solos coletadas em diversas regiões no Amazonas.

- Caracterizar fenotipicamente os isolados de rizóbio obtidos.

- Estudar, em laboratório, a influencia de condições estressantes (teste de tolerância à acidez e Al tóxico) no crescimento de isolados em meio de cultura.

- Avaliar a capacidade dos rizóbios em solubilizar fosfatos de cálcio e alumínio.

- Avaliar a produção de ácido-indol acético pelos isolados de rizóbio.

- Avaliar a a eficiência simbiótica de isolados de rizóbio inoculados em feijão caupi sob condições de solo em casa-de-vegetação.

- Caracterizar geneticamente as estirpes selecionadas usando a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) da região 16S rDNA.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Características dos solos de terra-firme da região, limitações de uso e alternativas.

O crescimento de plantas em solos ácidos pode ser restringido por diversos fatores. Em geral, em solos ligeiramente ácidos, o suprimento de nutrientes para as plantas, tais como nitrogênio, fósforo, magnésio, potássio ou cálcio é frequentemente marginal ou mesmo deficiente, enquanto que em solos com acidez extremamente alta e toxidez de alumínio, esse elemento é o fator limitante para o crescimento (Keltjens, 1997; Goedert *et al.*, 1997), como é o caso da maioria dos solos de terra-firme na Amazônia, formado por latossolos (Oxisols) e argissolos (Ultisols) (Sanchez *et al.*, 1982; Nicholaides *et al.*, 1983).

Condições de baixa fertilidade e níveis tóxicos de alumínio afetam marcadamente o desenvolvimento das plantas, em especial a raiz, nodulação e relações hídricas, reduzem a produção/produtividade e certamente a sustentabilidade. Convencionalmente, esses estresses são facilmente “neutralizados” pela calagem e adubação que atuam diretamente sobre o solo (Malavolta, 1989; Raij, 1991). Segundo esses autores, o suprimento de fertilizantes pode melhorar os efeitos adversos ao crescimento, aliviando o impacto negativo da baixa fertilidade sobre as plantas. Porém, o cultivo dos solos de baixa fertilidade que predominam na Amazônia é dificultado por problemas financeiros e tecnológicos para a aquisição dos insumos requeridos.

Uma alternativa para a eficiência do uso dos solos da região é a utilização de práticas com baixos insumos agrícolas, como o uso de microrganismos do solo (Oliveira, 1991b) voltado para um melhor aproveitamento dos nutrientes pelas plantas.

No contexto da fertilidade do solo e nutrição vegetal, os microrganismos podem atuar como “facilitadores” da nutrição, interferindo na disponibilidade, contribuindo assim, para reduzir a necessidade ou maximizar o uso de fertilizantes manufaturados (Siqueira & Moreira, 1996; Drozdowicz, 1997; Newton, 1999). Estes efeitos resultam de suas atividades na rizosfera e do estabelecimento de relações simbióticas, como a fixação biológica do nitrogênio atmosférico.

Dentre as bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico estão as nodulíferas dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* (Hungria & Campo, 2005) genericamente designados por rizóbio, que tornam o nitrogênio atmosférico disponível para as plantas e para os ecossistemas. Desse modo, grande parte do nitrogênio necessário para a

nutrição das plantas pode ser obtida através da fixação biológica (Araújo & Hungria, 1994; Hungria *et al.*, 1997; Moreira & Siqueira, 2002; Hungria & Campo, 2005). Desse modo, pode haver um aumento do potencial produtivo das plantas nestes sistemas de produção com baixos insumos, tornando-as bem sucedidas na região, demonstrando a importância destes microrganismos. A utilização de plantas altamente eficientes no uso de nitrogênio pode estar relacionada com uma melhor associação com os microrganismos do solo.

3.2. Potencial de nodulação e fixação de nitrogênio atmosférico pela simbiose rizóbio-leguminosa

A FBN é importante na substituição da adubação nitrogenada em diversas partes do mundo (Buendia-Cloveria *et al.*, 1994; Anuar *et al.*, 1995), bem como na Amazônia (Oliveira, 1991a; Moreira, 1995; Hara & Oliveira, 2004, 2005). Diversas espécies amazônicas têm apresentado potencial fixador de nitrogênio (Magalhães *et al.*, 1982), mas a eficiência da associação dessas espécies com rizóbio deve ser aumentada para que as plantas se beneficiem adequadamente dessa simbiose. Uma das poucas espécies de leguminosas com estirpes eficientes é a soja. Alguns resultados regionais promissores foram obtidos na área da microbiologia do solo com esta cultura, como por exemplo, a estirpe de *B. japonicum* INPA 037, isolada de um nódulo de soja cultivada na várzea no Ariáú, Amazonas. Em estudos iniciais, esta estirpe se mostrou eficiente, competitiva por sítios de nodulação e de boa sobrevivência no solo (Oliveira & Vidor, 1984a, b, c, d).

Um melhor entendimento da associação rizóbio-leguminosa nas condições de solos da Amazônia pode prover uma contribuição efetiva no balanço de nitrogênio no solo e nas plantas. A eliminação de fatores limitantes no solo é importante para que isso ocorra, uma vez que, nas condições locais, o potencial da FBN depende da capacidade das plantas em absorverem o pouco fósforo presente no solo (Vance *et al.*, 1999).

A bactéria fixadora de nitrogênio atmosférico deve apresentar boa capacidade saprofítica para que possa colonizar os solos regionais e contribuir efetivamente na formação dos nódulos e fixação do N₂ e contribuir efetivamente no crescimento e desenvolvimento vegetal (Oliveria, 1991).

A avaliação do potencial de fixação de nitrogênio é feita, em campo, através da nodulação resultante de um processo simbiótico. Este processo é dividido em várias etapas, abrangendo a multiplicação do rizóbio no solo e na rizosfera, reconhecimento do hospedeiro, formação do cordão de infecção, desenvolvimento do nódulo, fixação do nitrogênio e remoção do NH_3 fixado (Araújo & Hungria, 1994; Vargas & Hungria, 1997; Day, 1999; Mathesius, 2003).

Estirpes de rizóbio fazem parte da população microbiana do solo e seu estudo poderá conduzir à descoberta de estirpes de grande valor econômico para serem usadas como inoculantes, visto que são adaptadas ao ambiente local, bem como podem mostrar maiores eficiências, habilidade competitiva e tolerância às condições de estresses.

Muitas culturas podem apresentar maior nível de rendimento e/ou proteína total do que as leguminosas. Contudo, a alta produtividade destas culturas é dependente do uso de fertilizantes nitrogenados, o que não é o caso das leguminosas em simbiose com rizóbio.

Apesar disso, o potencial do cultivo de leguminosas tem sido explorado inadequadamente, especialmente nos países em desenvolvimento, para atender à crescente demanda de alimentos proteinados. Contudo, a vantagem do uso de leguminosas será real somente se a simbiose planta-bactéria funcionar efetivamente. A inoculação das sementes ou a existência de alta população de estirpes do rizóbio específico no solo não é, por si, uma garantia de adequada formação e atividade dos nódulos. Diferentemente dos outros processos, o sistema simbiótico envolve, para seu funcionamento, a interação entre planta, bactéria e ambiente (Hungria *et al.*, 1997; Moreira & Siqueira, 2002).

O sucesso na obtenção de alta fixação do nitrogênio atmosférico na simbiose leguminosa-rizóbio depende de uma série de fatores. Dentre eles, destacam-se a efetividade e competitividade das estirpes presentes no inóculo ou no solo, riqueza do inóculo em número de células, técnicas de inoculação, semeadura e fatores ambientais, principalmente os fatores químicos e físicos do solo (Vargas & Hungria, 1997; Zilli *et al.*, 1998; Stralioetto & Rumjanek, 1999b), que asseguram a sobrevivência e multiplicação do rizóbio no solo, a rápida nodulação e adequada fisiologia da planta. Felizmente e evidentemente, a quase totalidade dos fatores que são benéficos para as bactérias é benéfica também para as plantas, alguns atuando direta ou indiretamente, ou mais acentuadamente sobre um ou outro dos simbioses.

A maximização da fixação biológica do nitrogênio pela simbiose rizóbio-leguminosa pode ser obtida se houver clara compreensão da complexa interação planta x bactéria x ambiente.

3.3. Seleção de estirpes nativas de rizóbio para uso em leguminosas

Os princípios básicos que devem orientar a seleção de estirpes de rizóbio com o objetivo de aplicação prática na inoculação de leguminosas têm sido objeto de muitos estudos (Neves *et al.*, 1998a,b; Hungria *et al.*, 2001b). A seleção deve objetivar identificação de estirpes eficientes, adaptadas às condições prevalentes no local de emprego e competitivas frente à população nativa. Vários aspectos agronômicos e culturais devem ser observados, tais como potencial de nodulação, fixação de N₂, bem como a identificação de alguns parâmetros fisiológicos relacionados com a fase inicial da fixação de N₂ na planta.

É alta a diversidade genética dentro da população de rizóbio no ambiente natural (Zilli *et al.*, 1998; Marin *et al.*, 1999; Straliozzo & Rumjanek, 1999b; Tamimi, 2002; Sikora & Redzepovic, 2003), devido à rápida reprodução, variações, mutações e aos processos naturais de transferência genética. Esta diversidade é apresentada em trabalhos de levantamento de estirpes de rizóbio em diferentes ecossistemas no Brasil (Hungria *et al.*, 1997; Neves *et al.*, 1998a,b; Zilli *et al.*, 1998, 2000).

A busca de melhores estirpes deve começar pela mais ampla possível avaliação do material genético existente já adaptado de preferência às condições ambientais locais. A infundável e rápida variação genética a que é sujeito o crescimento bacteriano seja em cultura, seja em ambiente natural, faz com que as características, ditas desejáveis em rizóbio, como efetividade, competitividade, sobrevivência no solo, tenham caráter transitório e que possam ser sujeitas à seleção e melhoramento. Da mesma forma, certas características mais específicas, como tolerância à baixa ou alta temperatura, baixa umidade, salinidade, acidez e toxicidade ao alumínio podem também ser sujeitas à seleção para obtenção de mutantes ou variantes espontâneos ou pela adaptação dirigida (Vargas & Hungria, 1997). No entanto, nas atividades de introdução de um rizóbio em uma dada área, as características mais comuns são a efetividade na fixação do N₂, a competitividade por sítios de nódulos e a capacidade de sobrevivência no solo. A maior parte dos trabalhos de seleção de estirpes avalia apenas a efetividade. No entanto, a competitividade para a formação de nódulos é também altamente desejável, pois pode impedir a dominância de estirpes menos efetivas existentes no solo ou introduzidas com a semente. A sobrevivência é também importante, viabilizando a manutenção da população do rizóbio selecionado.

3.4. Fatores ambientais que afetam a capacidade competitiva de estirpes de rizóbio – pH e Alumínio

A biodiversidade de microrganismos permite a sua sobrevivência em diversos habitats (Parkinson & Coleman, 1991). Dentre os microrganismos, as bactérias formam o grupo com maior diversidade fisiológica, o que propicia maior adaptabilidade. Por isso, é possível selecionar, dentro de certos limites, organismos tolerantes a diversos fatores estressantes, como alta temperatura, acidez do solo, concentrações elevadas de antibióticos ou metais pesados (Siqueira *et al.*, 1994; Oliveira & Magalhães, 1999; Moreira & Siqueira, 2002; Hara & Oliveira, 2004, 2005).

Uma vasta área de solos do mundo, inclusive a maioria dos solos brasileiros, é afetada pela acidez elevada, problema este que é exacerbado pela aplicação de doses elevadas de fertilizantes com certos nutrientes e até, em menor escala, pela produção de H^+ durante o processo de FBN, atividade heterotrófica de raízes e microrganismos, lixiviação de bases e deposição atmosférica de H^+ (Robarge & Johnson, 1992; Siqueira *et al.*, 1994).

Devido à plasticidade fisiológica dos microrganismos, é possível selecionar estirpes nativas ou obter mutantes tolerantes à acidez. Estirpes ou isolados nativos tolerantes à acidez são mais facilmente obtidas de populações adaptadas a este ambiente, sendo inclusive já encontrados genes para tolerância à acidez (Chen *et al.*, 1993; Siqueira *et al.*, 1994). Como exemplo, tem-se a estirpe de rizóbio INPA 07-B isolada de leucena (*Leucaena leucocephala*) em solos ácidos, que apresentou maior tolerância à acidez do que outras estirpes da mesma espécie, mas isolados de solos com pH menos ácido. Outro exemplo é a tolerância à acidez de estirpes isoladas e selecionadas de solos e plantas (Correa & Barneix, 1997; Mukherjee & Asanuma, 1998; Oliveira & Magalhães, 1999; Campo & Wood, 2001; Andrade *et al.*, 2002; Watkin *et al.*, 2000, 2003; Barberi *et al.*, 2004; Hara & Oliveira, 2004). Também foi constatado que a FBN em solos ácidos com estirpes tolerantes pode ser equivalente à fixação com estirpes insensíveis após a calagem (Thornton & Davey, 1983). Assim, o desenvolvimento de plantas ou de rizóbio e práticas capazes de aumentar a FBN em solos ácidos podem reduzir aplicações de nitrogênio e calagem, em conformidade com os princípios da agricultura sustentada (Cline, 1991; Wani *et al.*, 1995).

A toxicidade de alumínio é outro importante fator limitante ao crescimento de plantas em solos ácidos, além de afetar também vários microrganismos fixadores de nitrogênio em simbiose (Wood, 1995; Igual *et al.*, 1997).

O grau de tolerância ao alumínio parece ser um caráter genético estável, que implica diferenças bioquímicas e fisiológicas (Flis *et al.*, 1993). Geralmente *Bradyrhizobium* spp. são mais tolerantes à acidez e ao Al do que *Rhizobium* spp.. Silva & Franco (1984) testaram 211 estirpes isoladas de várias espécies de leguminosas florestais quanto à tolerância à acidez e ao Al em meio de cultura sólido e verificaram que das 96 estirpes encontradas com tolerância ao pH 4,6, apenas uma não cresceu quando 25 μM de $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ foram adicionados ao meio. Mukherjee & Asanuma (1998), Campo & Wood (2001), Andrade *et al.* (2002), Hara & Oliveira (2004) também estudaram tolerância ao alumínio de estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, evidenciando a tolerância à acidez dos isolados estudados. Nem sempre, porém, a tolerância à acidez resulta em tolerância ao Al. Hara & Oliveira (2004) estudaram 88 isolados de rizóbio oriundos de solos ácidos da Amazônia e concluíram que o alumínio foi mais limitante que a acidez para o crescimento, apresentando diferenças metabólicas de adaptação à acidez mais o alumínio.

A estreita inter-relação planta-bactéria é influenciada pelos fatores ambientais em que se incluem os nutricionais. Vários fatores ambientais, agindo sobre os simbiontes, podem inibir total ou parcialmente a formação de nódulos e/ou a fixação de nitrogênio e assim reduzir a resposta aos outros nutrientes (Vargas & Hungria, 1997; Stralioetto & Rumjanek, 1999b; Zahran, 1999) e, a menos que o solo seja rico em nitrogênio, o rendimento das plantas será reduzido e haverá perda parcial ou total dos investimentos feitos em insumos e trabalho.

Os estudos relativos à acidez e toxicidade de alumínio são limitados pela dificuldade em determinar se os efeitos nocivos afetam a multiplicação do microssimbionte, o desenvolvimento da planta ou alguma etapa específica no estabelecimento e funcionamento da simbiose. Porém, os resultados obtidos até o momento sugerem que a sobrevivência do microssimbionte não se constitui na etapa mais sensível ao alumínio, uma vez que ele se mantém em número adequado para proporcionar boa nodulação primária após sua inoculação no solo (Vidor *et al.*, 1986). Portanto, é de se esperar que o alumínio apresente um maior efeito inibidor sobre a iniciação do nódulo, por afetar a divisão celular e diminuir o número de sítios de infecção da raiz (Vidor *et al.*, 1986). No entanto, a possibilidade de obtenção de estirpes tolerantes à acidez do solo,

especialmente ao alumínio, pode proporcionar aumentos de rendimento da leguminosa hospedeira resultante de uma fixação mais eficiente do N₂, desde que a planta também esteja adaptada a essas condições de solo (Oliveira, 1991b).

Com respeito à seleção de estirpes de rizóbio adaptáveis a solos ácidos, com os diversos fatores ligados à acidez ou dela decorrentes que variam de solo para solo, Munns (1978) *apud* Neves (1986) pondera que, talvez, as estirpes de rizóbio devam ser testadas rotineiramente sob condições que reproduzam os importantes fatores adversos que a leguminosa hospedeira vai encontrar, de maneira a reduzir rapidamente o número de estirpes candidatas e evitar o desperdício da inclusão de organismos edaficamente ineficientes em experimentos de campo.

3.5. Capacidade de solubilização de fosfato por rizóbio

Um considerável número de espécies de bactérias, principalmente aquelas associadas com a rizosfera da planta, é capaz de exercer um efeito benéfico sobre o crescimento vegetal. Assim, o uso de microrganismos como biofertilizante ou agente controlador de doenças para melhorar a agricultura tem sido por vários anos, foco de numerosos estudos (Chagas Jr, 2000; Nahas, 2002; Vessey, 2003).

Segundo Rodrigues & Fraga (1999), os mecanismos pelos quais bactérias podem exercer um efeito positivo no crescimento das plantas pode ser de dois tipos: direto e indireto. O efeito indireto no crescimento é a diminuição ou prevenção de efeitos deletérios de microrganismos fitopatogênicos, principalmente devido à síntese de antibióticos (Sivan & Chet, 1992) ou sideróforos (Leong, 1986) pela bactéria. O efeito direto no crescimento pode ser através da síntese de fitormônios (Xie *et al.*, 1996; Vessey, 2003), síntese de algumas enzimas que modulam o nível de hormônios da planta (Glick *et al.*, 1998), a fixação de N₂ (Dobereiner, 1997), assim como a solubilização de fosfato inorgânico e mineralização de fosfato orgânico, que torna o fósforo disponível para as planta (Igual *et al.*, 2001; Gynaneshwar *et al.*, 2002; Nahas, 2002; Vessey, 2003; Hara & Oliveira, 2004).

Dentre os gêneros de bactérias capazes de influenciar positivamente na fisiologia de plantas, destaca-se a família *Rhizobiaceae* pela capacidade de fixação de N₂ e solubilizar

compostos de fosfato inorgânico (Halder *et al.*, 1991; Halder & Chakrabartty, 1993; Ab-Dalla, 1994; Mikanova *et al.*, 1995; Gyaneshwar, *et al.*, 2002; Hameed *et al.*, 2004).

A detecção visual e a estimativa quantitativa da capacidade de estirpes de rizóbio em solubilizar fosfatos pouco solúveis têm sido possível usando métodos em placa de Petri com meio de cultura para solubilizadores, no qual mostra uma zona translúcida ao redor da colônia em meio contendo fosfato mineral insolúvel (principalmente fosfato de cálcio ou fosfato de alumínio) como única fonte de fósforo (Sylvester-Bradley *et al.*, 1982; Peix *et al.*, 2001; Hameed *et al.*, 2004; Hara & Oliveira, 2004).

Estirpes de *Bradyrhizobium* solubilizaram diferentes quantidades de fosfato (hydroxiapatita e fosfato tricálcio) em meio de cultura líquido (Mikanova *et al.*, 1995; Chabot *et al.*, 1998; Mikanová & Kubát, 1999; Mikanová & Nováková, 2002; Silva Filho *et al.*, 2002). O mesmo foi evidenciado por Ab-dalla (1994) testando a capacidade de estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* em solubilizar fosfato de rocha, onde, em solos não esterilizado, a estirpe testada (*R. meliloti* TAL 1236) foi muito eficiente na solubilização desse fosfato. Segundo Mikanová & Kubát (1999), estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* mostraram atividade de solubilização de fosfato em meio de cultura e, quando inoculadas em soja em solo, houve um aumento da produtividade da cultura e no conteúdo de fósforo lábil no solo.

Segundo Halder & Chakrabartty (1993), a capacidade para solubilização de fosfatos inorgânicos varia entre as estirpes de *Rhizobium-Bradyrhizobium* em meio líquido, sugerindo diferentes mecanismos para a solubilização, corroborando com vários trabalhos utilizando meios líquidos e sólidos (Igual *et al.*, 2001; Gyaneshwar *et al.*, 2002; Hameed *et al.*, 2004; Hara & Oliveira, 2004,2005).

3.6. Produção de Ácido Indol-Acético (AIA) por Rizóbio

Bactérias da rizosfera podem influenciar no crescimento de plantas pela contribuição com a produção de fitohormônios, tal como as auxinas. A principal auxina é o ácido indol-acético (AIA), tendo aplicação prática como promotor no crescimento vegetal. Existe ampla evidência que numerosos microrganismos do solo estão ativamente envolvidos na síntese de auxinas em

meio de cultura e no solo (Antoun *et al.*, 1998; Biswas *et al.*, 2000b; Vega-Hernández *et al.*, 2002; Hameed *et al.*, 2004; Khalid *et al.*, 2004; Thakuria *et al.*, 2004).

O L-tryptofano, como aminoácido, serve como um precursor fisiológico para a biossíntese de auxinas em plantas e em microrganismos (Bartel, 1997; Frankenberger & Arshad 1995 *apud* Khalid *et al.*, 2004). Exsudados de raízes são naturalmente fonte de triptofano (Dakora & Phillips, 2002) para os microrganismos aumentando a biossíntese de auxina na rizosfera.

A produção de AIA e a fixação biológica do nitrogênio por bactérias diazotróficas foram examinadas como possíveis fatores de contribuição no crescimento de plantas (Antoun *et al.*, 1998; Biswas *et al.*, 2000b; Thakuria *et al.*, 2004). A produção de AIA por rizóbio tem sido estudada pelo seu efeito na formação de raízes e nódulos em leguminosas (Prinsen, 1991; Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004).

Os testes para a produção de AIA em meio de cultura foram positivos para algumas estirpes de rizóbio testadas por Biswas *et al.* (2000b), sugerindo um mecanismo potencial pelos quais essas bactérias podem regular o crescimento das plantas. Resultados semelhantes foram reportados em vários trabalhos, evidenciando a produção de AIA por estirpes de rizóbio usando como precursor do AIA o triptofano (Vega-Hernández *et al.*, 2002; Hameed *et al.*, 2004; Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004).

É muito provável que auxinas de origem microbiana na rizosfera de plantas possam proporcionar uma resposta fisiológica positiva nas plantas hospedeiras. Assim, a avaliação de rizóbio a partir da avaliação “*in vitro*” da produção de AIA pode proporcionar uma base segura para selecionar isolados de rizóbio efetivos.

3.7. Caracterização Genética de Rizóbio

Devido à sua importância econômica, os estudos da interação rizóbio-leguminosa têm tido um bom suporte econômico quando comparadas às demais áreas de pesquisa agrônômica em diversas partes do mundo, sendo que atualmente é a interação planta-microrganismos mais bem estudada. O estudo da biodiversidade dentro desses grupos, especialmente em regiões tropicais, além de buscar entender suas complexas relações ecológicas e evolucionárias, envolve a procura de genótipos tolerantes aos diferentes fatores estressantes ambientais presentes nessas áreas e

limitantes a esta simbiose, visando o manejo mais eficiente desta interação (Straliotto & Rumjanek, 1999a). Os estudos taxonômico e filogenético são necessários para estruturar a biodiversidade do rizóbio presente no solo, facilitar a comunicação entre os cientistas e buscar um maior entendimento da biologia e evolução desta simbiose, com importantes aplicações práticas.

O advento dos métodos moleculares baseados nos estudos do genoma bacteriano constituiu-se numa fonte abundante de dados para rizóbio (Teixeira, 1997, 2000; Teixeira *et al.*, 1998). Nos últimos anos, a taxonomia das bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico isoladas em diferentes ecossistemas, em geral tem sofrido uma revisão substancial, devido ao advento dos métodos moleculares de análise filogenética (Lafay & Burdon, 1998; Chen *et al.*, 2000; Oliveira, *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2002; McInnes *et al.*, 2004; Grange & Hungria, 2004).

A aplicação dos métodos de biologia molecular no estudo de rizóbio tem contribuído significativamente, para o avanço no conhecimento sobre a diversidade desse microrganismo. Os dados levantados nos estudos genéticos de populações dos diferentes gêneros de rizóbio indicam que há um alto grau de diversidade genética deste grupo (Chen *et al.*, 2000; Oliveira, *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2002; Tamimi, 2002; Sikora & Redzepovic, 2003).

Os maiores avanços na utilização de técnicas de biologia molecular estão sendo obtidos pela comparação das seqüências de nucleotídeos do DNA, em especial a região que codifica o 16S rRNA, considerado conservado entre as bactérias, mas ao mesmo tempo suficientemente variável e com uma quantidade de informações capazes de revelar, claramente, as relações filogenéticas entre as espécies (Weisburg *et al.*, 1991 apud Chueire *et al.*, 2000). Os estudos de filogenia também se beneficiaram pela técnica de PCR (“Polymerase Chain Reaction”, ou seja, análise pela reação em cadeia da polimerase), que permite a amplificação de seqüências definidas do DNA (Saiki *et al.*, 1988 apud Chueire *et al.*, 2000) e que também facilitou as análises da molécula do 16S rRNA de bactérias da família *Rhizobiaceae* (McInroy *et al.*, 1999; Segundo *et al.*, 1999). O custo do seqüenciamento de genes, porém, é elevado e a técnica não está disponível em todos os laboratórios. Assim, outras variações e combinações de métodos estão sendo utilizadas para verificar a posição taxonômica das bactérias e, alguns, mostram boa correlação com o seqüenciamento do 16S rRNA. Destaca-se, entres esses métodos, a reação de PCR associada à metodologia de RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”, polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição), em geral com amplificações de regiões de genes

cromossômicos conservados, como o 16S rRNA. Os fragmentos amplificados são digeridos por enzimas de restrição que reconheçam de 4 a 5 bases (Laguerre *et al.*, 1996,1997; Terefework *et al.*, 1998; Germano *et al.*, 2003).

4. TRABALHOS CIENTÍFICOS

4.1. AVALIAÇÃO DA EFETIVIDADE DE POPULAÇÕES DE RIZÓBIO DE SOLOS E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DOS ISOLADOS QUE NODULAM FEIJÃO CAUPI (*VIGNA UNGUICULATA* L. WALP.) NA AMAZÔNIA

RESUMO

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é importante na substituição da adubação nitrogenada em diversas partes do mundo, bem como na Amazônia. Com o objetivo de contribuir com a otimização do processo de FBN na cultura do feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp) na Amazônia, através da efetividade de populações e diversidade de isolados de rizóbio obtidos em sete áreas com e sem cultivos agrícolas, foram realizados testes de infectividade (produção de biomassa de caupi) e caracterização fenotípicas (pH do meio, tempo de crescimento, características das colônias e de muco). Os resultados do teste de infectividade mostraram que houve aumento significativo na biomassa de caupi ocasionado pelas estirpes de rizóbio contidas nas amostras de solos das diferentes regiões de coleta. Quanto à caracterização fenotípica, os 200 isolados avaliados num dendrograma mostraram uma grande diversidade, com a formação de cinco grandes grupos divididos em diferentes subgrupos. O estudo das características fisiológicas e morfológicas revela uma diversidade bastante ampla dos isolados de rizóbio e costuma estar relacionado com estudos em nível de DNA. Estes dados são importantes, uma vez que o conhecimento das comunidades nativas por meio destas ou de outras técnicas revelam-se fundamentais para se conhecer a diversidade das espécies, principal recurso para o trabalho na área de biotecnologia.

PALAVRAS-CHAVE: Diversidade microbiana, Ecologia microbiana, Infectividade, Nodulação, Fixação do nitrogênio.

**EFFECTIVENESS OF POPULATIONS OF RHIZOBIA OF GROUND AND
FENOTÍPICA CHARACTERIZATION OF THE ISOLATED ONES THAT THEY
NODULAM COWPEA (*VIGNA UNGUICULATA* L. WALP.) IN THE AMAZONIAN**

ABSTRACT

Biological nitrogen fixation (FBN) is important in the substitution of the fertilization nitrogen in diverse parts of the world, as well as in the Amazonian. In order to contribute for the optimization of BNF associated with cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp) in Amazonian areas, through the effectiveness of populations and diversity isolated of rhizobial obtained in seven areas with end without agricultural cultivations, infectivity tests were accomplished (productions of biomass of cowpea) and phenotype characterization (pH of the middle, time of growth, characteristics colony and mucous). The results of the infectividade test had shown that cowpea had significant increase in the biomass caused by the contained lineages of rhizobia in the ground samples of the different regions of collection. In relation to the phenotypic characterization, the 200 isolated ones evaluated in a dendrograma showed a great diversity, with the formation of five great groups divided in different sub-groups. The study of the physiological and morphologic characteristics it discloses a sufficiently ample diversity of isolated of rhizobia and is related with studies in DNA level. These data are important, a time that the knowledge of the native communities by means of these or of others techniques show basic to know the diversity of the species, main resource for the work in the biotechnology area.

KEY WORDS: Microbial diversity, Microbial ecology, Infectivity, Nodulation, Nitrogen fixation.

4.1.1. INTRODUÇÃO

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é importante na substituição da adubação nitrogenada em diversas partes do mundo (Buendia-Cloveria *et al.*, 1994; Anuar *et al.*, 1995; Döbereiner, 1997; Alves *et al.*, 2003; Sanginga, 2003), bem como na Amazônia (Oliveira, 1991b; Oliveira *et al.*, 1992; Moreira, 1995; Hara & Oliveira, 2004,2005). Diversas espécies amazônicas da família leguminosae têm apresentado potencial fixador de nitrogênio (Magalhães *et al.*, 1982; Moreira, 1995; Hara, 2003), mas a eficiência da associação dessas espécies com rizóbio deve ser aumentada para que as plantas se beneficiem adequadamente dessa simbiose.

O processo de FBN aparece como uma alternativa de baixo custo e com uma grande contribuição para o tipo de manejo que hoje é buscado mundialmente, o de uma agricultura sustentável (Oliveira, 1991a; Hungria *et al.*, 2001a,b; Hungria & Campo, 2005; Hungria *et al.*, 2005; Jensen & Hauggaard-Nielsen, 2003), evidenciando a contribuição em algumas leguminosas de importância agrícola como a soja, feijão, amendoim, grão-de-bico, lentilha e ervilha (Oliveira & Vidor, 1984a,b,c,d; Oliveira *et al.*, 1992; Kessel & Hartley, 2000; Unkovich & Pate, 2000; Alves *et al.*, 2003; Sanginga, 2003).

Apesar disso, o potencial do cultivo de leguminosas tem sido explorado inadequadamente, especialmente nos países em desenvolvimento, para atender à crescente demanda de alimentos proteinados. Contudo, a vantagem do uso de leguminosas será real, somente se a simbiose planta-bactéria funcionar efetivamente. A inoculação das sementes ou a existência de alta população de estirpes de rizóbio específico no solo não é por si só, uma garantia de adequada formação e atividade dos nódulos. Diferentemente dos outros processos, o sistema simbiótico envolve, para seu funcionamento, a interação entre planta, bactéria e ambiente (Oliveira & Vidor, 1984a,b,c,d; Hungria *et al.*, 1997; Broughton *et al.*, 2003).

É alta a diversidade genética dentro da população de rizóbio no ambiente natural (Martins *et al.* 1997b; Zilli *et al.*, 1998; Marin *et al.*, 1999; Straliozzo & Rumjanek, 1999b; Tamimi, 2002; Sikora & Redzepovic, 2003), devido à rápida reprodução, variações, mutações e aos processos naturais de transferência genética (Freire, 1992). Esta diversidade é apresentada em trabalhos de levantamento de estirpes de rizóbio em diferentes ecossistemas no Brasil (Hungria *et al.*, 1997; 2001a, Neves *et al.*, 1998a,b; Zilli *et al.*, 1998, 2000; Hara & Oliveira, 2004).

A avaliação das populações de rizóbio é facilitada com a utilização de plantas iscas e isolamento dos nódulos formados. Além disso, as características morfológicas de rizóbios fornecem informações importantes para a identificação e agrupamento de estirpes. Assim, avaliar o tempo de crescimento, reação de pH, consistência do muco produzido, características das colônias formadas, são características importantes no agrupamento destes isolados. Um levantamento feito em solos do Sertão, Agreste e Zona da Mata do Estado de Pernambuco (Martins *et al.*, 1995), Semi-Árido no Estado da Paraíba (Silva *et al.*, 2005), Região norte do Estado de Minas Gerais (Ferreira *et al.*, 2005), Nordeste do Brasil (Neves *et al.*, 1998a,b); Cerrado no Estado do Piauí (Zilli *et al.*, 2000, 2004) e nos Estados do Paraná, Rio Grande do Sul, Amazonas, Minas Gerais, Goiás e Distrito Federal (Hungria *et al.*, 2001a), mostraram uma enorme diversidade na população de rizóbio dos solos estudados.

O Estado do Amazonas possui grandes áreas de cultivo, tanto na várzea como na terra firme, adequadas ao cultivo do feijão caupi (*Vigna unguiculata* (L) Walp). O feijão caupi é uma leguminosa muito importante na alimentação humana, estritamente relacionada com as atividades de subsistência no Estado do Amazonas, e de significativa importância socioeconômica para a região (Dias *et al.*, 2002).

O feijão caupi pode obter da associação com o rizóbio, o nitrogênio necessário para altas produções (Oliveira *et al.*, 1992; Martins 1996; Freire Filho *et al.*, 1998; Kessel & Hartley, 2000; Sanginga, 2003). Por outro lado, pesquisas realizadas desde os anos 80 mostram variação na eficiência do processo de FBN em plantas de caupi e soja, em função das diferentes condições edafoclimáticas das regiões produtoras, que afetam a planta hospedeira, o rizóbio e a própria fixação, bem como das cultivares utilizadas (Stamford *et al.*, 1988; Mpeperekí *et al.*, 1998; Hungria *et al.*, 2001a,b). Segundo Jacson *et al.* (2002), um fator que interfere no processo é a compatibilidade entre o hospedeiro e o rizóbio que, independente das condições do ambiente, permitirá ou não que o processo se estabeleça satisfatoriamente para ambos os organismos. Em geral, as sementes de leguminosas são inoculadas com rizóbio selecionado nas grandes regiões produtoras, para as cultivares comerciais desenvolvidas pelos programas de melhoramento. Estas bactérias muitas vezes não são capazes de se desenvolver e serem eficientes quando submetidas a condições de clima e solo adversos (Hungria *et al.*, 1999), bem como não têm sido selecionadas para as variedades locais que são as mais utilizadas pelos agricultores. Essa problemática sinaliza a necessidade de estudos localizados buscando aumentar a eficiência do processo e potencializar

seu uso, através do isolamento e seleção de rizóbio eficiente e adaptado tanto às condições edafoclimáticas quanto às cultivares que são utilizadas nas regiões produtoras.

Segundo Kahindi *et al.* (1997), os benefícios futuros oriundos da simbiose de bactérias que induzem nodulação em leguminosas dependerão da exploração da diversidade natural de estirpes presentes em solos tropicais. Assim, com o objetivo de obter uma coleção de isolados de rizóbio capazes de nodular o feijão caupi cultivado em solos na Amazônia, e caracterizar fenotipicamente esta coleção, realizou-se ensaios em casa de vegetação e laboratório.

4.1.2. MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de material e avaliação da eficiência de populações de rizóbio

Amostras de solos foram coletadas de uma camada de 0-20 cm nas regiões do Ramal do Brasileirinho (Manaus), Rio Preto da Eva, Careiro da Várzea, Manacapuru, Iranduba, Novo Airão e Barreirinha, em áreas com e sem cultivos, no Estado do Amazonas (Tabela 1). Foram realizados cinco ensaios para avaliar a eficiência de populações de rizóbio (teste de infectividade e fixação de N₂), usando as amostras de solos coletadas, os quais serviram de fonte de inóculo em sementes de feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp. v. IPEAN V69) como planta isca para isolamento de rizóbio a partir de nódulos (Xavier *et al.*, 1997). Os ensaios foram realizados em casa de vegetação na Coordenação de Pesquisas em Ciências Agrônômicas (CPCA) no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

Cada amostra foi testada com cinco repetições, onde foi medido o pH dos solos em água (1:2,5) (EMBRAPA, 1997) (Tabela 1). Utilizou-se subamostras de solo equivalentes a 30g, para servirem como fonte de inóculo das populações e avaliação da população de rizóbio das amostras. O substrato utilizado foi areia autoclavada a 120 °C por duas horas, que foi adicionada em vasos esterilizados com capacidade para 700g de substrato. As subamostras de solo foram colocadas no centro do vaso contendo areia autoclavada.

Foram semeadas oito sementes por vaso (sementes previamente lavadas com etanol 100% por 30 segundos, seguindo uma esterilização superficial com hipoclorito de Na 0,2% por 4 minutos e lavadas com água esterilizada para eliminar a solução de hipoclorito), procurando

colocá-las em contato com a amostra de solo para que ao germinarem, as sementes pudessem ser infectadas pelas populações de rizóbio presentes na mesma. No sétimo dia após a germinação, fez-se o desbaste deixando três plantas por vaso.

Os vasos receberam uma solução contendo todos os nutrientes com exceção do nitrogênio (modificada de Specht *et al.*, 1956 e Smith *et al.*, 1983, segundo Oliveira, 1988, Anexo 1), com pH 5,0. Foi adicionada solução nutritiva periodicamente durante o ciclo das plantas, sendo colocada água destilada esterilizada sempre que necessário. Foram utilizados três vasos para cada amostra de solo (tratamento) contendo três plantas por vaso, totalizando nove plantas por tratamento.

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com 8, 18, 13, 19 e 5 tratamentos, para os experimentos 1, 2, 3, 4 e 5, respectivamente, sendo fontes de populações, referentes às sub-amostras de solos, mais um sem amostras de solo (testemunha) para cada experimento.

As plantas foram coletadas no estágio inicial de floração (aproximadamente 45 dias após o início da germinação), e levadas para secar em estufa a 60 °C até peso constante, para determinação da matéria seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e total (MST). Avaliou-se também, o número de nódulos (NN) e peso dos nódulos secos (PNS).

Os dados foram submetidos à análise de variância com teste F, e as médias dos tratamentos comparados pelo teste Tukey a 5%, utilizando o programa STATISTICA 6.0. Os dados referentes ao número de nódulos e peso dos nódulos secos foram transformados em raiz quadrada ($X + 0,5$) para a análise estatística.

Isolamento dos nódulos

Foram isolados rizóbios presentes nas amostras de solos, após a coleta dos nódulos usando a metodologia tradicional descrita por Vincent (1970) e Somasegaran & Hoben (1985), onde os mesmos foram lavados com etanol (100%; 30 segundos), seguindo uma desinfecção superficial com hipoclorito de sódio (4 minutos) e dez lavagens com água estéril. Em seguida os nódulos foram pressionados com uma pinça e, posteriormente, foi realizada a riscagem em placas de Petri contendo meio YMA (yeast manitol agar) e azul de bromotimol, com pH 6,0. Após o

isolamento, as placas foram incubadas a 28°C até o crescimento de colônias de bactérias, quando então foram repicadas para novas placas contendo o mesmo meio e novamente incubadas até o novo crescimento bacteriano. Os isolados assim obtidos foram mantidos em tubos de ensaios contendo o meio YMA inclinado, segundo descrito por esses autores. Deste modo, aumenta-se o banco de germoplasma de rizóbio do INPA, permitindo uma melhor seleção de isolados com características agronômicas desejáveis.

Caracterização das colônias dos isolados

A caracterização foi realizada segundo Vincent (1970), Hungria & Araújo (1994), Martins *et al.* (1997b) e Zilli *et al.* (2000), avaliando-se o tempo de crescimento de cada um dos isolados, sendo separadas bactérias de crescimento lento (4 dias em diante) e rápido (até três dias); o pH do meio após o crescimento das bactérias foi observado indiretamente pela coloração do meio de cultura contendo azul de bromotimol (alcalino, ácido e neutro); foi avaliado também, a forma da colônia (circular ou irregular), borda (inteira ou irregular), transparência e cor da colônia. Quanto ao muco produzido pelas células, foram avaliados os aspectos: quantidade (muito ou pouco), aderência à alça de platina, observada pela remoção do muco da superfície do meio de cultura (sim ou não) e elasticidade, observada no momento da remoção do muco do meio de cultura (sim ou não).

A partir da caracterização morfológica (Tabela 8), foi realizada a análise de agrupamento pelo programa Ntsyspc, utilizando o algarismo UPGMA (cálculo da média aritmética entre os indivíduos atribuindo pesos iguais a eles) e a matriz de similaridade com coeficiente Simple Matching ($SM = m/n$, onde m é o número de combinações ocorridas entre dois indivíduos e n o número de combinações possíveis). Uma vez construída a matriz, foi feito um dendrograma (Figura 1) através do qual se agrupou os isolados por similaridade.

4.1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Eficiência de populações de rizóbio

As fontes de inóculos utilizadas nos experimentos com amostras de solo dos Municípios de Novo Ayrão (Tabela 2), Ramal do Brasileirinho (Manaus) (Tabela 3) e Rio Preto da Eva, Manacapuru e Iranduba (Tabela 4) promoveram aumentos significativos no rendimento de matéria seca da parte aérea e total ($p < 0,01$), raiz ($p < 0,05$), número de nódulos e peso dos nódulos secos ($p < 0,01$) do feijão caupi, superiores ao tratamento testemunha, de cada experimento.

As fontes de inóculos de amostras de solo do Catalão, Marchantaria e Careiro da Várzea (Tabela 5), também apresentaram diferenças significativas ($p < 0,01$) para os parâmetros avaliados em relação ao tratamento testemunha, com exceção da matéria seca dos nódulos, pela qual apenas a população da amostra de solo identificada por INPA CV6 diferiu significativamente do controle. Quanto às fontes de inóculos de solos de Barreirinha (Tabela 6), não houve diferenças significativas para a matéria seca da parte aérea, raiz e total em relação à testemunha, somente para número de nódulos ($p < 0,01$) e matéria seca dos nódulos ($p < 0,05$).

A deficiência de N na testemunha foi detectada visualmente observando-se coloração amarelada, nos experimentos, com as plantas apresentando clorose generalizada e menor rendimento na biomassa da parte aérea e raiz (Tabelas 2, 3, 4, 5 e 6).

O aumento significativo na biomassa do feijão caupi ocasionado pela população de rizóbio contida nas amostras de solos das diferentes regiões de coleta, mesmo na presença de uma nodulação deficiente, pode ser devido a uma maior eficiência de algumas das presentes nos nódulos das plantas em relação às suas porcentagens de ocorrência (Hara & Oliveira, 2004). Porém, nem todas as plantas que apresentaram os maiores números e peso dos nódulos secos tiveram os maiores rendimentos de matéria seca, indicando diferenças entre os isolados de rizóbio na capacidade de fixação de nitrogênio. Resultados semelhantes foram encontrados por Brose (1994) e Hara & Oliveira (2004, 2005) estudando diferentes fontes de inóculos em plantas de trevo e feijão caupi, respectivamente. Estes encontraram baixos valores de correlação entre a produção de matéria seca das plantas e número e peso dos nódulos secos, e Fernandes & Fernandes (2000) em feijão guandu.

Em solos da Amazônia nunca antes cultivados com leguminosas, Oliveira & Moreira (1993) encontraram pouco ou nenhum nódulo. No entanto, numa área anteriormente cultivada com leguminosas, Oliveira *et al.* (1992) e Hara & Oliveira (2004, 2005) observaram uma nodulação abundante, indicando a tolerância destes microrganismos às condições ácidas e de baixa fertilidade dos solos, bem como, a presença prévia da planta hospedeira favoreceu a colonização do solo por rizóbio compatível com a leguminosa. Estes resultados demonstram que também na Amazônia, o hospedeiro tem uma importância muito grande na ecologia do rizóbio no solo. Assim, pode-se inferir pelos resultados, que as pesquisas de seleção de estirpes de rizóbio para os solos na Amazônia devem enfatizar a tolerância e sobrevivência nos solos ácidos e pobres em nutrientes.

Nas fontes de inóculos INPA RB9, INPA RB10 e INPA RB13 de amostras de solos do Ramal do Brasileirinho, originárias de solos de floresta, foi observada uma baixa nodulação, onde os nódulos eram aparentemente ineficientes, pois, o seu interior possuía coloração branca, indicando ausência de leghemoglobina e houve um reduzido crescimento de bactérias a partir do extrato dos nódulos expostos ao meio de cultura, não permitindo o isolamento (Tabela 1). Martins *et al.* (1997a) também observaram que isolados de rizóbio inoculados em feijão caupi promoveram a formação de pseudo-nódulos que, apesar de não contribuir significativamente para o conteúdo de nitrogênio para as plantas, são indicativos da ocorrência da troca de sinais entre a bactéria e o hospedeiro. Observa-se dessa forma, que nas áreas de florestas e em áreas sem registro de ocorrência de leguminosas, existe um reduzido número de células de rizóbio viáveis capazes de nodular caupi. A baixa ou ausente nodulação em áreas nativas também pode estar relacionada com o baixo requerimento de N em condições de equilíbrio (Zilli *et al.*, 2000), ou devido às limitantes condições químicas do solo (como por exemplo, acidez e Al tóxico), que podem dificultar a sobrevivência da bactéria no solo. A baixa nodulação ainda, pela falta de hospedeiros, faz com que o rizóbio se adapte às condições saprofíticas, ocorrendo eventualmente perda de material genético envolvido na simbiose e fixação biológica do nitrogênio, pois nestas condições estes materiais não lhes são necessários (Sprent *et al.*, 1994). Porém, a nodulação do feijão caupi por isolados contidos nas amostras de solos de diferentes regiões na Amazônia é notável, mesmo que de feijão caupi nunca tenha sido antes cultivada em algumas áreas.

Tabela 1. Local e amostras de solos coletadas em diferentes regiões no Amazonas em áreas com e sem cultivo, utilizadas como fonte de inóculos de rizóbio e, isolados obtidos após os testes de infectividade em plantas de feijão caupi.

Coleta	Local de coleta	Solo/cultura	Código das amostras	pH ⁽¹⁾	Isolados obtidos
1	Novo Ayrão ⁽²⁾	Capoeira de 2 anos ⁽¹¹⁾	INPA NA1	4,0	INPA R806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816 e 817
		Capoeira de 2 anos	INPA NA2	3,7	818, 819, 820 e 821
		Floresta ⁽¹²⁾	INPA NA3	3,6	822, 823, 824 e 825
		Mandioca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz)	INPA NA4	3,9	826, 827, 828, 829 e 830
		Floresta	INPA NA5	4,0	831, 832, 833, 834 e 835
		Floresta	INPA NA6	4,5	836, 837, 838, 839 e 840
		Floresta	INPA NA7	3,5	841, 842, 843, 844, 845 e 846
2	Brasileirinho ⁽³⁾	Abacaxi (<i>Ananas comosus</i> (L.) Merrill.)	INPA RB1	4,1	847, 848, 849 e 850
		Coco (<i>Coco nucifera</i> L.)	INPA RB2	4,1	851 e 852
		Caju (<i>Anacardium occidentale</i> L.)	INPA RB3	3,8	855 e 856
		Ingá (<i>Inga edulis</i> Mart.)	INPA RB4	3,5	857 e 858
		Cupuaçu (<i>Theobroma grandiflorum</i> (Willd. ex Sprent.) Schum)	INPA RB5	4,0	859
		Banana (<i>Musa acuminata</i> Colla)	INPA RB6	4,1	862
		Feijão-caupi (<i>Vigna unguiculata</i> L.)	INPA RB7	4,4	864 e 865
		Mandioca (<i>M. esculenta</i> Crantz)	INPA RB8	4,3	866 e 867
		Floresta	INPA RB9	4,1	-- ⁽¹⁵⁾
		Floresta	INPA RB10	4,2	--
		Camu-camu (<i>Myrciaria dubia</i> H.B.K. (McVough)	INPA RB11	3,8	868 e 869
		Araçá-boi (<i>Eugenia stipitata</i> McVough)	INPA RB12	4,9	870, 871 e 872
		Floresta	INPA RB13	4,2	--
		Biribá (<i>Rollinia mucosa</i> (Jalq.) Baill)	INPA RB14	4,5	873, 874 e 875
		Manga (<i>Mangifera indica</i> L.)	INPA RB15	4,1	876, 877, 878, 879, 880, 881, 1007
		Caju (<i>A. occidentale</i> L.)	INPA RB16	5,2	882, 883, 884, 885, 886 e 887
		Coco (<i>C. nucifera</i> L.)	INPA RB17	5,4	888, 889, 890, 891, 892 e 893
		Graviola (<i>Annona muricata</i> L.)	INPA RB18	4,2	894, 895, 896, 897, 898, 899 e 900
3	Marchantaria ⁽⁴⁾	Canarana (<i>Echinochloa spp.</i>)	INPA MA1	4,7	901 e 902
		Couve (<i>Brassica oleracea</i> L.)	INPA MA2	4,6	903 e 904
		Mandioca (<i>M. esculenta</i> Crantz)	INPA MA3	4,9	907
	Catalão ⁽⁵⁾	Brachiaria (<i>Brachiaria brizantha</i> Hochst. ex. A.Rich.) Stapf)	INPA CA4	6,3	908, 909 e 910

Continuação ...

	C. Várzea ⁽⁶⁾	Couve (<i>B. oleracea</i> L.)	INPA CV5	4,9	911, 912, 913 e 914
		Beldroegra (<i>Portulaca oleracea</i> L.)	INPA CV6	5,0	915, 916, 917 e 1008
		Pimenta (<i>Capsicum spp.</i>)	INPA CV7	5,5	918, 919, 920, 921 e 1009
	Marchantaria	Canarana (<i>Echinochloa spp.</i>)	INPA CV8	5,3	922, 923, 924, 925, 926, 927 e 928
		Acácia (<i>Acacia mangium</i> L.)	INPA CV9	4,9	929, 930, 931, 932, 933 e 934
		Quiabo (<i>Hibiscus esculentus</i> L.)	INPA MA10	4,1	935
	C. Várzea	Feijão-caupi (<i>V. unguiculata</i> L.)	INPA MA11	4,3	936, 937 e 938
		Pimenta (<i>Capsicum spp.</i>)	INPA CV12	5,1	939, 940, 941 e 942
	Catalão	Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.)	INPA CV13	5,6	943 e 944
Sem plantio ⁽¹³⁾		INPA CV14	5,1	945 e 946	
Pepino (<i>Cucumis sativus</i> L.)		INPA CA15	4,9	947 e 948	
	Acácia (<i>A. mangium</i> L.)	INPA CA16	5,4	949, 950, 951 e 952	
	Brachiaria (<i>B. brizantha</i> Hochst. ex. A.Rich.) Stapf)	INPA CA17	5,5	953, 954 e 955	
4	R. P. Eva ⁽⁷⁾	Sem plantio	INPA TP1	4,4	956 e 957
		Tucumã (<i>Astrocaryum aculeatum</i> Meyer)	INPA TP2	4,3	958, 959, 960, 961 e 962
		Tangerina (<i>Citrus reshni</i> Hort.)	INPA TP3	5,3	963, 964, 965 e 966
		Capoeira 4 anos ⁽¹⁴⁾	INPA TP4	4,6	967 e 968
		Sem plantio	INPA TP5	4,4	969 e 970
	C. Laranjal ⁽⁸⁾	Mamão (<i>Carica papaya</i> L.)	INPA TP6	5,5	971 e 972
		Laranja (<i>Citrus aurantium</i> L.)	INPA TP7	6,0	973
		Manga (<i>M. indica</i> L.)	INPA TP8	6,1	974
	C. Açutúba ⁽⁹⁾	Cupuaçu (<i>T. Grandiflorum</i>)	INPA TP9	5,6	975
		Mamão (<i>Carica papaya</i> L.)	INPA TP10	5,5	976, 977, 978, 979, 980 e 1010
		Berinjela (<i>Solanum melongena</i> L.)	INPA TP11	5,4	981, 982, 983, 984, 985 e 985
		Tangerina (<i>C. reshni</i> Hort.)	INPA TP12	5,3	987
5	Barreirinha ⁽¹⁰⁾	Cupuaçu (<i>T. grandiflorum</i>)	INPA BA1	4,9	988, 989, 990, 991, 992, 993 e 994
		Cupuaçu (<i>T. grandiflorum</i>)	INPA BA2	4,4	995, 997, 998, 1011 e 1012
		Cupuaçu (<i>T. grandiflorum</i>)	INPA BA3	4,9	999, 1000, 1001, 1002, 1004 e 1013
		Cupuaçu (<i>T. grandiflorum</i>)	INPA BA4	4,6	1003, 1004 e 1005

⁽¹⁾ pH em água das amostras de solo, média de três repetições; ⁽²⁾ Município de Novo Ayrão, AM; ⁽³⁾ Ramal do Brasileirinho, Manaus, AM; ⁽⁴⁾ Marchantaria, Município Careiro da Várzea, AM; ⁽⁵⁾ Catalão, Município Careiro da Várzea, AM; ⁽⁶⁾ Município Careiro da Várzea, AM; ⁽⁷⁾ Município Rio Preto da Eva, AM; ⁽⁸⁾ Costa do Laranjal, Município de Manacapuru, AM; ⁽⁹⁾ Costa do Açutúba, Município de Iraduba, AM; ⁽¹⁰⁾ Município de Barreirinha, AM; ⁽¹¹⁾ Solos de Capoeira de dois anos, antecedida por plantio de mandioca; ⁽¹²⁾ Solo de floresta; ⁽¹³⁾ Área sem plantio; ⁽¹⁴⁾ Solo de capoeira de quatro anos, antecido por plantio de mandioca; ⁽¹⁵⁾ Não se obteve isolados destas amostras de solo.

Tabela 2. Matéria seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e total (MST), número de nódulos (NN) e matéria seca dos nódulos (MSN) de raízes de feijão caupi, colonizadas por rizóbios provenientes de solos do Município de Novo Ayrão, AM (INPA NA). ⁽¹⁾

Inóculos	MSPA (g vaso ⁻¹)	MSR (g vaso ⁻¹)	MST (g vaso ⁻¹)	NN/vaso	MSN (mg vaso ⁻¹)
INPA NA1	5,37 a	2,27 ab	7,64 ab	76,3 a	377 ab
INPA NA2	5,73 a	4,33 ab	10,06 a	82,7 a	360 ab
INPA NA3	5,63 a	5,13 a	10,76 a	77 a	300 ab
INPA NA4	6,20 a	3,70 ab	9,9 a	92,7 a	310 ab
INPA NA5	5,43 a	2,57 ab	8,0 ab	79 a	430 a
INPA NA6	7,13 a	2,57 ab	9,7 a	106 a	313 ab
INPA NA7	5,80 a	4,13 ab	9,93 a	78,7 a	423 ab
Testemunha	2,23 b	1,47 b	3,7 b	0 c	0 c
CV (%) ⁽²⁾	15	39,10	19,34	20,77	3,96

⁽¹⁾ Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste tukey a 5% de probabilidade.

⁽²⁾ Coeficiente de variação.

Tabela 3. Matéria seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e total (MST), número de nódulos (NN) e matéria seca dos nódulos (MSN) de raízes de feijão caupi, colonizadas por rizóbios provenientes de solos do Ramal do Brasileirinho, Manaus, AM (INPA RB). ⁽¹⁾

Inóculos	MSPA (g vaso ⁻¹)	MSR (g vaso ⁻¹)	MST (g vaso ⁻¹)	NN/vaso	MSN (mg vaso ⁻¹)
INPA RB1	1,93 abc	0,91 bcd	2,84 abcd	11,7 ab	13,3 b
INPA RB2	2,76 ab	1,74 a	4,50 a	8,0 ab	53,3 ab
INPA RB3	1,69 bc	0,71 bcd	2,40 bcd	2,0 ab	3,3 b
INPA RB4	2,51 ab	1,23 ab	3,74 abc	2,7 ab	23,3 b
INPA RB5	3,30 a	1,19 abc	4,49 a	40 ab	90 ab
INPA RB6	2,69 ab	1,19 abc	3,88 ab	52,3 a	113,3 ab
INPA RB7	1,94 abc	0,84 bcd	2,78adbc	16,7 ab	126,7 ab
INPA RB8	2,80 ab	0,77 bcd	3,57 abc	17,3 ab	263,3 a
INPA RB9	1,67 bc	0,61 bcd	2,28 bcd	5,7 ab	86,7 ab
INPA RB10	1,57 bc	0,80 bcd	2,37 bcd	17,3 ab	66,7 ab
INPA RB11	2,15 abc	0,86 bcd	3,01 abcd	26,7 ab	106,7 ab
INPA RB12	2,72 ab	0,81 bcd	3,53 abc	11,7 ab	256,7 a
INPA RB13	1,08 c	0,50 d	1,58 d	3,0 ab	22,7 b
INPA RB14	1,44 bc	0,56 d	2,00 cd	7,7 ab	51,7 ab
INPA RB15	0,92 c	0,38 d	1,30 d	18,3 ab	65 ab
INPA RB16	1,60 bc	0,49 d	2,09 cd	10,7 ab	83,7 ab
INPA RB17	1,67 bc	0,53 d	2,20 bcd	24,0 ab	90 ab
INPA RB18	1,51 bc	0,62 bcd	2,13 bcd	16,7 ab	94,7 ab
Testemunha	1,57 bc	0,63 bcd	2,20 bcd	0 b	0 b
CV (%) ⁽²⁾	23,08	25,11	20,55	60,23	5,58

⁽¹⁾ Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste tukey a 5% de probabilidade.

⁽²⁾ Coeficiente de variação.

Tabela 4. Matéria seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e total (MST), número de nódulos (NN) e matéria seca dos nódulos (MSN) de raízes de feijão caupi, colonizadas por rizóbios provenientes de solos de terra preta do Rio Preto da Eva (INPA TP1 a 5), Manacapuru (INPA TP 6 a 9) e Iranduba (INPA TP 10 a 12), AM ⁽¹⁾

Inóculos	MSPA (g vaso ⁻¹)	MSR (g vaso ⁻¹)	MST (g vaso ⁻¹)	NN/vaso	MSN (mg vaso ⁻¹)
INPA TP1	1,46 b	0,29 b	1,75 c	19,3 bc	53,3 bc
INPA TP2	2,52 a	0,39 ab	2,91 ab	22,7 bc	63,5 abc
INPA TP3	3,19 a	0,46 ab	3,65 a	45,3 ab	166,7 a
INPA TP4	2,84 a	0,5 ab	3,34 a	17,3 bc	123,3 ab
INPA TP5	1,58 b	0,63 a	2,21 bc	32,7 abc	156,7 ab
INPA TP6	2,94 a	0,45 ab	3,39 a	44,3 ab	143,3 ab
INPA TP7	2,83 a	0,41 ab	3,24 a	42 ab	120 ab
INPA TP8	3,06 a	0,45 ab	3,51 a	43,3 ab	160 a
INPA TP9	2,98 a	0,48 ab	3,46 a	41,7 ab	150 ab
INPA TP10	3,01 a	0,45 ab	3,46 a	28,7 abc	133,3 ab
INPA TP11	3,11 a	0,58 ab	3,69 a	40,7 ab	150 ab
INPA TP12	2,82 a	0,53 ab	3,35 a	114,3 a	136,7 ab
Testemunha	1,53 b	0,37 ab	1,9 c	0 c	0 c
CV (%) ⁽²⁾	9,21	22,68	9,59	31	2,86

⁽¹⁾ Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste tukey a 5% de probabilidade.

(2) Coeficiente de variação.

Tabela 5. Matéria seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e total (MST), número de nódulos (NN) e matéria seca dos nódulos (MSN) de raízes de feijão caupi, colonizadas por rizóbios provenientes de solos do Catalão (INPA CA), Marchantaria (INPA MA) e Careiro da Várzea (INPA CV), AM. ⁽¹⁾

Inóculos	MSPA (g vaso ⁻¹)	MSR (g vaso ⁻¹)	MST (g vaso ⁻¹)	NN/vaso	MSN (mg vaso ⁻¹)
INPA MA1	2,78 abc	0,65 ab	3,43 ab	28,3 ab	133 ab
INPA MA2	2,69 abc	0,61 abc	3,30 ab	33 ab	123 ab
INPA MA3	3,20 ab	0,62 abc	3,82 a	28,3 ab	100 ab
INPA CA4	3,49 a	0,57 abc	4,06 a	57,7 ab	137 ab
INPA CV5	2,43 abc	0,62 abc	3,05 ab	41,3 ab	107 ab
INPA CV6	3,0 abc	0,87 a	3,87 a	26 ab	413 a
INPA CV7	2,42 abc	0,52 bc	2,94 ab	32,3 ab	73 b
INPA CV8	2,92 abc	0,62 abc	3,54 a	42 ab	110 ab
INPA CV9	3,05 abc	0,60 abc	3,65 a	34,3 ab	103 ab
INPA MA10	1,9 bc	0,65 ab	2,55 ab	21,7 b	117 ab
INPA MA11	2,07 abc	0,55 bc	2,62 ab	31 ab	67 b
INPA CV12	3,17 ab	0,51 bc	3,68 a	51,7 ab	127 ab
INPA CV13	3,31 ab	0,67 ab	3,98 a	43 ab	140 ab
INPA CV14	2,62 abc	0,59 abc	3,21 ab	42,3 ab	107 ab
INPA CA15	2,51 abc	0,71 bc	3,22 ab	76,7 a	120 ab
INPA CA16	2,92 abc	0,63 abc	3,55 a	48,7 ab	113 ab
INPA CA17	3,02 abc	0,61 abc	3,63 a	50,7 ab	113 ab
Testemunha	1,6 c	0,33 c	1,93 b	0 c	0 b
CV (%) ⁽²⁾	17,37	16,69	15,44	19,95	7,34

⁽¹⁾ Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste tukey a 5% de probabilidade.

(2) Coeficiente de variação.

Tabela 6. Matéria seca da parte aérea (MSPA), da raiz (MSR) e total (MST), número de nódulos (NN) e matéria seca dos nódulos (MSN) de raízes de feijão caupi, colonizadas por rizóbios provenientes de solos do Município de Barreirinha, AM. (INPA BA). ⁽¹⁾

Inóculos	MSPA (g vaso ⁻¹)	MSR (g vaso ⁻¹)	MST (g vaso ⁻¹)	NN/vaso	MSN (mg vaso ⁻¹)
INPA BA1	1,66 a	0,58 a	2,24 a	24,7 a	129,3 a
INPA BA2	1,56 a	0,50 a	2,06 a	13,3 a	66,7 ab
INPA BA3	1,48 a	0,53 a	2,01 a	20,3 a	109,7 ab
INPA BA4	0,89 a	0,39 a	1,28 a	30 a	91,7 ab
Testemunha	1,05 a	0,43 a	1,48 a	0 b	0 c
CV (%) ⁽²⁾	28,1	29,81	27,62	25,58	3,88

⁽¹⁾ Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste tukey a 5% de probabilidade.

⁽²⁾ Coeficiente de variação.

Caracterização morfofisiológica dos isolados

Inicialmente obteve-se 200 isolados representativos dos solos coletados nas diversas regiões (Tabela 1) os quais se apresentaram bastantes heterogêneos em suas características morfofisiológicas (Tabela 8).

O dendrograma (Figura 1) ilustra uma grande diversidade entre os isolados, com a formação de vários grupos. Foi utilizado inicialmente o coeficiente de similaridade de 0,55, o qual possibilitou a formação de cinco grandes grupos (GG) divididos em subgrupos (SG) de isolados (Tabela 7). A similaridade dos grandes grupos GG1, GG2 e GG3 foi de aproximadamente 80%, e estes grandes grupos em relação ao grande grupo GG4 foi de aproximadamente 60%. Já o grande grupo GG5 apresentou similaridade pouco acima de 55% em relação aos outros grandes grupos. Análise de cluster com parâmetros morfológicos e fisiológicos de isolados de rizóbios, de amostras de solo de diferentes regiões, também mostraram ampla diversidade (Hungria *et al.*, 2001a; Germano *et al.*, 2003; Zilli *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2005).

O primeiro grande grupo (GG1) foi subdividido em quatro subgrupos (SG's I, II, III e IV), apresentando similaridade superior a 80% entre os isolados agrupados e reuniu no SGI 11 isolados com similaridade superior a 85%. Para os subgrupos II, III e IV agrupou-se 21, 17 e 3

isolados, respectivamente, com similaridade de aproximadamente 90% (Tabela 7, Figura 1). A maioria dos isolados agrupados neste grande grupo (87%) é originária das amostras de solo coletadas nas regiões de Novo Ayrão, Barreirinha e Ramal do Brasileirinho. As características predominantes nos sub-grupos de isolados do GG1 foram o tempo de crescimento menor que três dias com características de isolados de crescimento rápido, pH do meio ácido, forma da colônia circular, borda inteira, colônia transparente, aparência homogênea, cor branca, aparência do muco homogêneo e o tipo de muco viscoso. Características diferentes ocorreram no tamanho da colônia, elevação da colônia e elasticidade do muco (Tabela 8).

O segundo grande grupo (GG2) apresentou similaridade aproximadamente de 80% entre os isolados agrupados em dois subgrupos, apresentando, cada subgrupo, índice de similaridade superior a 80%. Foram agrupados 27 isolados no GG2, com 15 isolados no SG V e 12 no SG VI (Tabela 7, Figura 1), onde foi possível observar a ocorrência de isolados das diferentes regiões de coleta, com exceção de isolados das regiões de Barreirinha e Marchantaria, que não ocorreram neste grande grupo. Observou-se neste grande grupo, que as características comuns nos isolados foram à forma circular das colônias, a borda inteira, não transparência, aparência homogênea da colônia, cor branca, muco homogêneo e o tipo de muco viscoso. As características que apresentaram diferenças foram o tamanho da colônia, pH do meio, tamanho da colônia, elevação da colônia e elasticidade do muco (Tabela 8).

No terceiro grande grupo (GG3) foram agrupados 41 isolados, com similaridade de aproximadamente 75%. Este GG3 foi dividido em cinco subgrupos sendo os SG VII (11 isolados), SG VIII (6 isolados), SG IX (17 isolados) e SG X (5 isolados) com similaridades de aproximadamente 90% entre os isolados dentro de cada subgrupo e o SG XI (2 isolados) com similaridade de aproximadamente 80% (Tabela 7, Fig. 1). Neste grande grupo observou-se a presença de isolados das diferentes regiões de coleta, com predominância das regiões com solos de terra preta (Irاندuba e Manacapuru) e Careiro da Várzea. As características comuns encontradas para todos os subgrupos foram a forma circular das colônias, borda inteira, aparência homogênea das colônias, aparência homogênea do muco e tipo de muco viscoso. As características que diferiram dentro e entre subgrupos foram o tempo de crescimento das colônias, pH do meio, tamanho das colônias, elevação das colônias, transparência das colônias, cor das colônias e elasticidade do muco (Tabela 8).

No grande grupo quatro (GG4) foi observada uma similaridade de aproximadamente 80% entre os 36 isolados agrupados. Este grande grupo foi dividido em quatro subgrupos, com similaridade de 80% para os SG XII (14 isolados) e SG XIII (14 isolados) e de 90% para os SG XIV (4 isolados) e SG XV (4 isolados) (Tabela 7, Figura 1). Houve predominância dos isolados obtidos das amostras de solo da região de Novo Ayrão. Quanto às características encontradas dentro e entre os subgrupos, somente a forma circular, borda inteira e aparência homogênea das colônias, bem como a aparência homogênea do muco foram comuns para todos os subgrupos. Já o tempo de crescimento, elevação, transparência e cor das colônias, elasticidade e tipo de muco foram diferentes dentro e entre alguns subgrupos (Tabela 8).

No grande grupo cinco (GG5) foi observado o agrupamento de 43 isolados com similaridade de aproximadamente 70%. O GG5 foi dividido em cinco subgrupos com similaridades de aproximadamente 80% para os SG XVI (16 isolados), SG XVII (13 isolados) e SG XVIII (5 isolados), e 75 e 90% para os SG XIX (3 isolados) e SG XX (6 isolados), respectivamente (Tabela 7, Figura 1). Para este grande grupo predominaram isolados obtidos das regiões de Iranduba, Manacapuru, Ramal do Brasileirinho e Marchantaria. Para este grupo somente a aparência homogênea das colônias foi comum para todos os subgrupos (Tabela 8).

O dendrograma mostra, também, o não agrupamento do isolado INPAR848 em nenhum dos grandes grupos, apresentando-se como isolado em relação ao dendrograma total (Tabela 7, Figura 1).

A forma da colônia é dependente da presença de muco, o que é muito comum no gênero *Bradyrhizobium* (Fuhrmann, 1990). A consistência do muco produzido é também bastante variada, principalmente nos isolados de crescimento rápido. Enquanto algumas colônias apresentam aspecto gomoso, outras são aquosas, com o muco chegando a coalescer por toda a placa, tornando difícil o isolamento da colônia depois de alguns dias.

As bactérias que nodulam o caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) têm sido consideradas rotineiramente como pertencentes ao grupo miscelânea “caupi” ou *Bradyrhizobium* spp., compreendendo um número grande de estirpes de crescimento lento capazes de nodular inúmeras espécies de leguminosas herbáceas comuns na região tropical (Jordan, 1984). Neste estudo, cerca de 60% dos isolados obtidos das diferentes regiões de coleta na Amazônia apresentaram crescimento rápido em meio de cultura indicando que o limite das estirpes capazes de nodular

caupi vai além do grupo *Bradyrhizobium* spp. Por essa razão, as bactérias isoladas da região amazônica neste trabalho, foram de forma geral, referidas como rizóbio.

As características culturais e morfológicas das espécies bacterianas pertencentes à família Rhizobiaceae e capaz de formar nódulo em leguminosas, genericamente identificadas como rizóbio, fornecem informações importantes para sua identificação e agrupamento. Graham (1976) destacou entre várias outras características, o tempo de crescimento e reação do pH em meio com extrato de levedura, manitol, sais minerais e Agar (YMA) como testes fisiológicos significativos na taxonomia de rizóbio, assim como Martins *et al.* (1997b), que descrevem as principais características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de rizóbio, servindo para o levantamento de isolados de rizóbio que nodula feijão caupi. Da mesma forma para diferentes regiões e ecossistemas como no Sertão e Zona da Mata no Nordeste (Neves *et al.*, 1998a,b), em sistema integrado de produção agroecológica (Zilli *et al.*, 1998), Cerrado (Zilli *et al.*, 2000, 2004), Amazonas (Hara & Oliveira, 2004; 2005), Paraíba (Silva *et al.*, 2005) e Minas Gerais (Ferreira *et al.*, 2005), mostrando uma enorme diversidade na população de rizóbios dos solos estudados.

Inúmeros trabalhos têm sido publicados com base em características fenotípicas visando à caracterização de diferentes populações de rizóbio nodulando as mais diversas plantas hospedeiras (Sweelim *et al.*, 1997; Ramirez *et al.*, 1997; Xavier *et al.*, 1998; Straliootto & Rumjanek, 1999b; Zilli *et al.*, 2004). Muitas destas características fenotípicas são estudadas com o objetivo não somente de caracterização, mas de verificar a provável adaptabilidade ecológica dos diferentes isolados às condições ambientais prevalentes no ecossistema para o qual se procede a seleção do rizóbio-inoculante. Além disso, busca-se correlacionar dados de diversidade metabólica com os de eficiência simbiótica, uma vez que aquela deve refletir a diversidade dos mecanismos de controle das interações simbióticas entre estirpes de rizóbio e as diferentes leguminosas (Batzli *et al.*, 1992).

Em termos ecológicos, a análise de dados fenotípicos tem aplicabilidade restrita devido ao grande número de interações que ocorrem no sistema solo, tanto bióticas como abióticas, especialmente quando se considera os microagregados do solo onde se alojam as populações bacterianas e a influência do ambiente rizosférico. Estas interações dificultam as correlações entre os resultados em nível de laboratório com os obtidos em nível de campo. No entanto, em termos taxonômicos, após a introdução dos métodos de taxonomia numérica, permitindo o

agrupamento de um grande número de isolados com características fenotípicas semelhantes, a análise destes dados tornou-se imprescindível. Atualmente, apesar da quantidade de dados genotípicos na literatura, a correlação destes com as características fenotípicas é uma das condições para a descrição de novos gêneros e espécies bacterianas. Além disso, estas análises de agrupamento facilitam o estudo comparativo dos diferentes grupos, tanto intraespecíficos como interespecíficos, quanto a diferentes características em nível de campo.

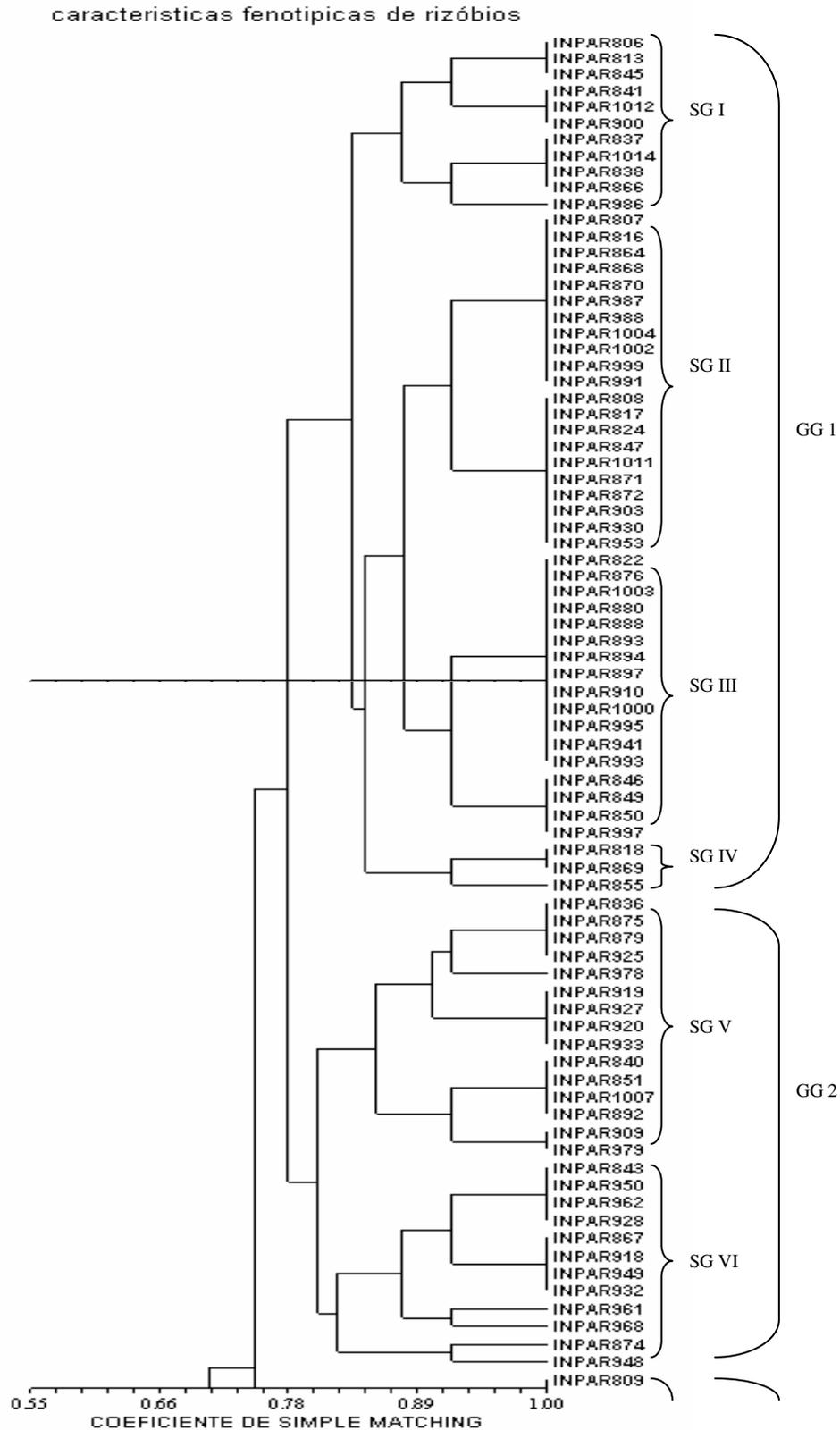
A caracterização morfofisiológica possibilitou um maior conhecimento da população de rizóbios dos solos coletados neste trabalho, e o agrupamento facilitará o desenvolvimento das etapas seguintes de confirmação da nodulação e seleção de rizóbio eficiente para a fixação do N_2 em variedades de feijão caupi. Segundo Hameed *et al.* (2004), o estudo das características fisiológicas e morfológicas revela uma diversidade bastante ampla dos isolados de rizóbio e costuma estar relacionado com estudos em nível de DNA. Estes dados são importantes, uma vez que o conhecimento das comunidades nativas por meio destas ou de outras técnicas revelam-se fundamentais para se conhecer a diversidade das espécies, principal recurso para o trabalho na área de biotecnologia.

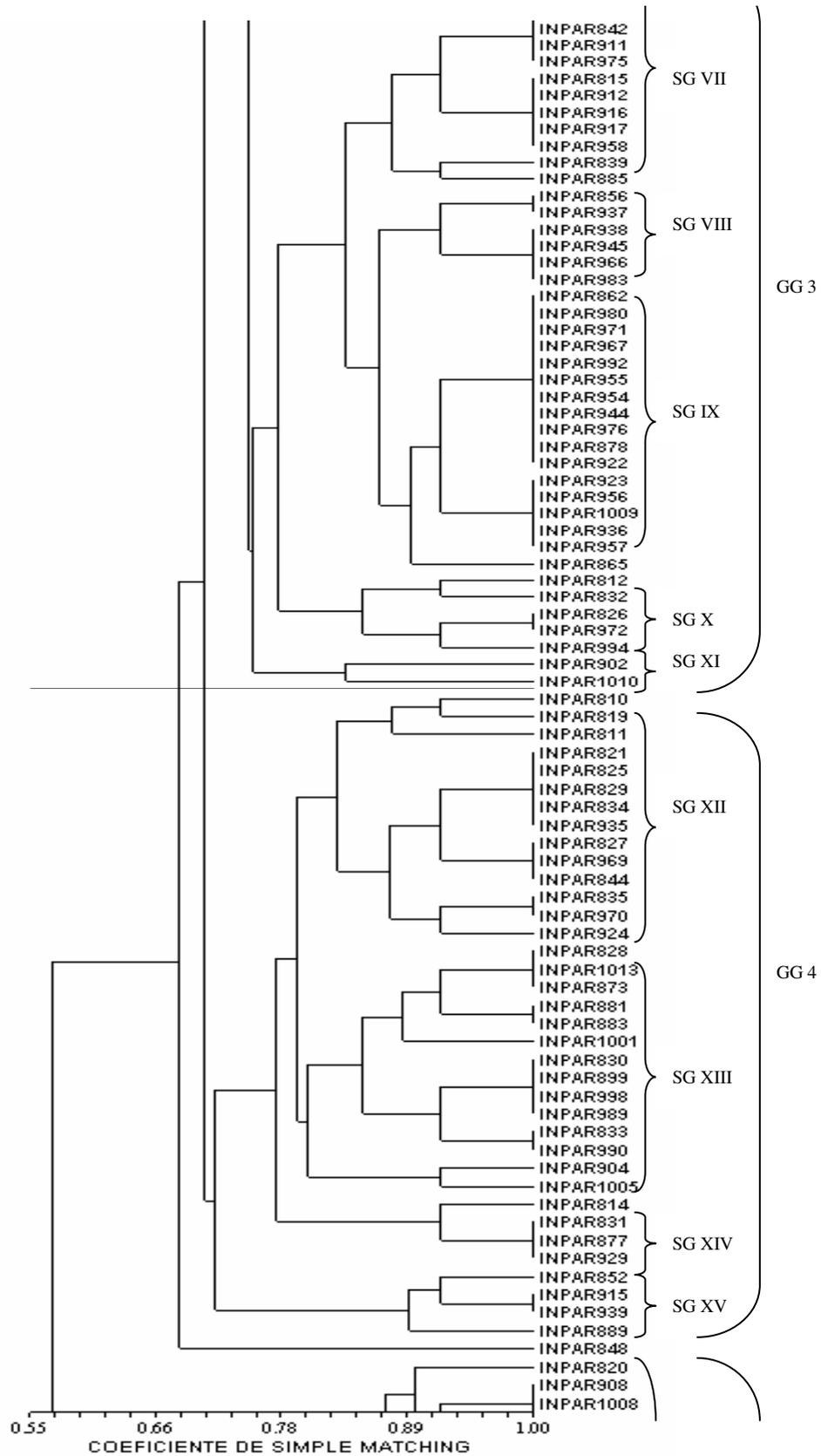
Tabela 7. Grandes grupos (GG) e Sub-Grupos (SG) dos isolados de rizóbio associados a feijão caupi de acordo com a caracterização morfofisiológica.

GG	SG	Isolados
GG 1	SG I	806, 813, 845, 841, 1012, 900, 837, 1014, 838, 866, 986
	SG II	807, 816, 864, 868, 870, 987, 988, 1004, 1002, 999, 991, 808, 817, 824, 847, 1011, 871, 872, 903, 930, 953
	SG III	822, 876, 1003, 880, 888, 893, 894, 897, 910, 1000, 995, 941, 993, 846, 849, 850, 997
	SG IV	818, 869, 855
GG 2	SG V	836, 875, 879, 925, 978, 919, 927, 920, 933, 840, 851, 1007, 892, 909, 979
	SG VI	843, 950, 962, 928, 867, 918, 949, 932, 961, 968, 874, 948
GG 3	SG VII	809, 842, 911, 975, 815, 912, 916, 917, 958, 839, 885
	SG VIII	856, 937, 938, 945, 966, 983
	SG IX	862, 980, 971, 967, 992, 955, 954, 944, 976, 878, 922, 923, 956, 1009, 936, 957, 865
	SG X	812, 832, 826, 972, 994
	SG XI	902, 1010
GG 4	SG XII	810, 819, 811, 821, 825, 829, 834, 935, 827, 969, 844, 835, 970, 924
	SG XIII	828, 1013, 873, 881, 883, 1001, 830, 899, 998, 989, 833, 990, 904, 1005
	SG XIV	814, 831, 877, 929
	SG XV	852, 915, 939, 889
GG 5	SG XVI	820, 908, 1008, 960, 921, 857, 858, 901, 982, 963, 907, 952, 934, 940, 965, 964
	SG XVII	890, 898, 942, 951, 977, 931, 943, 985, 981, 947, 973, 984, 974
	SG XVIII	913, 914, 946, 926, 959
	SG XIX	823, 895, 859
	SG XX	882, 884, 886, 887, 891, 996
		848 *

- Isolado em relação ao dendrograma total.

Figura 1: Dendrograma das características morfofisiológicas de isolados de rizóbio associados a feijão caupi variedade IPEAN V-69.





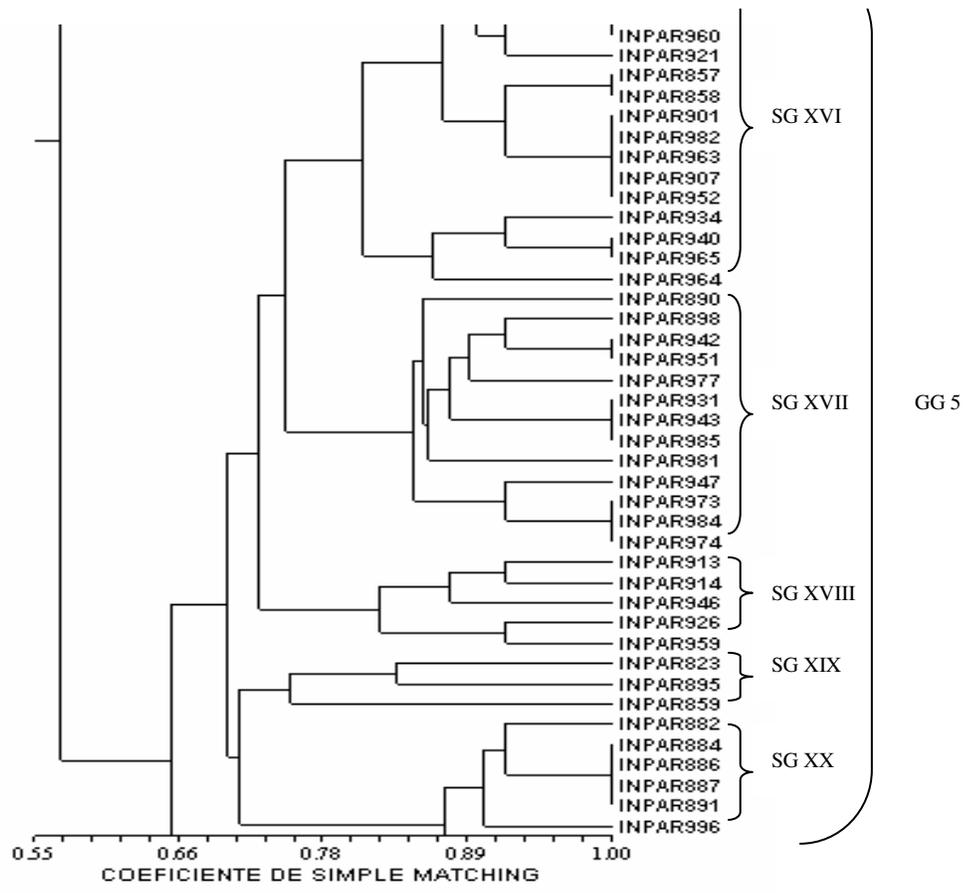


Tabela 8: Caracterização morfológica de isolados de rizóbio obtidos do feijão caupi com amostras de solos da Amazônia.

Isolados	Tempo de crescimento	pH do Meio ⁽¹⁾	Tamanho da colônia ⁽²⁾	Forma da colônia	Elevação da colônia	Borda	Transp ⁽³⁾	Aparência da colônia ⁽⁵⁾	Cor da colônia	Aparência do muco	Elasticidade do muco	Tipo de muco
INPA R806	2 a 3	ácido	>> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog ⁽⁵⁾	branca	homog	com	viscoso
INPA R807	2 a 3	ác. leve ⁽⁴⁾	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R808	2 a 3	ác. leve	2	circular	plana	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R809	4	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R810	3 a 4	ác. leve	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	com	butírico
INPA R811	5 a 7	alcalino	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	butírico
INPA R812	4	alcalino	>> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R813	3	ácido	>> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	com	viscoso
INPA R814	2 a 3	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	com	butírico
INPA R815	4	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R816	2	ácido	< 2	circular	eleada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R817	2	ác. leve	< 2	circular	plana	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R818	2 a 3	alcalino	2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R819	4	ác. leve	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	butírico
INPA R820	2	ácido	<< 2	circular	plana	inteira	sim	heterog ⁽⁶⁾	amarela	heterog	sem	viscoso
INPA R821	3 a 5	ác. leve	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	butírico
INPA R822	2	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R823	2 a 3	alcalino	> 2	circular	elevada	inteira	sim	heterog	branca	heterog	sem	viscoso
INPA R824	2	ácido	< 2	circular	plana	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R825	3 a 4	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	butírico
INPA R826	4	ácido	>> 2	circular	plana	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R827	4	ác. leve	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	com	butírico
INPA R828	2	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	butírico
INPA R829	3 a 5	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	butírico
INPA R830	2 a 3	ácido	<< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	butírico
INPA R831	3	ác. leve	> 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	com	butírico
INPA R832	5	ácido	>> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R833	2 a 3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	amarela	homog	sem	butírico
INPA R834	6	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	butírico
INPA R835	4	ác. leve	> 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	com	butírico
INPA R836	2	ác. leve	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R837	2	ácido	< 2	circular	plana	inteira	sim	homog	branca	homog	com	viscoso

Continuação ...

INPA R838	3	ác. leve	< 2	circular	plana	inteira	sim	homog	branca	homog	com	viscoso
INPA R839	3 a 4	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	com	viscoso
INPA R840	3	ác. leve	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	com	viscoso
INPA R841	2 a 3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	com	viscoso
INPA R842	5 a 7	ác. leve	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R843	6	ác. leve	> 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R844	4 a 5	ác. leve	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	com	butírico
INPA R845	2	ác. leve	> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	com	viscoso
INPA R846	3	ácido	> 2	circular	plana	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R847	3	ácido	< 2	circular	plana	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R848	4	alcalino	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	com	viscoso
INPA R849	3	ácido	> 2	circular	plana	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R850	3	ácido	> 2	circular	plana	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R851	2	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	com	viscoso
INPA R852	3	alcalino	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	amarela	homog	sem	viscoso
INPA R855	2	alcalino	< 2	circular	plana	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R856	5 a 7	alcalino	< 2	circular	plana	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R857	3	ácido	< 2	circular	plana	inteira	sim	heterog	branca	heterog	sem	viscoso
INPA R858	3	ácido	< 2	circular	plana	inteira	sim	heterog	branca	heterog	sem	viscoso
INPA R859	3 a 5	ác. leve	> 2	circular	elevada	inteira	sim	heterog	branca	heterog	sem	butírico
INPA R862	3 a 4	ác. leve	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R864	2	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R865	4 a 6	alcalino	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R866	2	ácido	< 2	circular	plana	inteira	sim	homog	branca	homog	com	viscoso
INPA R867	2 a 3	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R868	2	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R869	2	alcalino	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R870	3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R871	3	ácido	< 2	circular	plana	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R872	3	ácido	< 2	circular	plana	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R873	3	ác. leve	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	butírico
INPA R874	4	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	com	viscoso
INPA R875	2 a 3	ácido	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R876	2	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso

Continuação ...

INPA R877	2	ác. leve	> 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	com	butírico
INPA R878	3 a 5	ác. leve	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R879	3	ác. leve	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R880	2	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R881	2	ácido	>> 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	com	butírico
INPA R882	4	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	heterog	branca	heterog	com	viscoso
INPA R883	3	ác. leve	> 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	butírico
INPA R884	2 a 3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	heterog	branca	heterog	com	viscoso
INPA R885	4	ácido	<< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	com	viscoso
INPA R886	3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	heterog	branca	homog	com	viscoso
INPA R887	2	ácido	<< 2	circular	elevada	inteira	sim	heterog	branca	heterog	com	viscoso
INPA R888	2	ác. leve	>> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R889	2	ác. leve	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	amarela	homog	sem	butírico
INPA R890	2	ác. leve	>> 2	circular	plana	irregular	sim	heterog	amarela	heterog	sem	viscoso
INPA R891	3	ác. leve	2	circular	elevada	inteira	sim	heterog	branca	heterog	com	viscoso
INPA R892	3	ácido	2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	com	viscoso
INPA R893	2	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R895	3	ácido	> 2	irregular	elevada	inteira	sim	heterog	branca	heterog	sem	Viscose
INPA R896	2	ácido	> 2	circular	plana	inteira	sim	heterog	branca	heterog	com	Viscose
INPA R897	2	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	Viscose
INPA R898	2	ácido	>> 2	circular	elevada	inteira	sim	heterog	amarela	heterog	sem	Viscose
INPA R899	2	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	Butírico
INPA R900	3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	com	Viscose
INPA R901	5	ácido	< 2	circular	plana	inteira	sim	heterog	branca	heterog	sem	Viscose
INPA R902	3	ácido	< 2	circular	plana	inteira	sim	homog	amarela	homog	sem	Viscose
INPA R903	2	ácido	< 2	circular	plana	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	Viscose
INPA R904	3	ác. leve	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	Butírico
INPA R907	3 a 4	ác. leve	< 2	circular	plana	inteira	sim	heterog	branca	heterog	sem	Viscose
INPA R908	4	ácido	2	circular	plana	inteira	sim	heterog	amarela	heterog	sem	Viscose
INPA R909	3	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	com	Viscose
INPA R910	3	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	Viscose
INPA R911	3 a 4	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	Viscose
INPA R912	3 a 4	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	Viscose
INPA R913	4	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	não	heterog	amarela	heterog	sem	Viscose

Continuação ...												
INPA R914	3 a 4	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	não	heterog	branca	heterog	sem	Viscose
INPA R915	2	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	amarela	homog	sem	Viscose
INPA R916	5	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	Viscose
INPA R917	6	ác. leve	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R918	2	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R919	2	ác. leve	2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R920	3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R921	3 a 4	ácido	< 2	circular	plana	interia	não	heterog	amarela	heterog	sem	viscoso
INPA R922	3 a 5	ác. leve	<< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R923	3 a 5	ácido	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	amarela	homog	sem	viscoso
INPA R924	3 a 5	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	butírico
INPA R925	2 a 3	ácido	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R926	2	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	não	heterog	branca	heterog	sem	viscoso
INPA R927	2	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R928	4 a 5	ác. leve	> 2	circular	elevada	interia	não	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R929	2	ác. leve	> 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	com	butírico
INPA R930	2 a 4	ácido	< 2	circular	plana	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R931	3	ácido	> 2	circular	plana	inteira	não	heterog	amarela	heterog	sem	viscoso
INPA R932	2	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R933	3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R934	4 a 6	alcalino	< 2	circular	plana	inteira	não	heterog	branca	heterog	sem	viscoso
INPA R935	4	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	butírico
INPA R936	5 a 7	ácido	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	amarela	homog	sem	viscoso
INPA R937	5 a 7	alcalino	< 2	circular	plana	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R938	5	ácido	< 2	circular	plana	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R939	2 a 3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	amarela	homog	sem	viscoso
INPA R940	5 a 7	ácido	< 2	circular	plana	inteira	não	heterog	branca	heterog	sem	viscoso
INPA R941	3	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R942	3	ácido	> 2	circular	plana	inteira	sim	heterog	amarela	heterog	sem	viscoso
INPA R943	2 a 3	ác. leve	> 2	circular	plana	inteira	não	heterog	amarela	heterog	sem	viscoso
INPA R944	5 a 7	ácido	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R945	5 a 6	ác. leve	<< 2	circular	plana	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R946	4 a 5	ácido	>> 2	circular	elevada	inteira	não	heterog	amarela	heterog	sem	viscoso
INPA R947	3	ác. leve	> 2	circular	plana	inteira	não	heterog	branca	heterog	sem	viscoso

Continuação ...

INPA R948	3 a 4	alcalino	> 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	com	viscoso
INPA R949	2 a 3	ácido	>> 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R950	3 a 5	ácido	>> 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R951	2 a 3	ácido	> 2	circular	plana	inteira	sim	heterog	amarela	heterog	sem	viscoso
INPA R952	5 a 7	ácido	< 2	circular	plana	inteira	sim	heterog	branca	heterog	sem	viscoso
INPA R953	2 a 3	ácido	< 2	circular	plana	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R954	3 a 4	ác. leve	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R955	7	ác. leve	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R956	3 a 5	ácido	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	amarela	homog	sem	viscoso
INPA R957	3 a 5	ácido	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	amarela	homog	sem	viscoso
INPA R958	3 a 4	ác. leve	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R959	3	ácido	>> 2	circular	elevada	inteira	não	heterog	branca	heterog	sem	viscoso
INPA R960	3 a 5	ácido	< 2	circular	plana	inteira	sim	heterog	amarela	heterog	sem	viscoso
INPA R961	3	ác. leve	>2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R962	4 a 5	ácido	>2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R963	3 a 5	ácido	< 2	circular	plana	inteira	sim	heterog	branca	heterog	sem	viscoso
INPA R964	6 a 7	alcalino	> 2	circular	plana	inteira	não	heterog	branca	heterog	sem	viscoso
INPA R965	3 a 5	ácido	< 2	circular	plana	inteira	não	heterog	branca	heterog	sem	viscoso
INPA R966	3 a 5	ác. leve	< 2	circular	plana	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R967	3 a 5	ácido	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R968	3 a 5	ácido	> 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R969	4 a 6	ác. leve	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	com	butírico
INPA R970	3 a 4	ác. leve	> 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	com	butírico
INPA R971	3 a 5	ácido	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R972	3 a 4	ác. leve	> 2	circular	plana	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R973	2	ácido	>> 2	circular	plana	inteira	sim	heterog	branca	heterog	sem	viscoso
INPA R974	2 a 3	ácido	> 2	circular	plana	inteira	sim	heterog	branca	heterog	sem	viscoso
INPA R975	3 a 4	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R976	3 a 5	ác. leve	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R977	3 a 4	ácido	> 2	circular	plana	inteira	sim	heterog	amarela	heterog	sem	viscoso
INPA R978	2 a 3	ácido	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	com	viscoso
INPA R979	2 a 3	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	com	viscoso
INPA R980	5 a 7	ác. leve	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R981	2 a 3	ácido	> 2	circular	plana	inteira	sim	heterog	amarela	heterog	com	viscoso

Continuação ...

INPA R982	3 a 4	ác. leve	< 2	circular	plana	inteira	sim	heterog	branca	heterog	sem	viscoso
INPA R983	5 a 7	ác. leve	< 2	circular	plana	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R984	2 a 3	ácido	> 2	circular	plana	inteira	sim	heterog	branca	heterog	sem	viscoso
INPA R985	3	ác. leve	> 2	circular	plana	inteira	não	heterog	amarela	heterog	sem	viscoso
INPA R986	2a 3	ácido	> 2	circular	plana	inteira	sim	homog	branca	homog	com	viscoso
INPA R987	2	ác. leve	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R988	2	ác. leve	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R989	2	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	butírico
INPA R990	3	ácido	<< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	amarela	homog	sem	butírico
INPA R991	2	ácido	2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R992	4 a 5	ácido	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R993	2	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R994	3 a 4	ácido	> 2	circular	plana	inteira	sim	homog	amarela	homog	sem	viscoso
INPA R995	2	ácido	>> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R996	2	ácido	> 2	circular	elevada	inteira	sim	heterog	branca	heterog	com	viscoso
INPA R997	2	ácido	> 2	circular	plana	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R998	2	ác. leve	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	butírico
INPA R999	2	ác. leve	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R1000	2	ácido	>> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R1001	2	alcalino	<< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	butírico
INPA R1002	2	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R1003	2	ácido	>> 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R1004	2	ác. leve	<< 2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R1005	4	ácido	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	branca	homog	sem	butírico
INPA R1007	3	ácido	< 2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	com	viscoso
INPA R1008	5 a 7	ácido	< 2	circular	plana	interia	sim	heterog	amarela	heterog	sem	viscoso
INPA R1009	3 a 5	ácido	< 2	circular	plana	inteira	não	homog	amarela	homog	sem	viscoso
INPA R1010	3 a 4	ácido	< 2	circular	plana	interia	sim	homog	amarela	homog	com	viscoso
INPA R1011	2	ácido	2	circular	plana	inteira	sim	homog	branca	homog	sem	viscoso
INPA R1012	2	ácido	2	circular	elevada	inteira	sim	homog	branca	homog	com	viscoso
INPA R1013	2	ác. leve	2	circular	elevada	inteira	não	homog	branca	homog	sem	butírico
INPA R1014	2	ácido	< 2	circular	plana	inteira	sim	homog	branca	homog	com	viscoso

⁽¹⁾ pH do meio de cultura; ⁽²⁾ Tamanho da colônia em mm; ⁽³⁾ Transp = transparência da colônia; ⁽⁴⁾ ác. Leve = pH do meio acidificou levemente; ⁽⁵⁾ Homog. = homogêneo; ⁽⁶⁾ heterog = heterogêneo.

4.1.4. CONCLUSÕES

- 1) Houve aumento significativo na biomassa de caupi ocasionado pelas estirpes de rizóbio contidas nas amostras de solos das diferentes regiões de coleta, com destaque para as amostras de solos de Novo Ayrão.

- 2) As áreas de coleta das amostras de solo apresentam populações de rizóbio bastante diversa, e esta diversidade morfofisiológica indica a ocorrência de diversidade genética presente nestes solos.

4.2. TOLERÂNCIA À ACIDEZ E ALUMÍNIO TÓXICO DE RIZÓBIO ISOLADOS DE SOLOS DA AMAZÔNIA

RESUMO

A população de rizóbio pode ser diminuída por fatores predominantes nos solos da Amazônia, como o pH ácido e alumínio tóxico. A quantificação da tolerância à acidez e alumínio em laboratório pode ser o primeiro passo na seleção de isolados de rizóbio para esta região. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a tolerância à acidez e alumínio tóxico, de isolados de rizóbio oriundos de solos de diferentes regiões do Estado do Amazonas. O presente método avaliou isolados de rizóbio em placa de Petri com meio YMA com pH 6,5 (controle), pH 4,5 e pH 4,5 + Al, usando escala de crescimento 1,0 (sensível) a 4,0 (tolerante, máximo crescimento), durante 15 dias de avaliação. Entre os 200 isolados testados 165 e 127 apresentaram tolerância com crescimento acima de 3,06 aos 15 dias nos tratamentos com pH 4,5 e pH 4,5 + Al, respectivamente. O fator mais limitante para o crescimento dos isolados foi o alumínio. Os isolados apresentaram diferenças nos mecanismos de tolerância à acidez e alumínio tóxico.

PALAVRAS-CHAVES: Ecologia microbiana, Bactérias fixadoras de N₂, Amazonas.

TOLERANCE THE ACIDITY AND TOXIC ALUMINUM FOR RHIZOBIA ISOLATED FROM AMAZÔNIA SOILS

ABSTRACT

The rhizobia population can be decreased by predominant factors in Amazonian soils, as acid pH and toxic aluminum. The tolerance quantification tolerance to acidity and aluminum in laboratory can be the first step to rhizobia isolates for this region. Thus, the objective of this study was to evaluate tolerant to the acidity and toxic aluminum, of isolated of rhizobia deriving of from soils of different regions of Amazonas State. The present method evaluated rhizobia isolates in Petri dishes with YMA medium with pH 6,5 (control), pH 4,5 and pH 4,5 + Al, using growth scale from 1,0 (sensible) to 4,0 (tolerant, maximum growth), during 15 days of evaluation. Among the 200 isolates tested, 165 and 127 presented tolerance with growth scale above 3,06 at 15th days in the treatment with pH 4,5 and pH 4,5 + Al, respectively. The most limiting factor the growth of the isolates ones was the aluminum. The rhizobia isolates presented differences in the tolerance mechanisms to the acidity and toxic aluminum.

KEY WORDS: Microbial ecology, N₂ fixation bacteria, Amazonas.

4.2.1. INTRODUÇÃO

A biodiversidade de microrganismos permite a sua sobrevivência em diversos habitats (Goedert *et al.*, 1997). As bactérias formam o grupo com maior diversidade fisiológica, o que propicia maior adaptabilidade. Por isso, é possível selecionar, dentro de certos limites, organismos tolerantes a diversos fatores estressantes, como alta temperatura, acidez do solo, concentrações elevadas de antibióticos ou metais pesados (Bordeleau & Prévost, 1994; Oliveira & Magalhães, 1999; Zahran 1999; Kinraide & Sweeney, 2003).

Uma vasta área de solos do mundo, inclusive a maioria dos solos brasileiros, é afetada pela acidez elevada, problema este que é exacerbado pela aplicação de doses elevadas de fertilizantes com certos nutrientes e até, em menor escala, pela produção de H^+ durante o processo de fixação biológica do nitrogênio (FBN), atividade heterotrófica de raízes e microrganismos, lixiviação de bases e deposição atmosférica de H^+ (Siqueira *et al.*, 1994).

Devido à plasticidade fisiológica dos microrganismos, é possível selecionar estirpes nativas ou obter mutantes tolerantes a estresses provocados pela acidez. Estirpes ou isolados nativos tolerantes à acidez elevada são mais facilmente obtidas de populações adaptadas a este ambiente, sendo inclusive já encontrados genes para tolerância à acidez (Chen *et al.*, 1993; Siqueira *et al.*, 1994). Outros exemplos de tolerância a baixo pH de estirpes isoladas e selecionadas de solos e plantas são reportados em diversos trabalhos (Correa & Barneix, 1997; Mukherjee & Asanuma, 1998; Oliveira & Magalhães, 1999; Watkin *et al.*, 2000,2003; Campo & Wood, 2001; Barberi *et al.*, 2004; Hara & Oliveira, 2004). Assim, o desenvolvimento de plantas ou de rizóbio e práticas capazes de aumentar a FBN em solos ácidos podem reduzir aplicações de nitrogênio e calagem, em conformidade com os princípios da agricultura sustentável (Kessel & Hartley, 2000; Hungria *et al.*, 2005).

A toxicidade de alumínio é outro importante fator limitante ao crescimento de plantas em solos ácidos, além de afetar também vários microrganismos fixadores de nitrogênio em simbiose (Iguar *et al.*, 1997; Straliootto & Rumjanek, 1999b). O grau de

tolerância ao alumínio parece ser um caráter genético estável, que implica diferenças bioquímicas e fisiológicas (Chen *et al.*, 1993).

A estreita inter-relação planta-bactéria é influenciada pelos fatores ambientais em que se incluem os nutricionais. Vários fatores ambientais, agindo sobre os simbiossiontes, podem inibir total ou parcialmente a formação de nódulos e/ou a fixação de nitrogênio e assim reduzir a resposta aos outros nutrientes (Del Papa *et al.*, 1999; Zahran, 1999), e, a menos que o solo seja rico em nitrogênio, o rendimento das plantas será afetado negativamente e haverá perda parcial ou total dos investimentos feitos em insumos e trabalho.

Os estudos relativos à acidez e toxidez de alumínio são limitados pela dificuldade em determinar se os efeitos nocivos afetam a multiplicação do microssimbionte, o desenvolvimento da planta ou alguma etapa específica no estabelecimento e funcionamento da simbiose (Zahran, 1999; Andrade *et al.*, 2002). No entanto, a possibilidade de obtenção de estirpes tolerantes à acidez do solo, especialmente ao alumínio, pode proporcionar aumentos de rendimento da leguminosa hospedeira resultante de uma fixação mais eficiente do N₂, desde que a planta também esteja adaptada a essas condições de solo (Oliveira, 1991b; Alves *et al.*, 2003; Slattery *et al.*, 2004).

Com respeito à seleção de estirpes de rizóbio adaptáveis a solos ácidos, com os diversos fatores ligados à acidez ou dela decorrentes que variam de solo para solo, existe uma contínua necessidade da identificação de estirpes de rizóbio tolerantes à acidez e alumínio tóxico capazes de aumentar a produtividade de leguminosas. Estirpes de rizóbio devem ser testadas rotineiramente sob condições que reproduzam os importantes fatores adversos que a leguminosa hospedeira vai encontrar, de maneira a reduzir rapidamente o número de estirpes candidatas e evitar o desperdício da inclusão de organismos edaficamente não produtivos em experimentos de campo. Assim, este trabalho objetivou avaliar a tolerância à acidez e alumínio tóxico, de isolados de rizóbio oriundos de solos de diferentes regiões do Estado do Amazonas.

4.2.2. MATERIAL E MÉTODOS

Isolados utilizados

Foram utilizados 200 isolados obtidos através de coletadas de amostras de solos representativos da região, os quais serviram de fonte de inoculo em feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) em casa-de-vegetação na Coordenação de Pesquisas em Ciências Agronômicas do INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia). Os locais de coleta foram as regiões do Ramal do Brasileirinho (Manaus), Rio Preto da Eva, Careiro da Várzea, Manacapuru, Novo Airão e Barreirinha, todas do Estado do Amazonas. Após a coleta dos nódulos, foram isolados rizóbio presentes nas amostras de solos, usando a metodologia tradicional descrita por Vincent (1970). Os isolados foram repicados em placas de Petri contendo meio YMA (Yeast Mannitol Agar) pH 4,5 e incubados a 28° C por aproximadamente cinco dias, para posteriores testes de tolerância à acidez e alumínio tóxico.

Teste de tolerância à acidez e alumínio tóxico

Os tratamentos utilizados foram meios YMA com pH 4,5, pH 4,5 + 2,0 cmol_c (+) Al/L e, pH 6,5, com quatro repetições cada. Foi acrescentado o corante bromocresol verde nos meios com pH 4,5 e pH 4,5 + Al, e no meio com pH 6,5 foi acrescentado o azul de bromotimol, com o objetivo de visualizar a alteração do pH do meio pelas bactérias, em função da alteração da cor do meio.

Para a avaliação foi utilizado o método de riscagem proposto por Oliveira & Magalhães (1999). Nesse método, as avaliações foram feitas a cada três dias durante um período de 15 dias, em condições de laboratório a uma temperatura média de 28°C. De acordo com o crescimento celular nas respectivas zonas (Figura 1), foram dados valores de crescimento para cada isolado variando de 1 (sem crescimento visível após riscagem na zona 1) a 4 (máximo crescimento na zona 4) (Figura 2), podendo ter valores intermediários entre esses extremos. Esse método leva a um processo de diluição do microrganismo, onde a zona 1 é a de maior concentração bacteriana e a zona 4 a mais

diluída. Este método permitiu ainda selecionar isolados a partir da escala determinada na Tabela 1 e classificá-los de acordo com o grau de tolerância.

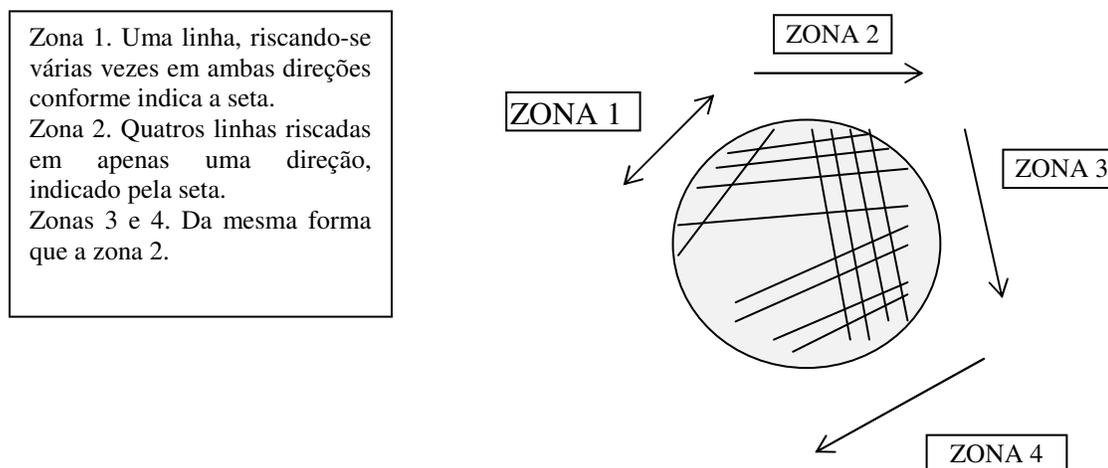


Figura 1. Ilustração do método de riscagem proposto por Oliveira & Magalhães (1999).

A figura demonstra apenas uma repetição.

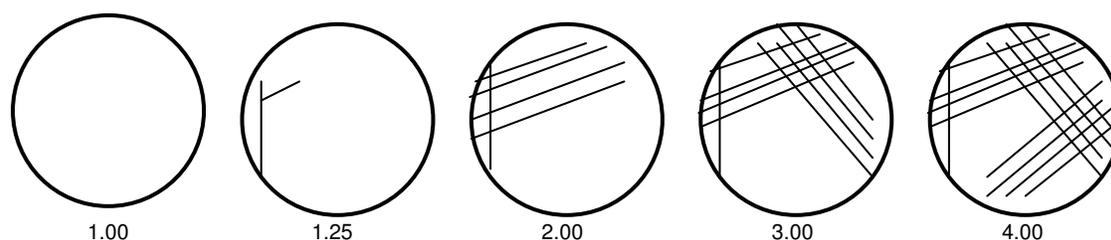


Figura 2. Valores de crescimento para os isolados de rizóbio nos respectivos tratamentos em placas de Petri com meio YMA (Oliveira & Magalhães, 1999).

Tabela 1. Escala de valores para a avaliação do crescimento de rizóbio nos meios YMA (pH 6,5; pH 4,5+Al; pH 4,5) (Oliveira & Magalhães, 1999).

Graus de tolerância	Intervalos de pontuação
Sensível	1,00 - 2,00
Mediano	2,06 * - 3,00
Tolerante	3,06 * - 4,00

* Três repetições com nota 2,0 e uma com 2,25.

** Três repetições com nota 3,0 e uma com 3,25.

Foi realizada análise de variância com o teste F e comparação das médias dos tratamentos pelo teste Tukey a 1%, utilizando o programa STATISTICA 6.0.

4.2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método utilizado para este estudo foi importante para a avaliação quantitativa de isolados de rizóbio tolerantes à acidez e ao alumínio tóxico. A tabela 2 mostra somente 61 isolados, dos 200 testados, que apresentaram escores de crescimento tolerante (superior a 3,06) logo aos seis dias de crescimento, para todos os tratamentos. Entre os 200 isolados estudados com base na escala de valores para a avaliação do crescimento (Tabela 1), 93,5 % (187 isolados) apresentaram alto crescimento, 0,5% baixo (1) e 6% (12) crescimento médio, no meio com pH 6,5 aos 15 dias de avaliação (Figura 3). O baixo crescimento observado para alguns isolados em meio padrão é um indicativo de dificuldade de crescimento em meio de cultura, característica indesejável para indicá-los como inoculantes mesmo em solos com pH próximos à alcalinidade (6,5). Entre os isolados que apresentaram alto crescimento no pH 6,5, aos 15 dias de avaliação, sete apresentaram o crescimento máximo (escore 4,00) estabilizado já no terceiro dia (Tabela 2). Resultados semelhantes foram reportados por Oliveira & Magalhães (1999) e Hara & Oliveira (2004; 2005). Observa-se também na Figura 3, que parte dos isolados apresentou dificuldade em crescer no meio com pH 6,5, possivelmente por apresentarem alguma dificuldade nutricional, uma vez que a acidez desse meio não é nociva para os microrganismos do solo em geral (Hungria & Vargas, 1994; Moreira & Siqueira, 2002).

Quanto à tolerância à acidez do meio de cultura, foi verificado que 82,5% (165) apresentaram escore de crescimento acima de 3,06 (Figura 3), o que permite inferir que são tolerantes à acidez, com base na escala de valores da Tabela 1. Entre estes isolados tolerantes à acidez, 36 apresentaram escore acima de 3,06 a partir do terceiro dia, sendo que desses, 10 apresentaram escore 4,00 a partir do terceiro e sexto dia após a riscagem em placas (Tabela 2). Segundo Graham *et al.* (1994), a tolerância ao pH ácido em rizóbio depende da habilidade em manter o pH intracelular entre 7,2 e 7,5 quando o pH externo é ácido. O tempo de crescimento pode também ser usado para a seleção, pois os isolados

que apresentaram escores superiores a 3,06 em menor período de tempo podem ser mais tolerantes a baixos pHs. Assim, com 6 dias de crescimento foi possível verificar, estatisticamente, que os isolados INPA R 880, 896, 897, 924, 991, 993, 995, 1002 e 1005 apresentaram escore 4,00 em ambos pHs (4,5 e 6,5). Usando a Tabela 1 como referência, também incluem neste grupo de tolerantes outros 72 isolados, que apresentaram escores maiores que 3,06 neste mesmo tempo de avaliação. A acidez do meio também afetou o crescimento de isolados de rizóbio, como foi observado por Oliveira & Magalhães (1999) & Hara & Oliveira (2004; 2005) analisando isolados de rizobia de amostras de solos procedentes de diferentes regiões na Amazônia. Para Hungria *et al.* (2001a) e Hara & Oliveira (2004), a proporção de isolados oriundos de solos ácidos, tolerantes á acidez foi baixa, em torno de 25%.

Foi observado que 13,5% (27) dos isolados apresentaram tolerância média e 4% (8), sensibilidade à acidez (Figura 3). Para Hungria & Vargas (2000), a exposição de isolados de rizóbio à acidez diminui a taxa de crescimento, sugerindo que alguns processos citoplasmáticos da bactéria são sensíveis a esse fator. Segundo Aarons & Graham (1991), em meio ácido há uma diminuição da síntese de proteínas pelas bactérias, o que pode também afetar o crescimento bacteriano.

Quanto ao tratamento com pH 4,5 + Al, foi observado que o alumínio foi mais limitante que a acidez. Dos 200 isolados, 127 (63,5%) apresentaram escores maior ou igual a 3,06 aos 15 dias de crescimento, sendo considerados tolerantes ao alumínio (Figura 3). O mesmo foi observado por Lesueur *et al.* (1993) e Hara & Oliveira (2004; 2005); porém, a percentagem de isolados tolerantes ao alumínio encontrada por Hara & Oliveira (2004; 2005) foi menor. No terceiro dia de avaliação, foi observado máximo crescimento (escore 4,00) no meio com pH 4,5 + Al, para o isolado INPA R1002, e no sexto dia para os isolados INPA R880, INPA R888, INPA R889, INPA R931, INPA R965, INPA R995, INPA R1005 e INPA R1008 (Tabela 2). Conseqüentemente, o tempo de crescimento pode também ser usado para a seleção quanto à tolerância ao Al, da mesma forma como se procedeu com os isolados tolerantes à acidez. Houve inibição do crescimento de 29 (14,5%) isolados pelo efeito tóxico do alumínio (sensíveis, com baixo crescimento); 44 (22%) apresentaram crescimento médio (2,06 – 3,00) (Figura 3), porém o crescimento dos isolados nos meios aumentou com o tempo de exposição. Ao longo das

avaliações, a cada três dias, houve aumento do número de isolados tolerantes aos meios com pH 4,5 e pH 4,5 + Al, mostrando a ocorrência de adaptação às condições iniciais do meio (Figura 3). Em alguns trabalhos tem sido demonstrada melhor adaptação de bactérias à acidez quando previamente crescidas em meios de cultura levemente ácidos, fenômeno conhecido como “acid habituation” (Goodson & Rowbury, 1989) ou “adaptative tolerance response” (Foster & Hall, 1991; Dilworth *et al.*, 1999). Entretanto, vários trabalhos reportam a baixa correlação entre estirpes tolerantes a pH ácido em meio de cultura e tolerantes à acidez do solo (Howieson *et al.*, 1992; Gemell & Roughley, 1993).

Quanto à capacidade de acidificar ou alcalinizar, o meio com pH 6,5 foi acidificado por 187 isolados (93,5%) (Figura 4). Entre estes isolados, 13 apresentaram escore de crescimento abaixo de 3,06, indicando que a diminuição do pH pode estar afetando o crescimento dessas bactérias. Quanto aos isolados tolerantes à acidez, 66 desses foram capazes de alcalinizar ou não modificar o pH do meio ácido (pH 4,5) (Figura 4), o que pode ser considerado como um mecanismo de adaptação a essa condição de estresse. Segundo Barberi *et al.* (2004), a elevação do pH do meio é decorrente do metabolismo da bactéria que, ao atuar sobre o substrato em busca de energia, libera substâncias básicas que aumentam o pH externo. Para o meio com pH 4,5 + Al, foi observado que 45 isolados alcalinizaram o meio, os quais apresentaram tolerância a esses fatores, com escore de crescimento maior que 3,06 (Figura 4). Foi verificada a diminuição do pH desse meio por 80 isolados tolerantes, sendo que, entre esses, 78 apresentaram tolerância tanto à acidez como ao alumínio; porém, a tolerância à acidez não está necessariamente correlacionada com a tolerância ao alumínio (Stralioetto & Rumjanek, 1999b). A acidificação do meio com alumínio também foi observada por Hara & Oliveira (2004) e por Kawai *et al.* (2000), sugerindo que esta diminuição de pH tenha causado uma modificação da forma mais prejudicial do alumínio, que é a monomérica, para uma outra menos tóxica.

Alguns autores relatam a ocorrência de diferentes mecanismos de tolerância à acidez e ao alumínio encontrado em isolados de rizóbio, como diminuição da quantidade de carga negativa na superfície celular, diminuindo a ligação com o alumínio (Bushby, 1990); acumulação de fosfato inorgânico no interior da célula, neutralizando o efeito do

alumínio pela formação de complexos insolúveis biologicamente não tóxicos (Mukherjee & Asanuma, 1998); aumento dos níveis de potássio e fósforo ligados à manutenção do pH interno (Mukherjee & Asanuma, 1998; Watkin *et al.*, 2003) e maior produção de exopolissacarídeos (Maccío *et al.*, 2002; Barberi *et al.*, 2004). Para Correa & Barneix (1997), a tolerância à acidez por estirpes de *Rhizobium loti* é um fenômeno complexo, envolvendo mecanismos constitutivos tal como permeabilidade da membrana externa como resposta adaptativa ao pH do meio, incluindo o estágio de crescimento da bactéria e mudanças na expressão de proteínas. Peick *et al.* (1999) mostraram que a redução do pH afeta a síntese de diferentes proteínas em estirpes de *Rhizobium tropici* e *R. etli*. Estudos de base genética de rizóbio sugerem variação na regulação de genes específicos para tolerância à acidez (Chen *et al.*, 1993; Zahran, 1999; Riccillo *et al.*, 2000; Soto *et al.*, 2004; Garau *et al.*, 2005).

Os isolados mais tolerantes à acidez e ao alumínio apresentaram-se como promissores; porém, estes isolados necessitam ser testados ainda em simbiose com a planta na presença destes fatores limitantes, uma vez que o objetivo é obter tolerância e eficiência a estes fatores na mesma estirpe.

Tabela 2: Médias do crescimento de rizóbio em meio YMA com pH 4,5, pH 4,5 + Al e pH 6,5 isolados de amostras de solos na Amazônia.
Média de quatro repetições.⁽¹⁾

Isolados INPA R	Pontuação ² / dias de crescimento														
	3 dias			6 dias			9 dias			12 dias			15 dias		
	pH 4,5	pH 4,5 + Al	pH 6,5	pH 4,5	pH 4,5 + Al	pH 6,5	pH 4,5	pH 4,5 + Al	pH 6,5	pH 4,5	pH 4,5 + Al	pH 6,5	pH 4,5	pH 4,5 + Al	pH 6,5
813	2,06 b	3,31 a	2,44 b	3,19 a	3,31 a	3,25 a	3,19 a	3,31 a	3,31 a	3,25 a	3,50 a	3,31 a	3,25 a**	3,50 a**	3,31 a***
814	3,63 ab	3,13 b	3,75 a	3,81 ab	3,75 b	4,00 a	3,81 ab	3,75 b	4,00 a	3,88 a	3,81 a	4,00 a	3,88 a**	3,81 a**	4,00 a***
815	3,69 a	3,00 b	3,75 a	3,81 ab	3,75 b	4,00 a	3,81 ab	3,75 b	4,00 a	3,88 ab	3,75 b	4,00 a	4,00 a**	3,75 b**	4,00 a***
820	2,19 b	3,00 a	2,25 b	3,19 a	3,19 a	3,19 a	3,25 a	3,19 a	3,25 a	3,25 a	3,19 a	3,25 a	3,25 a**	3,19 a**	3,25 a***
822	2,19 b	3,31 a	2,25 b	3,31 a	3,56 a	3,19 a	3,56 a	3,56 a	3,31 a	3,56 a	3,56 a	3,38 a	3,56 a**	3,56 a**	3,38 a***
849	1,94 b	2,00 b	3,19 a	3,44 b	3,44 b	4,00 a	3,44 b	3,44 b	4,00 a	3,56 b	3,44 b	4,00 a	3,56 b**	3,44 b**	4,00 a***
850	1,94 b	2,00 b	3,00 a	3,50 b	3,50 b	4,00 a	3,50 b	3,50 b	4,00 a	3,56 b	3,50 b	4,00 a	3,56 b**	3,50 b**	4,00 a***
856	3,00 a	3,19 a	3,31 a	3,69 a	3,69 a	3,69 a	3,69 a	3,88 a	3,88 a	3,75 a	3,88 a	3,94 a	3,75 b***	3,88 ab**	4,00 a***
864	2,56 a	2,31 a	2,69 a	3,50 a	3,38 a	3,38 a	3,69 a	3,63 a	3,75 a	3,69 b	3,69 b	4,00 a	3,69ab***	3,69 b***	4,00 a***
866	2,31 ab	2,19 b	3,06 a	3,56 b	3,56 b	4,00 a	3,69 b	3,63 b	4,00 a	3,69 b	3,69 ab	4,00 a	3,81 a***	3,81 a**	4,00 a***
867	2,69 a	2,50 a	2,69 a	3,56 a	3,75 a	3,81 a	3,56 a	3,81 a	3,88 a	3,75 a	3,94 a	3,88 a	3,75 a***	4,00 a***	3,88 a***
868	3,19 a	3,25 a	3,50 a	3,81 a	3,75 a	3,88 a	3,88 a	3,81 a	4,00 a	3,88 a	3,81 a	4,00 a	3,88 a***	3,81 a**	4,00 a***
870	1,25 b	1,00 c	3,00 a	3,38 a	3,81 a	3,44 a	3,50 a	3,88 a	3,56 a	3,50 b	3,88 ab	4,00 a	3,50 b***	3,88 ab**	4,00 a***
872	2,25 a	2,44 a	2,56 a	3,63 a	3,75 a	3,75 a	3,88 a	3,81 a	3,88 a	3,94 a	3,94 a	4,00 a	3,94 a***	4,00 a**	4,00 a***
876	3,50 a	3,81 a	3,75 a	3,75 a	3,94 a	4,00 a	3,88 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a***	4,00 a***	4,00 a***
880	3,94 a	3,88 a	3,88 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a***	4,00 a***	4,00 a***
888	3,94 a	3,69 a	3,81 a	4,00 a	4,00 a	3,94 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a**	4,00 a**	4,00 a**
893	3,63 a	3,38 a	3,63 a	3,81 a	3,88 a	4,00 a	3,94 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a***	4,00 a***	4,00 a***
896	3,94 a	3,81 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a***	4,00 a***	4,00 a***
897	4,00 a	3,75 b	4,00 a	4,00 a	3,94 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a***	4,00 a***	4,00 a***
901	3,06 ab	2,81 b	3,38 a	3,38 a	3,69 a	3,88 a	3,63 b	3,75 b	4,00 a	3,63 b	3,75 b	4,00 a	3,63 b***	3,88ab***	4,00 a***
902	3,38 a	3,25 a	3,44 a	3,69 a	3,75 a	3,88 a	3,75 a	3,81 a	4,00 a	3,81 a	3,81 a	4,00 a	3,81 a**	3,81 a**	4,00 a***
903	3,25 a	3,38 a	3,38 a	3,56 a	3,69 a	3,69 a	3,69 a	3,81 a	3,88 a	3,69 b	3,88 ab	4,00 a	3,75 a**	3,88 a**	4,00 a***
908	2,31 b	2,19 b	3,38 a	3,19 b	3,25 b	3,75 a	3,25 b	3,44 b	3,75 a	3,31 b	3,44 b	3,81 a	3,31 b**	3,50 b**	3,81 a***
909	3,75 a	2,00 b	3,63 a	3,81 a	3,75 a	3,88 a	3,88 a	3,75 a	3,94 a	3,88 a	3,81 a	3,94 a	3,88 a**	3,81 a***	3,94 a***
910	1,56 a	1,63 a	1,56 a	3,19 a	3,25 a	3,13 a	3,38 a	3,50 a	3,38 a	3,44 a	3,50 a	3,38 a	3,44 a***	3,56 a**	3,38 a***
913	1,38 a	1,38 a	1,31 a	3,31 a	3,31 a	3,06 a	3,38 a	3,44 a	3,25 a	3,50 a	3,44 a	3,25 a	3,50 a*	3,50 a*	3,25 a***
920	3,38 a	3,31 a	3,50 a	3,44 a	3,38 a	3,75 a	3,56 b	3,50 b	4,00 a	3,56 b	3,50 b	4,00 a	3,56 b**	3,56 b**	4,00 a***
921	2,13 b	2,75 a	2,75 a	3,44 a	3,88 a	3,69 a	3,56 b	4,00 a	3,81 ab	3,63 b	4,00 a	3,94 ab	3,63 b**	4,00 a**	4,00 a***
923	2,94 b	1,69 c	3,50 a	3,56 a	3,63 a	3,94 a	3,81 a	3,88 a	3,94 a	3,81 a	3,94 a	3,94 a	3,81 a**	4,00 a**	3,94 a***
924	3,81 a	3,56 a	3,81 a	3,81 a	3,94 a	4,00 a	3,88 a	4,00 a	4,00 a	3,94 a	4,00 a	4,00 a	3,94 a***	4,00 a***	4,00 a***
930	3,56 b	3,63 b	4,00 a	3,63 b	3,63 b	4,00 a	3,81 a	3,94 a	4,00 a	3,88 a	3,94 a	4,00 a	3,88 a***	3,94 a***	4,00 a***
931	3,13 a	3,50 a	3,88 a	3,69 a	4,00 a	3,94 a	3,81 a	4,00 a	4,00 a	3,81 a	4,00 a	4,00 a	3,81 a***	4,00 a***	4,00 a***
935	2,00 a	2,25 a	2,13 a	3,75 a	3,88 a	3,81 a	3,94 a	4,00 a	4,00 a	3,94 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a*	4,00 a*	4,00 a***

Continuação ...

Isolados INPA R	Pontuação ² / dias de crescimento														
	3 dias			6 dias			9 dias			12 dias			15 dias		
	pH 4,5	pH 4,5 + Al	pH 6,5	pH 4,5	pH 4,5 + Al	pH 6,5	pH 4,5	pH 4,5 + Al	pH 6,5	pH 4,5	pH 4,5 + Al	pH 6,5	pH 4,5	pH 4,5 + Al	pH 6,5
946	2,06 a	2,44 a	2,50 a	3,69 a	3,81 a	4,00 a	3,75 a	3,81 a	4,00 a	3,75 a	3,81 a	4,00 a	3,81 a **	3,81 a **	4,00 a ***
948	3,31 a	3,25 a	3,38 a	3,44 a	3,75 a	3,63 a	3,56 a	3,75 a	3,88 a	3,56 a	3,75 a	3,88 a	3,56 a **	3,88 a **	3,94 a *
952	3,44 a	3,00 a	3,19 a	3,63 a	3,56 a	3,63 a	3,69 a	3,56 a	3,69 a	3,69 a	3,69 a	3,75 a	3,75 a **	3,69 a *	3,75 a ***
953	3,31 a	3,19 a	3,38 a	3,56 a	3,63 a	3,69 a	3,63 a	3,69 a	3,75 a	3,63 a	3,81 a	3,81 a	3,69 a **	3,81 a **	3,81 a ***
954	3,50 a	3,31 a	3,31 a	3,63 a	3,69 a	3,63 a	3,75 a	3,81 a	3,75 a	3,75 a	3,81 a	3,88 a	3,75 a **	3,81 a **	3,88 a ***
955	2,75 b	2,75 b	3,63 a	3,38 b	3,81 a	3,94 a	3,38 b	3,81 a	3,94 a	3,44 b	3,81 a	3,94 a	3,50 a **	3,81 a **	3,94 a **
956	3,06 b	3,81 a	3,44 ab	3,31 b	3,94 ab	3,88 b	3,38 b	4,00 a	3,88 ab	3,38 b	4,00 a	3,88 ab	3,44 b ***	4,00 a ***	4,00 a ***
959	3,06 a	3,25 a	3,25 a	3,81 a	3,88 a	3,75 a	3,88 ab	4,00 a	3,75 b	3,88 ab	4,00 a	3,75 b	3,94 a ***	4,00 a ***	4,00 a ***
960	2,94 ab	2,75 b	3,31 a	3,44 a	3,75 a	3,56 a	3,44 a	3,75 a	3,63 a	3,50 a	3,81 a	3,63 a	3,50 a **	3,88 a ***	3,81 a ***
965	3,63 a	2,25 b	3,88 a	3,81 a	4,00 a	3,94 a	4,00 a	4,00 a	3,94 a	4,00 a	4,00 a	3,94 a	4,00 a **	4,00 a **	4,00 a ***
973	3,63 a	3,44 a	3,69 a	3,75 a	3,44 a	3,81 a	3,81 a	3,75 a	3,81 a	3,81 a	3,75 a	3,81 a	3,88 a **	3,75 a **	3,88 a ***
974	3,38 a	3,44 a	3,50 a	3,50 a	3,63 a	3,63 a	3,50 a	3,63 a	3,63 a	3,50 a	3,63 a	3,69 a	3,50 a **	3,63 a **	3,69 a ***
975	2,94 b	2,38 c	3,63 a	3,25 b	3,19 b	3,75 a	3,38 b	3,31 b	3,81 a	3,44 b	3,31 b	3,88 a	3,44 b **	3,31 b **	3,88 a ***
976	2,69 a	2,44 a	2,88 a	3,63 a	3,06 a	3,69 a	3,63 a	3,56 a	3,75 a	3,63 a	3,56 a	3,88 a	3,63 b **	3,63 b **	4,00 a **
981	3,00 a	3,00 a	3,50 a	3,06 b	3,25 ab	3,75 a	3,06 b	3,38 ab	3,75 a	3,13 b	3,38 ab	3,75 a	3,13 b **	3,38 ab **	3,75 a ***
984	2,75 a	2,88 a	3,31 a	3,06 a	3,19 a	3,69 a	3,06 a	3,19 a	3,69 a	3,06 a	3,25 a	3,69 a	3,06 a **	3,31 a **	3,69 a ***
985	2,63 b	3,19 ab	3,25 a	3,44 b	3,75 ab	3,75 a	3,44 b	3,75 ab	3,75 b	3,56 a	3,75 a	3,75 a	3,56 a **	3,75 a **	3,88 a **
986	2,81 ab	2,56 b	3,31 a	3,50 a	3,63 a	3,63 a	3,50 a	3,69 a	3,88 a	3,50 a	3,75 a	3,88 a	3,63 a ***	3,81 a ***	3,88 a ***
987	3,63 a	3,00 b	3,69 a	3,69 a	3,38 a	3,69 a	3,81 a	3,69 a	3,88 a	3,81 a	3,69 a	3,94 a	3,81 a **	3,75 a **	3,94 a **
991	3,56 a	2,69 b	3,94 a	4,00 a	3,81 a	4,00 a	4,00 a	3,94 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a **	4,00 a **	4,00 a ***
993	3,88 a	3,69 a	3,88 a	4,00 a	3,94 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a ***	4,00 a ***	4,00 a ***
995	3,94 a	3,94 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a ***	4,00 a ***	4,00 a ***
997	3,75 a	3,44 a	3,75 a	3,94 a	3,88 a	3,88 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a ***	4,00 a ***	4,00 a ***
1000	3,88 a	3,75 a	3,94 a	3,94 a	3,94 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a ***	4,00 a ***	4,00 a ***
1002	4,00 a	4,00 a	3,94 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a ***	4,00 a ***	4,00 a ***
1003	3,94 a	3,81 b	3,94 a	4,00 a	3,94 a	3,94 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a ***	4,00 a ***	4,00 a ***
1005	3,94 a	3,81 a	3,94 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a	4,00 a ***	4,00 a ***	4,00 a ***

1- Médias com a mesma letra na linha (dentro de cada data) não diferem estatisticamente (Teste de Tuckey a 1%)

2- Pontuação: 1,00 crescimento não visível; 4,00 máximo crescimento.

* não acidificou o meio

** acidificou levemente

*** acidificou

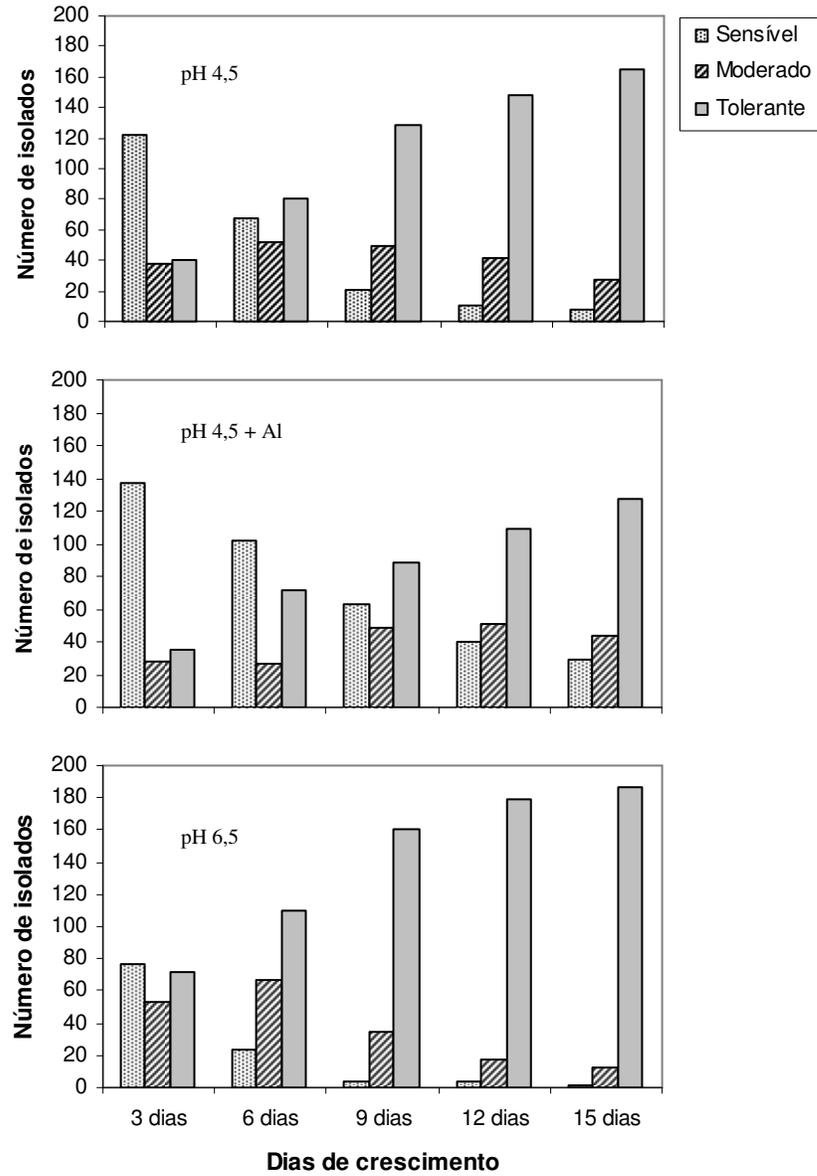


Figura 3: Crescimento de isolados de rizóbio durante de 15 dias de avaliação em meios YMA com pH 6,5, pH 4,5 e pH 4,5 + Al.

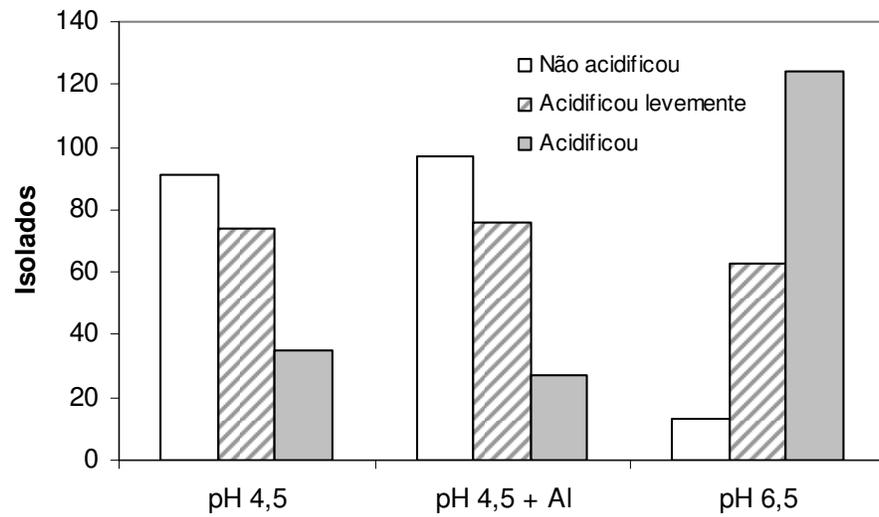


Figura 4: Alteração do pH (cor) do meio pelos isolados de rizóbio após 15 dias de crescimento em meio YMA com bromocresol verde (pH 4,5 e pH 4,5 + Al) e azul de bromotimol (pH 6,5).

4.2.4. CONCLUSÕES

- 1) Uma grande diversidade de tolerância à acidez e Al foi verificada na população de rizóbio em estudo, sendo que o aumento nos níveis de tolerância pode ser observado com o tempo de crescimento.
- 2) O fator mais limitante para o crescimento dos isolados de rizóbio foi Al.
- 3) Os isolados apresentaram diferenças nos mecanismos de tolerância à acidez e Al tóxico. Alguns elevaram o pH do meio de cultura como uma possível forma de neutralizar o efeito da acidez.

4.3. CAPACIDADE DE SOLUBILIZAÇÃO DE FOSFATOS DE CÁLCIO E ALUMÍNIO DE RIZÓBIO ISOLADOS DE SOLOS DA AMAZÔNIA

RESUMO

Em solos com baixa disponibilidade de fósforo, como os de solos de terra firme da Amazônia, a capacidade de estirpes de rizóbio de solubilizar compostos de fosfato inorgânico é extremamente importante. Assim o objetivo desse trabalho foi determinar a capacidade de solubilização de fosfato de cálcio e fosfato de alumínio de rizóbio isolados de solos ácidos e de baixa fertilidade na Amazônia. Os isolados de rizóbio foram repicados para meios específicos para solubilização de fosfatos de cálcio (P-Ca) e Alumínio (P-Al), onde os isolados foram avaliados por um período de 15 dias, obtendo-se os índices de solubilização. Foram avaliados 200 isolados, onde 68 solubilizaram P-Ca e 47 solubilizaram P-Al, sendo que 32 isolados solubilizaram tanto P-Ca quanto P-Al. A solubilização de P-Ca e P-Al por alguns isolados foram acompanhadas pelo decréscimo do pH do meio, enquanto outros alcalinizaram ou não modificaram o pH do meio. Os grupos de isolados coletados de locais distintos mostram uma diversidade com relação à capacidade de solubilizar fosfatos. Esses resultados de laboratório indicam possibilidade de se utilizar isolados de rizóbio capazes de solubilizar fosfatos, visando incrementar a concentração de fósforo solúvel na rizosfera e promover a nutrição de plantas com esse elemento.

PALAVRAS CHAVES: Rizóbio, Fósforo, Ecologia microbiana.

CALCIUM AND ALUMINUM PHOSPHATE SOLUBILIZING ABILITY OF RHIZOBIA ISOLATED FROM AMAZONIAN SOILS

ABSTRACT

On low available phosphorus soils, such as the Amazonian upland the ability of strains of rhizobia to solubilize composed inorganic phosphates is of extreme importance. The objective of this work was to determine the capacity of soil Amazonian rhizobia isolates to solubilize calcium and aluminum phosphate. The rhizobia isolates were evaluated on specific growth media containing phosphate of calcium (P-Ca) and aluminum (P-Al), where the isolated ones were appraised for a period of 15 days, when solubilizing indexes were obtained. They were appraised 200 isolates, where 68 isolated solubilized P-Ca and 47 solubilized P-Al, and 32 solubilized P-Ca as well as P-Al. The solubilization of P-Ca and P-Al for some isolates were accompanied by a decrease of media pH in the Petri dishes, while others isolates alkalized or did not modify the medium pH. The isolated groups of different places show diversity with relationship to the capacity of solubilizing phosphate. These laboratory results indicate the possibility to use isolates of rhizobia able to solubilize phosphates, in order to increase the concentration of soluble phosphorus in the rhizosphere and to promote the nutrition of plants with this element.

KEY WORDS: Rhizobia, Phosphorus, Microbial ecology.

4.3.1. INTRODUÇÃO

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é um dos processos microbianos relacionados à agricultura mais bem estudados e explorados tecnologicamente (Oliveira & Vidor, 1984a,b,c,d; Oliveira *et al.*, 1992; Cardoso *et al.* 1992; Vargas & Hungria, 1997; Day, 1999; Graham & Vance, 2000; Hungria *et al.* 2001b; Sessitsch *et al.*, 2002; Hungria & Campo, 2005). Vários estudos evidenciam a biodiversidades de bactérias fixadoras de N₂ em diferentes ecossistemas (Neves *et al.*, 1998a,b; Straliozzo & Rumjanek, 1999b; Zilli *et al.*, 1998, 2000; Mostasso *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2003). A inoculação de sementes de leguminosas com bactérias diazotróficas é prática comum em vários países. No Brasil, a inoculação da soja (*Glycine max* L. (Meril.)) com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* propicia grande economia em fertilizantes nitrogenados (Dobereiner, 1997; Hungria *et al.*, 1997; Marin *et al.*, 1999).

Além dos benefícios econômicos, a redução nas aplicações destes fertilizantes leva a uma melhoria da qualidade ambiental, com menor aporte de nitratos para as águas superficiais e subterrâneas. A maximização das contribuições da FBN nos agroecossistemas tornou-se, então, parte dos esforços de pesquisas visando a sustentabilidade das produções agrícolas.

Dentre estes gêneros de bactérias capazes de influenciar positivamente na fisiologia de plantas, destacam-se os gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* pela capacidade de fixação de N₂ e capacidade de solubilizar compostos de fosfato inorgânico (Mikanova *et al.*, 1995; Antoun *et al.*, 1998; Chabot *et al.*, 1998; Mikanová & Nováková, 2002; Deshwal *et al.*, 2003; Hameed *et al.*, 2004; Hara & Oliveira, 2004).

Depois do N, o fósforo (P) é o nutriente que mais limita o crescimento das plantas e microrganismos, apesar de ser abundante em solos em ambas as formas orgânicas e inorgânicas (Fohse *et al.*, 1988; Pereira & Bliss, 1989; Straliozzo & Rumjanek, 1999; Zahran, 1999). Porém, muitos solos cultivados do mundo, bem como nas principais classes de solos da Amazônia, são deficientes em P na forma disponível para as plantas. Essa baixa disponibilidade de P nos solos é devido à alta reatividade do P solúvel com Cálcio, Ferro ou Alumínio que atuam na sua precipitação. Fosfatos inorgânicos em solos ácidos estão associados com compostos de Al e Fe, enquanto que fosfatos de Ca são as formas predominantes em solos alcalinos (Sanchez *et al.*, 1982; Nicholaidis *et al.*, 1983; Raij, 1991).

No solo, o P está sujeito a diversos processos biogeoquímicos que alteram sua disponibilidade. Entre esses processos destacam-se a dissolução de fosfatos, que os torna disponíveis para as plantas (Goedert *et al.*, 1997; Whitelaw, 2000). Diversos microrganismos do solo, incluindo bactérias e fungos, possuem a capacidade de solubilizar fosfatos por meio de diferentes mecanismos, especialmente pela produção de ácidos (Johri *et al.*, 1999; Rodríguez & Fraga, 1999; Chagas Jr. & Oliveira, 2001; Igual *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2003). A inoculação de microrganismos solubilizadores de fosfatos tem sido sugerida como alternativa para substituir ou diminuir o uso de fertilizantes fosfatados solúveis, mediante um melhor aproveitamento dos fosfatos naturais existentes ou adicionados ao solo e dos formados pela aplicação de fontes solúveis (Kim *et al.*, 1998; Igual *et al.*, 2001; Vessey, 2003; Zaidi *et al.*, 2003).

O uso de microrganismos capazes de solubilizar fosfatos, como bactérias fixadoras de N₂ da família Rhizobiaceae, pode ajudar a aumentar a disponibilidade de fosfatos para o crescimento das plantas leguminosas e não leguminosas (Antoun *et al.*, 1998; Peix *et al.*, 2001; Vessey, 2003; Schoenfeld *et al.*, 2005). Em adição, estirpes de rizóbio envolvidas na solubilização de P podem aumentar o crescimento vegetal pelo aumento da eficiência da fixação biológica do nitrogênio (Bordeleau & Prévost, 1994; Chabot *et al.*, 1998; Zahran 1999; Zaidi *et al.*, 2003).

A detecção visual e a estimativa quantitativa da capacidade de estirpes de rizóbio em solubilizar fosfatos pouco solúveis têm sido possível usando métodos em placa de Petri com meio de cultura para solubilizadores, pelo aparecimento de uma zona translúcida ao redor da colônia solubilizadora em meio contendo fosfato mineral insolúvel (principalmente fosfato de cálcio ou fosfato de alumínio) como única fonte de fósforo (Deshwal *et al.*, 2003; Hara & Oliveira, 2004; 2005). Outros trabalhos evidenciam a solubilização de fosfatos por estirpes de *Rhizobium-Bradyrhizobium* cultivados em meio líquido, sugerindo diferentes mecanismos para a solubilização (Gyaneshwar *et al.*, 2002; Bano & Musarrat, 2003; Hameed *et al.*, 2004).

É muito provável que o efeito microbiano na rizosfera de plantas possa proporcionar uma resposta fisiológica positiva nas plantas hospedeiras, como a capacidade de solubilizar fosfatos inorgânicos, tornando-os disponíveis para as plantas. Assim, os estudos de rizóbio a partir da avaliação “*in vitro*” da capacidade de solubilização de fosfatos pode proporcionar uma base segura para selecionar isolados de rizóbio efetivos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi a avaliação “*in vitro*” da capacidade de solubilização de fosfatos de cálcio e alumínio de rizóbio isolados de solos na Amazônia.

4.3.2. MATERIAL E MÉTODOS

Isolados Utilizados.

Utilizaram-se 200 isolados obtidos através de coletas de amostras de solos de terra firme e várzea da região, os quais serviram de fonte de inóculo em feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) em casa de vegetação na Coordenação de Pesquisas em Ciências Agrônômicas (CPCA) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Os locais de coleta foram as regiões do Ramal do Brasileirinho (Manaus), Rio Preto da Eva, Careiro da Várzea, Manacapuru, Novo Airão e Barreirinha, todos situados no estado do Amazonas. Após a coleta dos nódulos, foram isolados rizóbio em meio YMA (extrato de levedura, manitol, agar) com pH 5,5 no Laboratório de Microbiologia do INPA, usando a metodologia tradicional descrita por Vincent (1970) e Somasegaran & Hoben (1985) e incubados a 28 °C por aproximadamente cinco dias, para posteriores testes de solubilização de fosfatos.

Solubilização de Fosfato de Cálcio e Alumínio

Foram utilizados dois meios específicos para bactérias solubilizadoras, sendo um para solubilizadoras de fosfato de cálcio (P-Ca), contendo 10 g de glucose, 2 g de extrato de levedura e 15 g de ágar. Neste meio acrescentou-se uma solução A contendo 5 g de K_2HPO_4 (50 mL de água) e uma solução B contendo 10 g de $CaCl_2$ (100 mL de água), para a formação do fosfato de cálcio precipitado (Hara & Oliveira, 2004), ajustando-se o pH para 6,5. Um segundo meio para verificar a solubilização de fosfato de alumínio (P-Al) continha 10 g de manitol, 2 g de extrato de levedura, 6 g de K_2HPO_4 e 18g de ágar. Neste meio foi acrescentada, também, uma solução contendo 5,34 g de $AlCl_3$, para formar o precipitado de fosfato de alumínio (Hara & Oliveira, 2004), e o pH ajustado para 4,5.

Foi acrescentado o corante bromocresol verde no meio P-Al e azul de bromotimol no meio P-Ca, com o objetivo de visualizar a alteração do pH do meio pelas bactérias, em função da alteração da cor do meio.

Os isolados de rizóbio crescidos em meio YMA (pH 5,5), foram repicados para cada meio de solubilização de fosfatos com auxílio de uma alça de platina, estabelecendo-se cinco colônias por placa (Figura 1) com duas placas por isolado.

Os isolados foram avaliados por um período de 15 dias, cujas medidas do diâmetro (ϕ) dos halos de solubilização, percebido como uma área translúcida ao redor da colônia, e ϕ das colônias foi mensurada a cada três dias, utilizando-se um paquímetro digital (Figura 1). A partir dessas medidas foram obtidos os índices de solubilização de cada isolado através da fórmula: $IS = \phi \text{ Halo (mm)} / \phi \text{ Colônia (mm)}$ (Berraquero *et al.*, 1976).

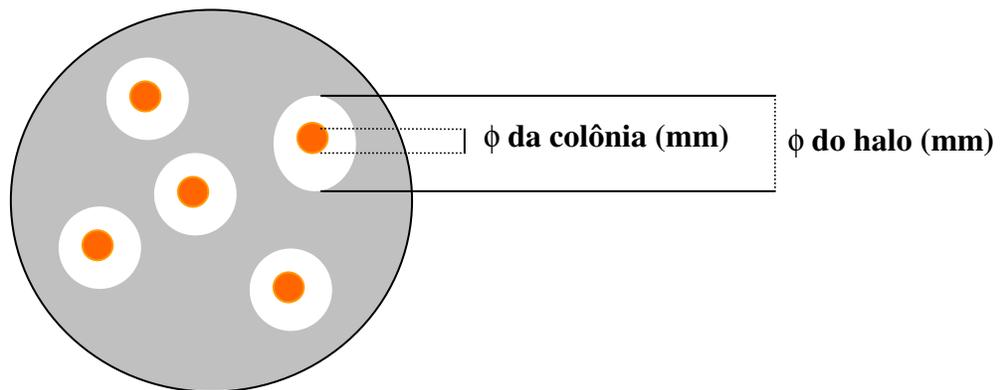


Figura 1. Distribuição das colônias nas placas de Petri para verificação do halo de solubilização como indicativo de solubilização de fosfatos de cálcio e/ou de alumínio.

Com base nos índices de solubilização, as bactérias foram classificadas como isolados com baixa ($IS < 2$), média ($2 \leq IS < 4$) e alta solubilização ($IS > 4$). De acordo com o início da solubilização, as bactérias foram classificadas ainda como precoces, cujo início da solubilização se deu até o terceiro dia, tardias, com início da solubilização depois do terceiro dia e “não solubilizadoras aparentes”, aquelas que não apresentaram solubilização visível até o décimo quinto dia de avaliação.

4.3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra os 68 isolados (34%), dos 200 estudados, que solubilizaram o fosfato de cálcio, sendo que apenas o isolado INPA R813 apresentou alto índice de solubilização final (I.S. = 5,15), e nove apresentaram índice de solubilização médio, variando de 2,06 a 2,57 (Figura 2). Dentre os isolados capazes de solubilizar o fosfato de cálcio, 36 (52,9%) se comportaram como precoces e 32 (47,1%) como tardios. Os outros isolados não apresentaram solubilização aparente no período de 15 dias de avaliação (dados não mostrados).

Verificou-se que dos isolados com capacidade de solubilizar fosfato de cálcio, 65 (95,6%) diminuíram o pH do meio, provocando uma alteração da sua cor, e somente 3 (4,4%) não alteraram a coloração (Tabela 1).

Vários estudos (Mikanova & Kubat, 1999; Rodríguez & Fraga, 1999; Hara & Oliveira, 2004) evidenciam que a capacidade dos isolados de rizóbio solubilizarem o P-Ca está correlacionada com a diminuição do pH do meio pelos ácidos orgânicos ou prótons. Os ácidos orgânicos secretados podem diretamente dissolver o fosfato mineral como resultado da troca de ânion de PO_4^{2-} por ânion ácido ou podem quelatar íons de Fe e Al associados com fosfatos. As bactérias solubilizadoras de fosfatos produzem ácidos orgânicos, tais como, acetato, lactato, oxalato, tartarato, succinato, citrato, gluconato, ketogluconato, glicolato, etc. (Cunningham & Kuiack, 1992; Gyaneshwar *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998,1999). Para estirpes de rizóbio, o ácido orgânico identificado em estirpes com capacidade de solubilização de fosfato foi o ácido 2-ketogluconico, presente em *Rhizobium leguminosarum* (Halder *et al.*, 1990) e *Rhizobium meliloti* (Halder & Chakrabarty, 1993). Em certos casos, a solubilização de fosfatos tem sido verificada pela indução da limitação de P (Gyaneshwar *et al.*, 1999; Graham & Vance, 2000).

Quanto à solubilização de P-Al, dos 200 isolados estudados, 47 (23,5%) apresentaram a capacidade de solubilização (Tabela 2). Somente quatro destes isolados apresentaram índice de solubilização médio, variando de 2,07 a 2,41 (Figura 2). Entre os isolados solubilizadores, 14 (29,8%) comportaram-se como precoces e 33 (70,2%) como tardios, solubilizando o fosfato depois do 6º, 9º, 12º e 15º dia. Os outros isolados não apresentaram solubilização aparente em meio com P-Al (dados não mostrados). Segundo Hara & Oliveira (2005), esta capacidade de solubilização de P-Al pode estar relacionada ao fato de que o alumínio e o fosfato ligado a ele predominam nos solos da região (Raij, 1991).

Dos isolados com capacidade de solubilizar P-Al, 21 (44,7%) diminuíram o pH do meio, oito (17%) alcalinizaram e 18 (38,3%) não o alteraram (Tabela 2).

Muitos microrganismos podem reduzir o pH do meio e solubilizar fosfatos (Gyaneshwar *et al.*, 2002; Silva Filho *et al.*, 2002), porém, a acidificação não parece ser o único mecanismo de solubilização observado para este estudo. Muitos microrganismos solubilizadores de fosfatos têm sido estudados baseados na sua capacidade de solubilizar complexos de P-Ca “*in vitro*”, e o complexo de P-Ca pode ser solubilizado pela redução no pH (Gyaneshwar *et al.*, 2002), porém a capacidade de reduzir o pH em alguns casos não está correlacionada com a capacidade de solubilizar fosfatos. Assim, vários fatores podem ter afetado esta relação, entre eles, as quantidades de P imobilizadas pelos microrganismos durante o crescimento (Silva Filho *et al.*, 2002).

A solubilização de P-Al por alguns isolados foi acompanhada pelo decréscimo do pH do meio. Assim, a produção de ácidos orgânicos é um importante mecanismo para solubilização de P-Al, bem como a liberação de íons de H⁺ (Illmer *et al.*, 1995), mas não o único possível mecanismo para solubilização, já que parte dos isolados alcalinizou o meio ou não alterou o pH pela não modificação da coloração inicial. Isso mostra uma boa evidência para inferir que um considerável número de isolados é capaz de solubilizar P-Al sem produção de ácidos. Porém, a solubilização de P-Al não tem sido estudada profundamente.

Os dados das Tabelas 1 e 2 evidenciam que 43 (63%) dos isolados que solubilizaram o P-Ca também solubilizaram o P-Al. Resultados reportados por Hara & Oliveira (2004), estudando 88 isolados de rizóbio de solos agrícolas amazônicos, mostram que o P-Ca foi solubilizado por 39% dos isolados. A capacidade de solubilização de P-Al foi identificada em 67% dos isolados e a maioria dos isolados de rizóbio que solubilizou P-Ca (76,5% dos isolados) também solubilizou o P-Al. Porém, Toro *et al.* (1996) e Silva Filho & Vidor (2000) identificaram uma baixa ocorrência de isolados que solubilizaram ambos os fosfatos. Silva Filho & Vidor (2000) citam que a baixa frequência de solubilizadores de P-Al se deve ao fato de inicialmente os isolados serem obtidos em meios contendo o P-Ca para, depois, serem avaliados na presença de P-Al. Segundo Hara & Oliveira (2004), essa seqüência no processo de isolamento poderia levar à maior seletividade de microrganismos capazes de solubilizar P-Ca em detrimento de P-Al. Para evitar essa possibilidade optou-se por usar meio YMA com pH 5,5 ao se isolar e purificar os rizobios no presente estudo. Resultados semelhantes foram reportados por Ab-Dalla (1994) Mikanová &

Kubat (1999), Peix *et al.* (2001) e Mikanová & Nováková (2002), onde os isolados de rizóbio estudados foram efetivos quanto à solubilização de P-Ca em laboratório, mas a eficiência de solubilização variou entre as estirpes.

Têm sido reportado, também, que estirpes de *Bradyrhizobium* solubilizaram diferentes quantidades de fosfato (hydroxiapatita e fosfato tricálcio) em meio de cultura líquido (Chabot *et al.*, 1998; Mikanová & Kubát, 1999; Mikanová & Nováková, 2002; Bano & Musarrat, 2003). Segundo Mikanová & Kubát (1999), estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* mostraram atividade de solubilização de fosfato em meio de cultura e, quando inoculadas em plantas de soja, observou-se um aumento da produtividade da cultura e o conteúdo de fósforo lábil no solo. Outros trabalhos têm mostrado o efeito positivo da inoculação de plantas com bactérias solubilizadoras de fosfatos sobre cultivos agrícolas. Peix *et al.* (2001) observaram aumento na produção de culturas como soja, feijão e ervilha quando inoculadas com rizóbios capazes de solubilizarem fosfatos de cálcio.

Quanto à relação do material biológico pesquisado por local de coleta, todos os grupos apresentaram isolados com capacidade de solubilização de P-Ca e P-Al, porém, os grupos que apresentaram maior percentual de isolados solubilizadores de P-Ca e P-Al foram os de Novo Ayrão e Rio Preto da Eva (Tabela 3). Estes sete grupos de isolados coletados de locais distintos mostraram uma diversidade com relação à capacidade de solubilizar fosfatos, corroborando com diversos trabalhos com rizóbio, isolados de diferentes hospedeiros e ecossistemas (Peix *et al.*, 2001; Bano & Musarrat, 2003; Hameed *et al.*, 2004; Hara & Oliveira, 2004, 2005).

Este resultado de laboratório indica a possibilidade de utilizar os isolados de rizóbio capazes de solubilizar fosfatos, para incrementar a concentração de fósforo solúvel na rizosfera e promover a nutrição das plantas com fósforo. A capacidade de solubilizar fosfatos insolúveis e de promover o crescimento das plantas aparece como alternativa na utilização dessas bactérias como biofertilizantes para cultivos agrícolas, tanto para leguminosas como para não leguminosas. Há a necessidade de se estudar mais ainda o uso dessas bactérias (rizóbio) como inoculantes, enfocando os mecanismos de sobrevivência em solos da região amazônica, para que se possa selecionar isolados que possam solubilizar o fósforo insolúvel, além evidentemente de fixar o N atmosférico.

Como etapa da seleção de isolados de rizóbio, deve-se conhecer o comportamento real dos isolados em condições de campo para avaliar a ação dos fatores ambientais na sobrevivência,

eficiência fixadora de N_2 e capacidade competitiva dos isolados, assim como a capacidade de solubilizar fosfato e a influência na nutrição vegetal. Desse modo, torna-se importante estudar o papel dos isolados nos solos ácidos e de baixa fertilidade da Amazônia, não só para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na interação solo-bactéria-planta, como também pelas possibilidades que esses estudos abrem em torno da economia de adubos nitrogenados e fosfatados servindo como alternativa para a agricultura regional.

Tabela 1: Capacidade de solubilização de fosfato de cálcio dos isolados de rizóbio.

Isolados	Início de Solubilização (dia)	I.S. ¹		Solubilização	pH do Meio
		Inicial (mm)	Final (mm)		
INPA R806	6	1,16 (baixo)	1,84 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R808	6	1,10 (baixo)	1,38 (baixo)	Tardio	Não alterou
INPA R809	3	1,17 (baixo)	1,35 (baixo)	Precoce	Acidificou
INPA R813	3	1,52 (baixo)	5,15 (Alto)	Precoce	Acidificou
INPA R814	15	1,12 (baixo)	1,12 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R815	12	1,08 (baixo)	1,08 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R816	3	1,23 (baixo)	1,28 (baixo)	Precoce	Acidificou
INPA R817	3	1,16 (baixo)	1,16 (baixo)	Precoce	Acidificou
INPA R819	15	0,29 (baixo)	0,29 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R820	3	1,20 (baixo)	2,14 (médio)	Precoce	Acidificou
INPA R822	9	1,23 (baixo)	1,23 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R824	6	1,10 (baixo)	1,23 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R825	3	1,49 (baixo)	2,22 (médio)	Precoce	Acidificou
INPA R829	12	1,09 (baixo)	1,09 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R832	3	1,27 (baixo)	1,91 (baixo)	Precoce	Acidificou
INPA R836	6	0,76 (baixo)	0,93 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R839	3	1,47 (baixo)	2,57 (médio)	Precoce	Acidificou
INPA R841	3	1,26 (baixo)	2,06 (médio)	Precoce	Acidificou
INPA R843	3	1,41 (baixo)	2,10 (médio)	Precoce	Acidificou
INPA R851	3	1,40 (baixo)	1,51 (baixo)	Precoce	Acidificou
INPA R852	6	1,19 (baixo)	1,27 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R869	3	1,23 (baixo)	1,93 (baixo)	Precoce	Acidificou
INPA R871	6	0,20 (baixo)	1,33 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R892	3	1,13 (baixo)	1,13 (baixo)	Precoce	Acidificou
INPA R894	6	1,07 (baixo)	2,36 (médio)	Tardio	Não alterou
INPA R896	9	1,25 (baixo)	1,46 (baixo)	Tardio	Não alterou
INPA R898	3	1,18 (baixo)	1,31 (baixo)	Precoce	Acidificou
INPA R906	3	1,12 (baixo)	1,12 (baixo)	Precoce	Acidificou
INPA R908	6	0,26 (baixo)	0,66 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R910	15	0,75 (baixo)	0,75 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R911	3	1,21 (baixo)	1,25 (baixo)	Precoce	Acidificou
INPA R914	6	1,17 (baixo)	1,35 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R915	3	1,21 (baixo)	1,83 (baixo)	Precoce	Acidificou
INPA R917	6	1,16 (baixo)	1,22 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R918	12	1,02 (baixo)	1,10 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R920	3	1,17 (baixo)	1,17 (baixo)	Precoce	Acidificou
INPA R922	3	1,24 (baixo)	1,35 (baixo)	Precoce	Acidificou
INPA R925	3	1,13 (baixo)	1,47 (baixo)	Precoce	Acidificou
INPA R930	9	1,11 (baixo)	1,14 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R933	3	1,00 (baixo)	1,25 (baixo)	Precoce	Acidificou
INPA R936	15	0,25 (baixo)	0,25 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R939	3	1,14 (baixo)	1,61 (baixo)	Precoce	Acidificou
INPA R942	6	0,48 (baixo)	0,71 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R943	6	1,18 (baixo)	1,89 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R947	3	1,29 (baixo)	1,42 (baixo)	Precoce	Acidificou
INPA R951	6	1,18 (baixo)	1,23 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R955	12	0,62 (baixo)	0,90 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R957	3	1,12 (baixo)	1,41 (baixo)	Precoce	Acidificou
INPA R963	9	1,39 (baixo)	1,39 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R964	6	1,21 (baixo)	1,29 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R965	12	1,12 (baixo)	1,12 (baixo)	Tardio	Acidificou

Continuação ...

Isolados	Início da Solubilização (dia)	I.S. ¹		Solubilização	pH do Meio
		Inicial (mm)	Final (mm)		
INPA R966	3	1,00 (baixo)	1,13 (baixo)	Precoce	Acidificou
INPA R968	6	1,00 (baixo)	1,16 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R969	3	1,13 (baixo)	2,26 (médio)	Precoce	Acidificou
INPA R972	6	1,22 (baixo)	1,35 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R973	3	1,09 (baixo)	1,12 (baixo)	Precoce	Acidificou
INPA R977	6	1,04 (baixo)	1,09 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R978	3	1,32 (baixo)	1,84 (baixo)	Precoce	Acidificou
INPA R980	3	1,00 (baixo)	1,10 (baixo)	Precoce	Acidificou
INPA R982	3	1,14 (baixo)	2,24 (médio)	Precoce	Acidificou
INPA R983	6	1,24 (baixo)	2,11 (médio)	Tardio	Acidificou
INPA R990	3	1,28 (baixo)	1,40 (baixo)	Precoce	Acidificou
INPA R992	3	1,23 (baixo)	1,43 (baixo)	Precoce	Acidificou
INPA R994	3	1,19 (baixo)	1,25 (baixo)	Precoce	Acidificou
INPA R999	6	1,14 (baixo)	1,28 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R1004	3	1,24 (baixo)	1,67 (baixo)	Precoce	Acidificou
INPA R1008	3	1,00 (baixo)	1,44 (baixo)	Precoce	Acidificou
INPA R1009	6	1,00 (baixo)	1,06 (baixo)	Tardio	Acidificou

¹ Índice de Solubilização

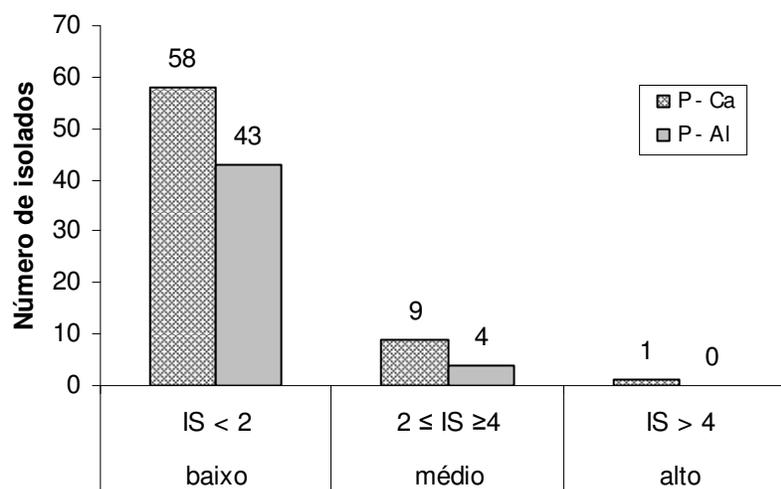
Tabela 2: Capacidade de solubilização de fosfato de alumínio dos isolados de rizóbio.

Isolados	Início de Solubilização (dia)	I.S. ¹		Solubilização	pH do Meio
		Inicial (mm)	Final (mm)		
INPA R808	3	1,09 (baixo)	1,28 (baixo)	Precoce	Alcalinizou
INPA R809	9	1,02 (baixo)	1,03 (baixo)	Tardio	Alcalinizou
INPA R812	15	1,06 (baixo)	1,06 (baixo)	Tardio	Alcalinizou
INPA R814	3	1,06 (baixo)	1,06 (baixo)	Precoce	Não alterou
INPA R816	9	0,99 (baixo)	1,00 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R817	3	1,00 (baixo)	1,00 (baixo)	Precoce	Acidificou
INPA R820	15	1,05 (baixo)	1,05 (baixo)	Tardio	Não alterou
INPA R824	12	1,09 (baixo)	1,09 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R825	3	1,06 (baixo)	2,41 (médio)	Precoce	Acidificou
INPA R829	3	1,00 (baixo)	1,00 (baixo)	Precoce	Alcalinizou
INPA R830	9	1,00 (baixo)	1,00 (baixo)	Tardio	Não alterou
INPA R841	9	1,35 (baixo)	2,07 (médio)	Tardio	Acidificou
INPA R851	9	1,09 (baixo)	1,09 (baixo)	Tardio	Alcalinizou
INPA R852	9	1,27 (baixo)	1,47 (baixo)	Tardio	Não alterou
INPA R871	6	1,19 (baixo)	1,97 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R892	9	1,04 (baixo)	1,07 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R911	3	1,00 (baixo)	1,23 (baixo)	Precoce	Acidificou
INPA R914	3	1,00 (baixo)	2,36 (médio)	Precoce	Não alterou
INPA R915	12	1,16 (baixo)	1,29 (baixo)	Tardio	Não alterou
INPA R917	6	1,52 (baixo)	2,24 (médio)	Tardio	Acidificou
INPA R918	15	1,06 (baixo)	1,06 (baixo)	Tardio	Alcalinizou
INPA R920	3	1,00 (baixo)	1,20 (baixo)	Precoce	Não alterou
INPA R922	6	1,11 (baixo)	1,57 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R925	6	1,08 (baixo)	1,21 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R933	6	1,00 (baixo)	1,46 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R937	6	1,11 (baixo)	1,61 (baixo)	Tardio	Não alterou
INPA R939	12	1,11 (baixo)	1,31 (baixo)	Tardio	Não alterou
INPA R941	6	1,09 (baixo)	1,39 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R942	9	1,18 (baixo)	1,23 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R947	9	1,21 (baixo)	1,79 (baixo)	Tardio	Não alterou
INPA R955	12	1,01 (baixo)	1,01 (baixo)	Tardio	Não alterou
INPA R957	6	1,00 (baixo)	1,82 (baixo)	Tardio	Não alterou
INPA R965	9	1,00 (baixo)	1,07 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R966	9	1,11 (baixo)	1,27 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R968	9	1,23 (baixo)	1,33 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R972	12	1,05 (baixo)	1,05 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R973	3	1,08 (baixo)	1,18 (baixo)	Precoce	Acidificou
INPA R978	12	1,22 (baixo)	1,43 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R980	3	1,00 (baixo)	1,69 (baixo)	Precoce	Alcalinizou
INPA R982	12	1,09 (baixo)	1,16 (baixo)	Tardio	Acidificou
INPA R990	3	1,28 (baixo)	1,40 (baixo)	Precoce	Não alterou
INPA R992	3	1,23 (baixo)	1,43 (baixo)	Precoce	Não alterou
INPA R994	3	1,19 (baixo)	1,25 (baixo)	Precoce	Alcalinizou
INPA R999	6	1,14 (baixo)	1,28 (baixo)	Tardio	Não alterou
INPA R1004	3	1,24 (baixo)	1,67 (baixo)	Precoce	Não alterou
INPA R1008	6	1,26 (baixo)	1,57 (baixo)	Tardio	Não alterou
INPA R1009	12	1,09 (baixo)	1,09 (baixo)	Tardio	Não alterou

¹ Índice de Solubilização

Tabela 3: Relação do material biológico pesquisado por locais de coleta.

Coletas	Total	P – Ca		P – Al	
		Positivas	%	Positivas	%
Novo Ayrão	41	19	46,3	12	29,3
Ramal do Brasileirinho	55	8	14,5	04	7,3
Careiro da Várzea	57	22	38,6	15	26,3
Rio Preto da Eva	15	7	46,7	6	40
Irاندوبا	13	5	38,5	3	23,1
Manacapuru	5	2	40	2	40
Barreirinha	19	5	26,3	5	26,3
Total	205	68	33,2	47	22,9

**Figura 2:** Histograma de classes de índices de solubilização dos isolados testados em 15 dias.

4.3.4. CONCLUSÕES

- 1) O fosfato de cálcio foi solubilizado por 34% dos isolados (68) de rizóbio, porém somente um apresentou alto índice de solubilização (INPA R813);
- 2) Somente 23,5% dos isolados (47) solubilizaram fosfato de alumínio, sendo que apenas quatro apresentaram índice de solubilização médio;
- 3) Do total de 200 isolados de rizóbio, 43 (63%) solubilizaram ambos os fosfatos de cálcio e de alumínio.
- 4) Os isolados coletados de locais distintos mostraram uma diversidade com relação à capacidade de solubilizar fosfatos, predominando baixos índices de solubilização.

4.4. PRODUÇÃO DE ÁCIDO INDOL-ACÉTICO POR RIZÓBIOS ISOLADOS DE SOLOS DA AMAZÔNIA

RESUMO

As bactérias rizobiais do solo fixadoras de nitrogênio sintetizam naturalmente o ácido indol-acético (AIA), sendo a auxina de ocorrência natural mais abundante. O presente estudo tem como objetivo avaliar a produção de AIA por 92 isolados nativos de rizobia em meio com 0, 10, 25, 50 100 e 150 mg mL⁻¹ de triptofano. Todos os isolados de rizobia estudados foram capazes de produzir AIA sem adição de triptofano ao meio. Os níveis mais baixos (2 µg mL⁻¹) e mais elevados (136 µg mL⁻¹) de AIA foram produzidos pelos isolados INPA R841 e INPA R843, respectivamente. A produção de AIA em 52 dos 92 isolados de rizobia foi aumentada significativamente com um aumento na concentração do triptofano de 10 a 100 mg mL⁻¹. Na presença de 150 mg mL⁻¹ do triptofano, cinco isolados (INPA R817, INPA R906, INPA R918, INPA R927 e INPA R949) produziram elevados níveis (1160 a 2660 µg mL⁻¹) de AIA enquanto 11 bactérias (INPA R820, INPA R874, INPA R895, INPA R920, INPA R942, INPA R973, INPA R990, INPA R992, INPA R993, INPA R999 e INPA R1003) produziram AIA com uma variação de 512 a 869 µg mL⁻¹.

PALAVRAS-CHAVES: AIA, Bactéria fixadora de nitrogênio, Triptofano.

INDOLE ACETIC ACID PRODUCTION BY RHIZOBIA ISOLATED FROM AMAZONIAN SOILS

ABSTRACT

The nitrogen fixing soil bacteria Rhizobia naturally synthesize indole-acetic acid (IAA), the most abundant naturally occurring auxin. The present study has as objective to evaluate the production of IAA by 92 indigenous rhizobia isolates in a medium with 0, 10, 25, 50 100 and 150 mg mL⁻¹ of tryptophan. All rhizobia isolates studied were capable of producing IAA without addition of tryptophan to the medium. The lower (2 µg mL⁻¹) and higher (136 µg mL⁻¹) levels of IAA were produced by isolates INPA R841 and INPA R843, respectively. The production of IAA in 52 of the 92 isolates of rhizobia was significantly increased with an increase in tryptophan concentration from 10 to 100 mg mL⁻¹. In the presence of 150 mg mL⁻¹ of tryptophan, five isolates (INPA R817, INPA R906, INPA R918, INPA R927 e INPA R949) produced high levels (1160 to 2660 µg mL⁻¹) of IAA while eleven other bacteria (INPA R820, INPA R874, INPA R895, INPA R920, INPA R942, INPA R973, INPA R990, INPA R992, INPA R993, INPA R999 e INPA R1003) produced IAA in the range of 512 to 869 µg mL⁻¹.

KEY WORDS: IAA, Nitrogen fixation bacteria, Tryptophan.

4.4.1. INTRODUÇÃO

As bactérias da rizosfera podem influenciar no crescimento de plantas por contribuírem com a produção de fitormônios, tal como as auxinas. A principal auxina, o ácido indol-acético (AIA) tem aplicação prática como promotor de crescimento vegetal. Vários estudos mostram que os microrganismos do solo estão ativamente envolvidos na síntese de auxinas, tanto em meio de cultura, como no solo (Antoun *et al.*, 1998; Basu & Ghosh, 1998; Biswas *et al.*, 2000a,b; Vega-Hernández *et al.*, 2002; Hameed *et al.*, 2004; Khalid *et al.*, 2004; Thakuria *et al.*, 2004).

Vários caminhos foram reportados para biosíntese de AIA em bactérias (Patten & Glick, 1996), porém o L-tryptofano, como aminoácido, serve como um precursor fisiológico para biosíntese de auxinas em plantas e microrganismos (Bartel, 1997; Frankenberger & Arshad 1995; Khalid *et al.*, 2004). Os exsudados radiculares são fontes naturais de L-triptofano (Dakora & Phillips, 2002; Lum & Hirsch, 2003) para microbiota do solo, contribuindo para aumentar a biosíntese de auxina na rizosfera.

A fixação biológica do nitrogênio tem sido o foco principal de diversos trabalhos. Os rizóbios aumentam a nodulação e peso dos nódulos em leguminosas, ao mesmo tempo que estimulam o crescimento e desenvolvimento da planta hospedeira (Kessel & Hartley, 2000; Alves *et al.*, 2003; Jensen & Hauggaard-Nielsen, 2003). Em parte, tais benefícios decorrem da absorção de fósforo e outros minerais (Chabot *et al.*, 1996; Biswas *et al.*, 2000a) e da síntese de AIA (Biswas *et al.*, 2000a,b; Vessey, 2003). Ainda, confere proteção da raiz ao ataque de patógenos (Handlesman & Staab, 1996), produção de diversos metabólitos microbianos como sideróforos (Neilands & Leong, 1986) e rizobiotoxinas (Nautiyal, 1997).

Vários autores têm mostrado que a produção de AIA e a fixação biológica do nitrogênio por bactérias diazotróficas contribuem significativamente para o crescimento de plantas leguminosas e não leguminosas (Antoun *et al.*, 1998; Basu & Ghosh, 1998; Biswas *et al.*, 2000a; Thakuria *et al.*, 2004). No caso de rizóbios, a produção de AIA estimulou a formação de novas raízes e nódulos em leguminosas (Prinsen, 1991; Basu & Ghosh, 1998).

Biswas *et al.* (2000a,b), além de constatarem a produção de AIA por rizóbio em meio de cultura, sugerem um mecanismo potencial pelo qual essas bactérias podem regular o crescimento das plantas. Vários outros trabalhos evidenciam a síntese de AIA por rizóbio usando o L-triptofano como precursor do AIA (Basu & Ghosh, 1998; Vega-Hernández *et al.*, 2002; Hameed

et al., 2004). Esses estudos mostram que o AIA proporciona uma resposta fisiológica positiva nas plantas hospedeiras. Portanto, a avaliação da síntese de AIA por rizóbio pode proporcionar uma base segura para selecionar isolados efetivos de solos da região.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a produção de AIA por rizóbio nativos da Amazônia em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de L-triptofano.

4.4.2. MATERIAL E MÉTODOS

Isolados Utilizados.

Os 92 isolados bacterianos avaliados nesse estudo foram obtidos da coleção de rizóbio do Laboratório de Microbiologia do INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia), previamente isoladas de solos de terra firme e várzea da região, usando o feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) como planta isca. Os isolados foram repicados em placa de Petri contendo meio YMA (Yeast Mannitol Agar) (Vincent, 1970) e incubados a 28° C por aproximadamente cinco dias.

Produção de AIA

Os isolados de rizóbio, colônias de 2-3 mm de diâmetro crescidas em meio YMA, foram transferidos para frascos de Erlenmeyer (150 mL) contendo 25 mL de meio de cultura YM (Vincent, 1970) na ausência e presença de diferentes concentrações de triptofano (10, 25, 50, 100 e 150 mg L⁻¹). Após quatro dias de crescimento sobre um agitador rotatório (100 rpm) a 26±2°C, a biomassa bacteriana foi separada por centrifugação a 12.000 rpm durante 15 minutos. Para as análises colorimétricas de AIA no sobrenadante (Gordon & Weber, 1951) foram utilizadas uma parte do reagente de Salkowski [(FeCl₃ 0,5 M + HClO₄ (35%)] e duas partes do sobrenadante obtido de cada isolado. Após a comprovação qualitativa da presença de AIA (coloração rosa após 25 minutos de reação a 26±2°C), o fitormônio foi quantificado espectrofotometricamente em 530 nm. As concentrações, em µg mL⁻¹ foram calculadas a partir de uma curva padrão construída com AIA.

Os isolados que apresentaram níveis de AIA superiores a $300 \mu\text{g mL}^{-1}$, considerando as médias de cada um em todos os tratamentos, foram avaliados novamente em meio suplementado com 150 mg L^{-1} , durante dois, cinco, oito e 12 dias.

Os dados foram analisados estatisticamente e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey a 5%, usando o programa STATISTICA 6.0.

4.4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os isolados testados produziram AIA em meio de cultura suplementado ou não com L-triptofano. A produção de AIA variou significativamente entre isolados e níveis de L-triptofano (Tabela 1). Na ausência do indutor, a síntese de AIA variou significativamente de 2 a $136 \mu\text{g mL}^{-1}$, com os isolados INPA R841 e INPA R843 apresentando os maiores e menores níveis, respectivamente.

A produção de AIA aumentou significativamente ($P < 0,01$) com aumento das concentrações de L-triptofano, com destaque para os isolados INPA R817, INPA R820, INPA R874, INPA R895, INPA R906, INPA R918, INPA R920, INPA R927, INPA R942, INPA R949, INPA R990, INPA R992, INPA R993, INPA R999 e INPA R1003 (Tabela 1).

O isolado INPA R892 apresentou máxima produção de AIA na concentração de 10 mg L^{-1} de L-triptofano decrescendo a partir desse nível. O mesmo foi observado na concentração de 25 mg L^{-1} para os isolados INPA R824, INPA R922, INPA R930, INPA R936, INPA R972, INPA R1004 e INPA R1010. Por sua vez na, concentração de 50 mg L^{-1} , os isolados INPA R908 e INPA R1010 foram os de maior destaque; na concentração de 100 mg L^{-1} , os isolados INPA R815, INPA R816, INPA R822, INPA R884, INPA R968, INPA R973, INPA R983 e INPA R1009 sintetizaram os maiores níveis de AIA. Resultados semelhantes foram documentados por Antoun *et al.* (1998) e Hameed *et al.* (2004) para isolados de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* crescidos em meio de cultura suplementado com 100 mg L^{-1} de L-triptofano. Na presença 150 mg mL^{-1} do triptofano, cinco isolados produziram elevados níveis (1160 a $2660 \mu\text{g mL}^{-1}$) de AIA enquanto 11 bactérias produziram AIA na variação de 512 a $869 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A média geral dos tratamentos também mostrou que houve diferença significativa ($P < 0,01$) entre as bactérias avaliadas. Dos 92 isolados estudados, 38 (43%) apresentaram níveis

de AIA superiores a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 1). Esses resultados foram superiores aos encontrados em diversos trabalhos realizados com isolados de rizóbio cultivados em meio de cultura suplementados com L-triptofano. Biswas *et al.* (2000a), trabalhando com rizóbios inoculados em arroz hidropônico crescidos por cinco e dez dias, registraram níveis de AIA inferiores a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. Num período de incubação de quatro dias em meio suplementado com 500 mg L^{-1} de L-triptofano, Bano & Musarrat (2003) registraram níveis de AIA inferiores a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Houve diferenças significativas ($p < 0,01$) entre os tratamentos, com a produção de AIA sendo proporcional às concentrações de L-triptofano (Figura 2).

Quanto aos isolados com produção de AIA acima de $300 \mu\text{g mL}^{-1}$, considerando a produção média dos tratamentos, oito dos doze isolados selecionados exibiram máxima produção aos cinco dias de crescimento em meio suplementado com 150 mg L^{-1} de L-triptofano (Figura 3). A produção de AIA foi observada aos dois dias de crescimento e a máxima produção destes isolados se deu no quinto dia. Esses resultados confirmam os estudos de Basu & Ghosh (1998) e Bano & Musarrat (2003), segundo os quais a máxima produção de AIA pode ocorrer nas fases logarítmica e estacionária de crescimento rizobial.

Apesar de não terem sido feitos estudos de inoculação, a produção relativamente alta de AIA pelos isolados avaliados sugere o uso em potencial desses rizóbios como promotores de crescimento radicular de espécies leguminosas e não leguminosas, conforme documentado por Antoun *et al.* (1998), Basu & Ghosh (1998) e Biswas *et al.* (2000a,b).

Como resultado de propriedades biológicas, isolados de rizóbio selecionados pela produção de AIA podem ser sugeridos para o desenvolvimento de biofertilizantes eficientes, em laboratório e/ou experimento de campo, para explorar seus potenciais como bactéria promotora do crescimento de plantas leguminosas e não leguminosas.

Tabela 1: Produção de ácido indol-acético ($\mu\text{g mL}^{-1}$) por isolados de rizóbio em meio YM com ausência e presença de L-triptofano.⁽¹⁾

Isolados	Concentração de L-triptofano (mg L^{-1})						CV ⁽²⁾
	0	10	25	50	100	150	
INPA R806	12 mnopq E	16 uvx D	19 rst D	33 uvx C	58 uv B	63 s A	4,1
INPA R808	24 klm E	42 qrs D	45 pqr CD	46 uv C	50 uv B	78 rs A	2,1
INPA R809	11 mnop C	34 rst A	30 pqrs AB	25 vx B	24 vx B	31 tuvx AB	10,9
INPA R811	12 mnopq ED	18 tuvx D	30 pqrs C	33 uvx C	43 uvx B	56 stu A	4,7
INPA R812	24 kl D	34 rst C	35 pqrsC	40 uv B	50 uv A	53 stu A	3,2
INPA R813	41 gh C	54 pqr BC	149 jklm A	149 pq A	139 s A	63 s B	5,4
INPA R814a	22 lm E	23 stuv E	29 pqrs D	36 uv C	43 uvx B	49 tu A	3,9
INPA R814b	22 lm F	112 ijk E	170 ijk D	196 nop CB	212 qr B	275 mn A	3,2
INPA R815	77 d D	90 klmn D	143 klm C	251 jk B	642 i A	236 n B	4,1
INPA R816	28 k F	55 pqr E	110 mn D	190 nop C	708 h A	223 n B	3,2
INPA R817	40 ghi F	152 gh E	654 a D	1232 a C	2244 a B	2660 a A	1,2
INPA R819	19 lm C	204 e B	209 h B	276 jk A	275 op A	285 mn A	6,0
INPA R820	30 jk F	247 c E	276 g D	323 i C	409 lm B	671 h A	2,5
INPA R822	25 kl F	35 rst E	87 o C	75 t D	127 st A	117 pq B	2,3
INPA R824	13 mno F	101 jkl C	129 lmn A	114 rs B	69 u D	67 s E	0,9
INPA R825	16 lmn E	76 no C	56 op D	96 rst B	156 s A	157 nop A	3,4
INPA R826	8 nopqr D	19 stuvx C	28 pqrs B	37 uv A	31 vx B	26 uvx B	7,6
INPA R827	10 nopqr D	17 uvx B	13 stu C	12 xz CD	16 xz B	20 vx A	6,5
INPA R829	7 mnop E	52 qrs B	37 pqrs D	47 uv C	57 uv A	45 tu C	2,5
INPA R831	9 nopq C	14 uvxz B	14 stu B	15 xz B	15 xz B	52 stu A	4,1
INPA R832	10 mnopq E	21 stuv CD	32 pqrs A	24 vx BC	26 vx B	18 vx D	6,2
INPA R835	15 lmn B	16 uvxz B	18 rst B	28 vx A	18 xz B	18 vx B	7,9
INPA R839	25 kl D	32 rstu C	51 op A	40 uv B	41 uvx B	51 stu A	2,9
INPA R841	136 a C	96 ijl D	556 b A	256 jk B	29 vx F	76 rs E	2,5
INPA R843	2 s E	6 xz D	23 qrs A	14 xz C	15 xz C	18 vx B	5,3
INPA R851	42 gh C	54 pqr BC	149 jklm A	149 pq A	139 s A	63 s B	5,4
INPA R852	39 ghi C	48 qrs B	78 op A	80 t A	81 tu A	75 rs A	3,3
INPA R861	95 c B	100 jkl A	39 pqr D	100 rst A	87 tu C	85 r C	1,1
INPA R869	32 ijk D	37 rst CD	45 pqr BC	46 uv B	56 uv A	59 st A	7,2
INPA R871	32 ijk E	36 rst DE	42 pqr CD	46 uv BC	51 uv AB	58 st A	6,4
INPA R873	24 klm CD	33 rst A	25 qrs CD	29 vx B	26 vx C	23 uvx D	3,5
INPA R874	10 mnopq F	149 gh E	187 hij D	258 jk C	408 lm B	570 i A	3,7
INPA R882	30 jk D	40 qrs C	41 pqr C	37 uv C	52 uv B	78 rs A	5,1

Tabela 1: Continuação

Isolados	Concentração de L-tiptofano (mg L ⁻¹)						CV
	0	10	25	50	100	150	
INPA R883	27 k C	41 qrs A	30 pqrs BC	30 uvx BC	20 vx D	32 tuv B	4,5
INPA R884	38 ghij F	296 b E	486 c C	576 d B	856 e A	436 l D	1,0
INPA R886	24 klm D	53 pqr B	54 op B	57 u A	58 uv A	34 tuvC	2,2
INPA R887	19 lmn F	35 rst D	67 op A	58 u B	41 uvx C	25 uvx E	2,3
INPA R891	39 ghij CD	40 qrs C	43 pqr B	34 uvx E	38 uvx D	50 stu A	1,5
INPA R892	34 hij F	581 a A	342 e B	253 jk C	225 qr D	175 no E	2,1
INPA R894	11 mnopq D	83 lmn C	167 ijk B	167 op B	256 p A	261 n A	3,6
INPA R895	8 nopq F	158 gh E	203 h D	266 jk C	403 lm B	578 i A	4,4
INPA R896	62 e E	112 ijk C	112 mn C	82 t D	117 st B	140 op A	1,0
INPA R898	24 klm E	147 gh D	164 ijk C	192 no B	192 r B	208 n A	3,4
INPA R899	14 mno B	11 vxz C	11 stu C	14 xz B	15 xz B	25 uvx A	6,2
INPA R904	12 mnopq CD	10 vxz D	14 rst C	13 xz C	31 vx B	35 tuv A	6,0
INPA R906	20 lm F	35 rst E	169 ijk D	960 b C	1116 b B	1360 c A	1,0
INPA R908	37 ghij F	114 ijk D	137 lmn B	150 pq A	125 st C	72 rs E	1,2
INPA R910	28 k E	31 rstu DE	38 pqr CD	46 uv BC	51 uv AB	58 st A	6,9
INPA R911	19 lm F	35 rst D	67 op A	58 u B	41 uvx C	25 uvx E	2,5
INPA R914	32 ijk C	33 rst C	38 pqr C	52 u B	51 uv B	60 st A	5,5
INPA R915	35 hij E	68 nop B	80 op A	61 tu C	70 u B	56 stu D	1,9
INPA R916	14 mno C	51 qrs A	24 qrs B	21 xz BC	18 xz BC	20 vx BC	12,6
INPA R917	31 jk E	66 opq C	92 o A	78 t B	77 tu B	46 tu D	2,1
INPA R918	113 b F	179 f E	471 c D	623 c C	1066 c B	1549 b A	0,5
INPA R920	32 jk F	103 ijk E	312 f D	539 e C	662 i B	785 f A	2,8
INPA R922	41 gh F	132 hi C	194 hij A	184 op B	111 st D	88 r E	1,0
INPA R925	38 ghij D	157 gh A	137 lmn B	136 q B	88 tu C	41 tu D	1,1
INPA R927	45 fgh F	86 lmn E	269 g D	469 f C	960 d B	1360 c A	1,3
INPA R930	17 lmn F	81 lmn C	114 mn A	109 rst B	62 uv D	56 stu E	1,0
INPA R936	36 hij E	106 ijk B	201 h A	68 t D	81 tu C	69 s D	0,6
INPA R937	24 kl E	27 stu D	22 qrs F	30 uvx C	42 uvx A	35 tuv B	1,5
INPA R939	56 e F	108 ijk E	183 ij C	266 jk B	309 op A	153 nop D	1,5
INPA R941	19 lm D	61 pq B	67 op A	59 t B	47 uvx C	45 tu C	2,0
INPA R942	62 e F	107 ijk E	146 klm D	344 h C	428 l B	707 g A	1,0
INPA R943	24 kl E	39 rst C	65 op A	49 uv B	35 vx D	38 tuv C	1,6
INPA R945	20 lm D	26 stu C	17 rst D	17 xz D	31 vx B	37 tuv A	5,3
INPA R947	47 fg F	77 no C	84 o B	104 rst A	58 uv E	73 rs D	1,1

Tabela 1: Continuação

Isolados	Concentração de L-triptofano (mg L ⁻¹)						CV
	0	10	25	50	100	150	
INPA R949	37 ghij F	84 lmn E	249 h D	429 g C	760 g B	1160 d A	2,9
INPA R951	18 lmn E	42 qrs B	61 op A	43 uv B	32 vx C	27 uvx D	1,9
INPA R956	19 lm F	70 nop D	78 op B	76 t C	80 tu A	56 stu E	1,0
INPA R958	14 mno D	20 stuv C	21 qrs C	33 uvx A	32 vx A	27 uvx B	4,3
INPA R966	6 opqr D	28 rstu C	49 opq A	35 uvx b	37 uvx B	27 uvx C	4,5
INPA R968	42 gh E	83 lmn D	167 ijk C	168 op BC	197 qr A	172 nop B	1,1
INPA R969	3 oprsC	19 stuvx A	8 tuv B	8 z B	6 z B	7 z B	14,3
INPA R972	39 fgh E	109 ijk D	316 f A	261 jk B	184 r C	185 no C	1,1
INPA R973	47 fg F	181 f E	344 d D	567 d C	773 f A	641 h B	2,2
INPA R976	10 nopq F	36 rst C	61 op A	41 uv B	32 vx D	20 vx E	3,4
INPA R977	18 lmn C	20 stuv ABC	19 rst BC	19 xz BC	21 vx AB	22 uvx A	5,6
INPA R978	33 ijk F	69 nop C	94 o B	136 q A	63 uv D	40 tu E	1,1
INPA R982	43 fgh F	64 opq E	189 hij A	132 q B	89 tu C	82 r D	1,0
INPA R980	18 lmn E	66 opq D	98 o C	107 rst C	187 r B	203 n A	
INPA R983	56 e F	106 ijk E	239 h D	398 g C	620 j A	476 k B	0,5
INPA R990	27 k E	149 gh D	174 ijk D	216 mn C	358 n B	512 j A	3,9
INPA R992	11 mnopq E	136 hi D	142 klm D	542 e C	619 j B	869 e A	1,8
INPA R993	18 lmn E	245 d D	270 g D	312 i C	441 kl B	528 j A	4,5
INPA R994	40 gh D	58 pqr D	59 op D	233 l B	304 op A	134 opq C	5,1
INPA R999	12 mno F	95 jkl E	195 hij D	266 jk C	399 lm B	570 i A	2,6
INPA R1003	10 nopq F	162 gh E	278 g D	320 i C	453 k B	649 h A	3,4
INPA R1004	43 gh E	108 ijk D	358 d A	292 j B	264 p B	158 nop C	5,1
INPA R1008	27 k E	39 rst D	48 opq C	79 t A	53 uv B	48 tu C	2,2
INPA R1009	57 e E	87 lmn D	127 lmn B	92 rst C	133 s A	94 qr C	1,7
INPA R1010	48 f E	110 ijk B	134 lmn A	133 q A	100 tu C	70 rs D	1,5
CV	5,9	3,6	5,7	2,6	3,0	3,4	

⁽¹⁾ Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tuckey (P<0,01).

⁽²⁾ CV Coeficiente de variação.

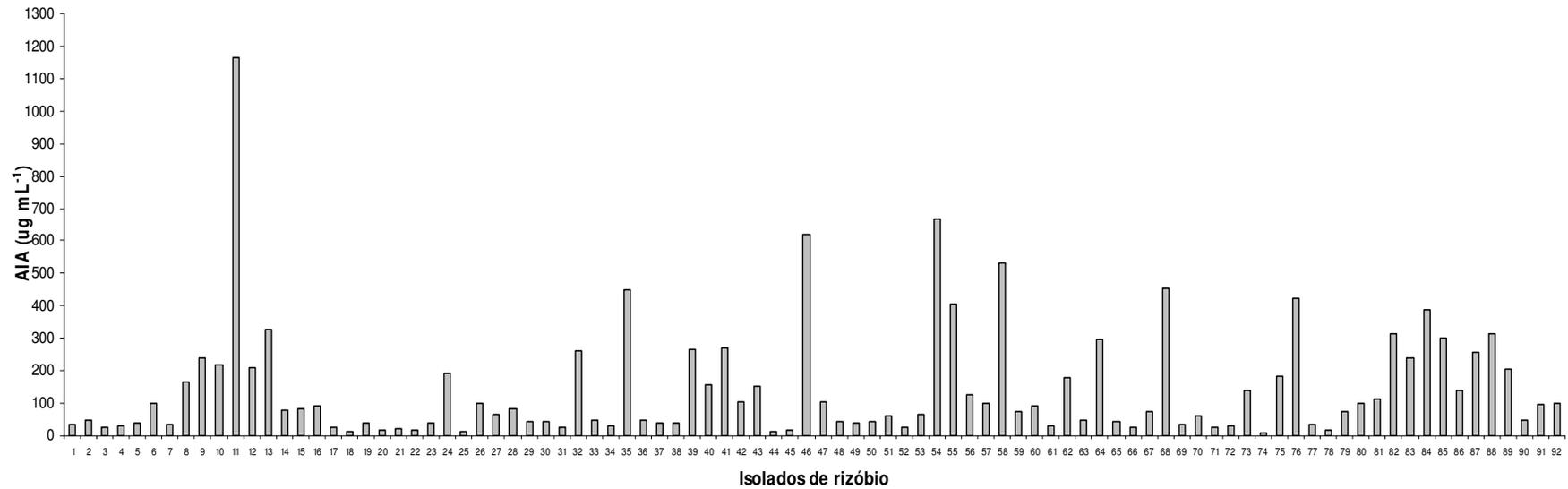


Figura 1: Produção média de AIA por isolados de rizóbio. As médias representam a quantidade de AIA produzida por isolados considerando todos os tratamentos.

1- INPA R806	13- INPA R820	25- INPA R843	37- INPA R887	49- INPA R911	61- INPA R937	73- INPA R968	85- INPA R993
2- INPA R808	14- INPA R822	26- INPA R851	38- INPA R891	50- INPA R914	62- INPA R939	74- INPA R969	86- INPA R994
3- INPA R809	15- INPA R824	27- INPA R852	39- INPA R892	51- INPA R915	63- INPA R941	75- INPA R972	87- INPA R999
4- INPA R 811	16- INPA R825	28- INPA R861	40- INPA R894	52- INPA R916	64- INPA R942	76- INPA R973	88- INPA R1003
5- INPA R812	17- INPA R826	29- INPA R869	41- INPA R895	53- INPA R917	65- INPA R943	77- INPA R976	89- INPA R1004
6- INPA R813	18- INPA R827	30- INPA R871	42- INPA R896	54- INPA R918	66- INPA R945	78- INPA R977	90- INPA R1008
7- INPA R814a	19- INPA R829	31- INPA R873	43- INPA R898	55- INPA R920	67- INPA R947	79- INPA R978	91- INPA R1009
8- INPA R814b	20- INPA R831	32- INPA R874	44- INPA R899	56- INPA R922	68- INPA R949	80- INPA R982	92- INPA R1010
9- INPA R815	21- INPA R832	33- INPA R882	45- INPA R904	57- INPA R925	69- INPA R951	81- INPA R980	
10- INPA R816	22- INPA R835	34- INPA R883	46- INPA R906	58- INPA R927	70- INPA R956	82- INPA R983	
11- INPA R817	23- INPA R839	35- INPA R884	47- INPA R908	59- INPA R930	71- INPA R958	83- INPA R990	
12- INPA R819	24- INPA R841	36- INPA R886	48- INPA R910	60- INPA R936	72- INPA R966	84- INPA R992	

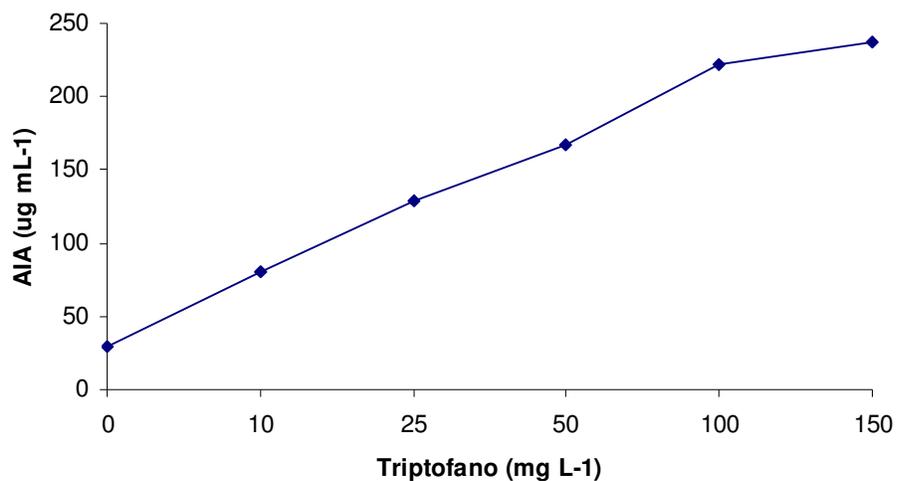


Figura 2: Produção de ácido indol-acético por concentrações de L-triptofano utilizada para cada tratamento considerando as médias de todos os isolados.

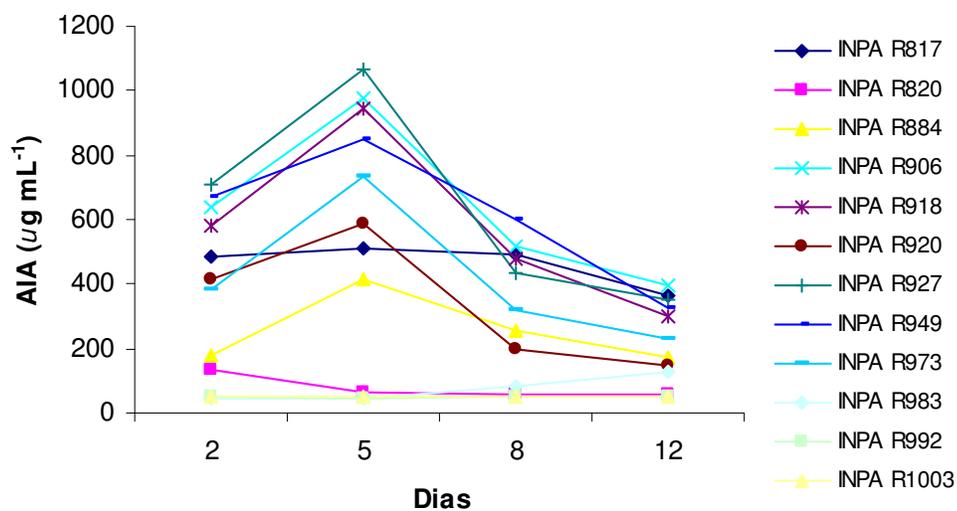


Figura 3: Produção de AIA por isolados de rizóbio. As linhas representam a quantidade de AIA produzida por isolados em meio YM suplementado com 150 mg L⁻¹ de L-triptofano.

4.4.4. CONCLUSÕES

- 1) Houve grande variação na produção de AIA nas diferentes concentrações de L-triptofano, destacando-se 19 isolados, de um total de 92, com produção acima de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.
- 2) A melhor dose de L-triptofano utilizado foi a de 150 mg mL^{-1} .
- 3) A produção máxima de AIA de 12 isolados testados ocorreu no 5º dia de crescimento.

4.5. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE RIZÓBIO E INOCULAÇÃO EM FEIJÃO CAUPI (*Vigna unguiculata* L. (Walp.))

RESUMO

A fixação biológica do nitrogênio é de fundamental importância na sustentabilidade agrícola, e a caracterização fenotípica rizobial contribui para o conhecimento da sua diversidade em coleções e para a utilização posterior em sistemas agrícolas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade fenotípica de rizóbia isolados de solos da Amazônia para sua caracterização preliminar e, suas eficiências simbióticas quando inoculados em feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.). Para isso foram realizados dois experimentos. No primeiro inoculou-se 20 isolados mais seis estirpes-referência e no segundo, inoculou-se 12 isolados de rizóbio solubilizadores de fosfatos usando solo adubado com fosfato de rocha. Os isolados apresentaram diversidade quanto às características morfológicas e fisiológicas. No experimento 1, doze isolados induziram a produção de matéria seca (MST), número (NN), massa seca dos nódulos (MSN), acúmulo de nitrogênio (ANPA), eficiência relativa (ER) e simbiótica (ES) superiores aos outros isolados e testemunha e, similares às do tratamento adubado. No experimento 2, oito dos doze isolados testados apresentaram MST, NN, P total e eficiência de uso de fósforo (EFU-P) superiores aos outros isolados e a testemunha e, similar ao tratamento adubado. Associando-se os resultados de eficiência simbiótica e nodulação, observou-se que os isolados de rizóbio INPA R808, INPA R811, INPA R814a, INPA R815, INPA R817, INPA R820, INPA R822, INPA R874, INPA R901, INPA R921, INPA R980 e INPA R999 apresentaram bom desempenho, e podem ser potenciais inoculantes para o feijão caupi, devendo ser testados nas outras etapas que precedem a recomendação de uso em sistemas produtivos na Amazônia.

PALAVRAS CHAVES: Diversidade fenotípica, nodulação, fixação de nitrogênio, Amazônia.

PHENOTYPIC CHARACTERIZATION AND INOCULATION OF RHIZOBIA IN COWPEA BEAN (*Vigna unguiculata* L. (Walp.))

ABSTRACT

Biological nitrogen fixation is of fundamental importance for agricultural sustainability, and the evaluation of the rhizobial diversity contributes for the knowledge of their diversity at collections, as well as for their posterior use in agricultural systems. The objective of this paper was to evaluate the phenotype diversity for preliminary characterization and symbiotic efficiency of rhizobia isolates from Amazonian when inoculated on cowpea bean (*Vigna unguiculata* L. Walp.). Two experiments were accomplished for that. In the first one inoculated 20 isolates plus six reference strains, and in the second one, 12 isolates able to solubilizing phosphate were inoculated using a soil fertilized with rock phosphate. The isolates presented diversity about their morphologic and physiological characteristics. In the experiment 1, 12 isolates induced dry mass production (DM), nodule number (NN) and dry mass (NDW), accumulation of nitrogen and the relative (RE) and symbiotic efficiency (SE) superior to the other isolates and control plants, and were similar to the ones of the fertilizer treatment. In the experiment 2, eight of the 12 isolates ones tested presented DM, NN, total P and phosphorus use efficiency (PUE) superior to the other isolates and control plants, and similar to the fertilizer treatment. Associating the results of symbiotic efficiency and nodulation, it was observed that the isolates of rhizobia INPA R808, INPA R811, INPA R814a, INPA R815, INPA R817, INPA R820, INPA R822, INPA R874, INPA R901, INPA R921, INPA R980 e INPA R999 presented good performance, and may be potential inoculants for the cowpea bean, and must be tested for other essays which precedes the recommendation for using in Amazonian agronomic systems.

WORD-KEY: Phenotype diversity, nodulation, nitrogen fixation, Amazonia

4.5.1. INTRODUÇÃO

Em diversas partes do planeta, os estudos envolvendo a interação rizóbio-leguminosa recebem um enorme suporte econômico quando comparadas às demais áreas de pesquisa agrônômica, sendo por consequência a interação planta-microrganismos mais bem estudada. Entretanto, o estudo dessa simbiose, especialmente em regiões tropicais, além de buscar entender suas complexas relações ecológicas e evolucionárias, envolve a procura de genótipos tolerantes aos diferentes estresses ambientais presentes nestas áreas e limitantes a esta simbiose, visando o manejo mais eficiente da interação (Straliotto & Rumjanek, 1999a).

A fixação biológica do nitrogênio atmosférico (FBN) é importante na substituição da adubação nitrogenada em diversas partes do mundo (Buendia-Cloveria *et al.*, 1994; Anuar *et al.*, 1995), bem como na Amazônia (Oliveira, 1991b; Moreira, 1995; Hara & Oliveira, 2004, 2005). Um melhor entendimento da associação rizóbio-leguminosa nas condições de solos ácidos e de baixa fertilidade na Amazônia pode prover uma contribuição efetiva no balanço de nitrogênio tanto no solo como nas plantas.

A FBN é um processo ecológico e economicamente vantajoso que pode substituir os onerosos adubos químicos nitrogenados. No Brasil, o melhor exemplo de utilização deste processo é a cultura da soja, onde a adubação química nitrogenada é totalmente substituída pela utilização de inoculantes contendo bactérias do gênero *Bradyrhizobium*, o que representa uma economia para o país, de cerca de US\$ 2 bilhões por ano (Coutinho, 1996; Marin *et al.*, 1999; Hungria & Campo, 2005).

No Brasil, estirpes eficientes já foram selecionadas para cerca de 100 espécies por várias instituições de pesquisa; no entanto, do total de 26 milhões de doses de inoculantes comercializados em 2003, 99% foram para a cultura da soja (Graham & Vance, 2003; Hungria & Campo, 2005). Portanto, é imprescindível o emprego desta biotecnologia de baixo custo para outras leguminosas, especialmente aquelas de subsistência cultivadas por pequenos agricultores como o feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. (Walp.)).

A produção média brasileira desta cultura é bastante baixa, com cerca de 500 kg ha⁻¹, sendo cultivada principalmente nas regiões Norte e Nordeste, embora possa ter sua área de cultivo ampliada em outras regiões por ser bem mais rústica do que o feijão comum (Freire Filho *et al.*, 2004). Por possuir ampla variabilidade genética, tolerância às condições edafoclimáticas desfavoráveis, alto potencial produtivo, grande capacidade de

fixar nitrogênio atmosférico e excelente valor nutritivo, o feijão caupi é uma espécie de grande valor genético estratégico (Ehlers & Hall, 1997; Andrade Junior *et al.*, 2003; Graham & Vance, 2003; Freire Filho *et al.*, 2004, 2005).

O Estado do Amazonas possui grandes áreas de cultivo, tanto na várzea como na terra firme, adequadas ao cultivo do feijão caupi. É uma leguminosa de grande importância na alimentação humana, sendo uma cultura estritamente relacionada às atividades de subsistência no Estado, e de significativa importância sócio-econômica para a região (Dias *et al.*, 2002). Assim, o caupi pode obter da associação com o rizóbio, o nitrogênio necessário para altas produções (Martins, 1996; Kessel & Hartley, 2000; Sanginga, 2003).

Nos últimos anos, a diversidade microbiana vem sendo determinada principalmente pelo uso de técnicas moleculares. Entretanto, a avaliação das características culturais é o primeiro passo na identificação de novos grupos taxonômicos de microrganismos. Atualmente, busca-se uma taxonomia polifásica e as características culturais fazem parte dos caracteres utilizados para esta classificação (Vandamme *et al.*, 1996). Estas características podem indicar diferenças morfológicas e fisiológicas importantes entre microrganismos, que podem ser detectadas posteriormente mediante estudos mais avançados.

As características morfológicas relevantes que podem ser avaliadas são o tempo de formação de colônias isoladas, alteração do pH do meio de cultura (Jordan, 1984; Moreira & Pereira, 2001), produção de muco, tamanho, forma, cor e tempo de formação da colônia (Vincent, 1970; Hungria & Araújo, 1994; Martins *et al.*, 1997b; Zilli *et al.*, 2000).

Os princípios básicos que devem orientar a seleção de estirpes de rizóbio com propósito prático de inoculação em leguminosas têm sido objeto de muitos estudos (Neves *et al.*, 1998a,b; Hungria *et al.*, 2001b). A seleção deve objetivar estirpes eficientes e adaptadas às condições prevalentes no local de emprego, como os solos ácidos e de baixa fertilidade da Amazônia. Além disso, devem ser competitivas frente à população nativa, e apresentarem vários aspectos agrônômicos e culturais são observados, tais como potencial de nodulação, fixação de N_2 e crescimento da planta hospedeira (Vargas & Hungria, 1997; Moreira & Siqueira, 2002; Carvalho *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2005; Zilli *et al.*, 2006), além das características fisiológicas como a capacidade de solubilização de fosfatos (Deshwal *et al.*, 2003; Hara & Oliveira, 2004) e a produção de fitormônios como ácido indol-acético (Bano & Musarrat, 2003; Hameed *et al.*, 2004; Thakuria *et al.*, 2004).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi caracterizar fenotipicamente os isolados de rizóbio, bem como avaliar a eficiência simbiótica dos mesmos em plantas de feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.).

4.5.2. MATERIAL E MÉTODOS

Isolados utilizados

Foram utilizados 20 isolados obtidos da Coleção de Rizóbio do Laboratório de Microbiologia do Solo do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Essas bactérias foram previamente isoladas de solos de terra firme e várzea da região, usando o feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) como planta isca (Vincent, 1970; Xavier *et al.*, 1997). Dentre os isolados, INPA R808, INPA R813, INPA R817, INPA R820, INPA R822, INPA R851, INPA R874, INPA R918, INPA R927, INPA R949, INPA R993, INPA R999 e INPA R1003 ainda não foram identificados. Porém, os isolados INPA R811 (*Bradyrhizobium japonicum*), INPA R814a (*Rhizobium* sp.), INPA R814b (*Rhizobium* sp.), INPA R815 (*Rhizobium* sp.), INPA R901 (*Rhizobium* sp.), INPA R921 (*Rhizobium* sp.) e INPA R980 (*Bradyrhizobium* sp.) foram identificados por meio do seqüenciamento do gene 16S rRNA no CENA (Centro de Energia Nuclear na Agricultura / USP – Campus Piracicaba, SP) (Anexo 3).

Outras seis estirpes-referência foram obtidas da Coleção de Cultura da Embrapa Agrobiologia (Rio de Janeiro, RJ): *B. elkanii* (BR 115 = USDA 76), *B. japonicum* (BR 114 – USDA 06), *Sinorhizobium fredii* (BR 112 = LMG 6217), *R. tropici* IIA (BR 10016 = CFN 299), *R. etli* (BR 10026 = CFN 42) e *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (BR 10052 = LMG 8819).

As bactérias estudadas foram repicadas em placa de Petri contendo meio YMA (Vincent, 1970) e incubadas a 28° C por aproximadamente cinco dias.

Análises Fenotípicas

Caracterização Morfológica

As características morfológicas avaliadas para os isolados nativos e as estirpes-referência foram: tempo de crescimento (1 a 8 dias); diâmetro da colônia, forma, elevação, borda, transparência, aparência, coloração, modificação do pH do meio, aparência, elasticidade e tipo de muco (Vincent, 1970; Hungria & Araújo, 1994; Martins *et al.*, 1997b; Zilli *et al.*, 2000).

Caracterização Fisiológica

Testes de tolerância à acidez e alumínio tóxico

Para este estudo foram utilizados meios YMA com pH 4,5, pH 4,5 + 2,0 cmol_c de AIL⁻¹ e pH 6,5, com quatro repetições. As avaliações foram feitas a cada três dias durante o período de 15 dias segundo o método proposto por Oliveira & Magalhães (1999). De acordo com o crescimento celular, foram dados valores para cada isolado, os quais variaram de 1 (sem crescimento visível após riscagem) a 4 (máximo crescimento), com valores intermediários entre os extremos.

Solubilização de Fosfatos de Cálcio e Alumínio

Foram utilizados dois meios específicos para as bactérias solubilizadoras, sendo um para solubilizadoras de fosfato de cálcio (P-Ca), ajustando-se o pH para 6,5, e outro meio para verificar a solubilização de fosfato de alumínio (P-Al) com pH ajustado para 4,5 (Hara & Oliveira, 2004). As bactérias foram repicadas para cada meio de solubilização, estabelecendo-se cinco colônias por placa com duas placas por isolado. As avaliações foram feitas num período de 15 dias, cujas medidas dos diâmetros (ϕ) do halo de solubilização e da colônia foram mensuradas a cada três dias, utilizando-se paquímetro digital. A partir dessas medidas foram obtidos os índices de solubilização (IS) usando a fórmula: $IS = \phi \text{ halo} / \phi \text{ colônia}$ (Berraquero *et al.*, 1976). Com base nesses índices, as

bactérias foram classificadas como estirpes com baixa ($IS < 2$), média ($2 \leq IS < 4$) e alta solubilização ($IS > 4$).

Produção de AIA

Colônias de 2-3 mm de diâmetro foram transferidas para frascos de Erlenmeyer (150 mL) contendo 25 mL de meio de cultura YM (meio líquido) na ausência e presença de diferentes concentrações de triptofano (10, 25, 50, 100 e 150 mg L⁻¹). Depois de quatro dias de crescimento sobre um agitador rotatório (100 rpm) a 26±2°C, a biomassa bacteriana foi separada por centrifugação (12.000 rpm por 15 minutos). Para as análises colorimétricas de AIA no sobrenadante (Gordon & Weber, 1951) foram utilizadas uma parte do reagente de Salkowski [(FeCl₃ 0,5 M + HClO₄ (35%)] e duas partes do sobrenadante bacteriano. Após a comprovação qualitativa de AIA no sobrenadante (coloração rosa após 25 minutos de reação a 26±2°C), o fitormônio foi quantificado espectrofotometricamente em 530 nm. As concentrações, em µg mL⁻¹, foram calculadas a partir de uma curva padrão construída com AIA.

Análise de agrupamento

As características fenotípicas (morfológicas e fisiológicas) dos isolados não identificados foram comparadas com as das estirpes-referência e aos isolados já identificados.

Os dados fenotípicos obtidos foram transformados em um código binário, de 0 e 1, e submetidos à análise de agrupamento. Um total de 24 parâmetros foi considerado, sendo 12 para as características morfológicas e 12 para as fisiológicas.

Para as características morfológicas foram determinados os seguintes parâmetros: tempo de crescimento (≤ 3 dias, 0; > 3 dias, 1); pH do meio (alcalinizou, 0; acidificou, 1); diâmetro (< 2 mm, 0; ≥ 2 mm, 1), forma (circular, 0; irregular, 1), elevação (elevada, 0; plana, 1), borda (inteira, 0; irregular, 1), transparência (sim, 0; não, 1), aparência (homogênea, 0; heterogênea, 1), cor da colônia (branca, 0; amarela, 1); aparência (homogênea, 0; heterogênea, 1), elasticidade (com, 0; sem, 1) e tipo de muco (viscoso, 0; butírico, 1). Para as características fisiológicas foi utilizada: tolerância à acidez, divididas em dois níveis, pH 4,5 e pH 6,5 (não, 0; sim, 1), tolerância à acidez e ao Al (não, 0; sim,

1), índice de solubilização de P-Ca e P-Al, divididos em três níveis, $IS < 2$, $2 < IS < 4$ e $IS > 4$ (não, 0; sim, 1), produção de AIA, dividido em três níveis, $\leq 100 \mu\text{g mL}^{-1}$, $> 100 < 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, e $\geq 1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (não, 0; sim, 1).

Três dendrogramas de agrupamento foram construídos com base nas características avaliadas, sendo um para as morfológicas, um para as fisiológicas e um para as morfológicas mais as fisiológicas, usando o algoritmo UPGMA e a matriz de similaridade com coeficiente Simple Matching com o programa MVSP (Multi-Variate Statistical Package versão 3.13).

Ensaio de Inoculação

Os isolados estudados foram testados em vasos plásticos com capacidade para 1 kg em casa-de-vegetação no INPA, com solo coletado no Ramal do Brasileirinho, Manaus, AM (pH 4,1 em H_2O ; pH 3,7 em KCl; $3,0 \text{ mg Kg}^{-1}$ de P; $0,12 \text{ cmol}_c \text{ Kg}^{-1}$ de K; $0,12 \text{ cmol}_c \text{ Kg}^{-1}$ de Ca; $0,06 \text{ cmol}_c \text{ Kg}^{-1}$ de Mg; $2,5 \text{ cmol}_c \text{ Kg}^{-1}$ de Al + H; 124 mg Kg^{-1} de Fe; $2,7 \text{ mg Kg}^{-1}$ de Zn; $0,8 \text{ mg Kg}^{-1}$ de Mn), em dois experimentos.

No experimento 1, solos corrigidos (fertilidade e acidez) foram comparados com controles (fertilidade e acidez originais), a fim de avaliar o potencial da simbiose planta-bactéria. O experimento foi adubado com superfosfato triplo (100 kg P ha^{-1}), KCl (80 kg K ha^{-1}) e sulfatos de cálcio ($5 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$) e magnésio ($3 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso com 28 tratamentos e três repetições, constituídos pela inoculação individual dos 20 isolados nativos e das seis estirpes-referência mais dois controles (adubação com N sem inoculação e testemunha sem N e sem inoculação). As plantas foram colhidas em plena floração (45 dias após o plantio), determinando posteriormente a produção de matéria seca da parte aérea (MSPA), radicular (MSR) e total (MST), número (NN) e peso dos nódulos (MSN) (Vincent, 1970). Foi feita ainda a avaliação do estado nutricional das plantas, determinando-se os teores de N na parte aérea (EMBRAPA, 1997).

A eficiência relativa (ER) de cada tratamento foi calculada segundo a fórmula (Bergensen *et al.*, 1971, *apud* Lima *et al.*, 2005):

$$ER = (\text{MSPA inoculada} / \text{MSPA com N}) \times 100$$

em que MSPA inoculada é a matéria seca da parte aérea da planta com inoculação e MSPA com N é a matéria seca da parte aérea da planta com N mineral.

A eficiência simbiótica (ES) foi calculada por meio da fórmula abaixo (Brockwell *et al.*, 1966, *apud* Sá, 2001):

$$ES = [(N_{\text{total fixado}} - N_{\text{total TS/N}}) / (N_{\text{total TC/N}} - N_{\text{total TS/N}}) \times 100]$$

em que $N_{\text{total fixado}}$ = Nitrogênio total do tratamento; $N_{\text{total TS/N}}$ = Nitrogênio total da testemunha sem nitrogênio; $N_{\text{total TC/N}}$ = Nitrogênio total da testemunha nitrogenada.

No experimento 2, os isolados de rizóbio positivos para a solubilização de fosfatos em meio de cultura foram testados em solos adubados com fosfato de rocha ($100 \text{ mg kg}^{-1} \text{ P}_2\text{O}_5$), KCl (80 kg K ha^{-1}) e sulfatos de cálcio ($5 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$) e magnésio ($3 \text{ cmol}_c \text{ kg}^{-1}$). No fosfato de rocha, os teores de P_2O_5 total e solúvel em ácido cítrico (2%) foram 9,4% e 4,3%, respectivamente. Nesse estudo foram utilizados 14 tratamentos, sendo 12 isolados e dois controles (adubação com N e fosfato de rocha, e testemunha sem inoculação e adubação). As plantas foram colhidas aos 45 dias de crescimento, determinando-se a produção de MST e NN. Foi feita ainda a análise do teor de P na parte aérea (EMBRAPA, 1997). A eficiência de utilização de P (EFU-P) nas plantas de caupi foi calculada pela seguinte fórmula (Sidiqi & Glass, 1981, *apud* Rodrigues *et al.*, 2003):

$$EFU-P = [(\text{matéria seca})^2 / (\text{conteúdo do nutriente})]$$

Em ambos os experimentos, o nitrogênio foi aplicado na forma de uréia (100 kg ha^{-1}) em 3 parcelas, a cada 15 dias. Foi utilizado como planta teste o feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. (Walp.)) cv. IPEAN V-69. Os isolados utilizados, após crescimento em meio YMA por cinco dias, foram suspensos individualmente em solução salina ($0,2\% \text{ MgSO}_4$) e cada uma dessas suspensões (de 10^8 células por mL) foi adicionada às sementes. Foram semeadas 10 sementes por vaso, após serem desinfetadas superficialmente com etanol 95% por um minuto, hipoclorito 1% por quatro minutos e lavadas várias vezes com água destilada e esterilizada, em seguida foi realizada a inoculação. Após uma semana foi

realizado o desbaste deixando três plantas por vaso, totalizando nove plantas por tratamento.

Os dados foram submetidos à análise de variância com teste F, e as médias dos tratamentos comparados pelo teste de Tukey a 5% utilizando o programa STATISTICA 6.0.

4.5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tolerância à acidez e alumínio tóxico

Com base na escala de valores para a avaliação do crescimento observou-se que todos os isolados e estirpes-referência apresentaram crescimento alto, acima de 3,06 (dados não mostrados) no meio com pH 6,5, apresentando o mesmo comportamento no pH 4,5 aos 15 dias de avaliação. No tratamento com pH 4,5 + Al, 20 das 26 bactérias estudadas apresentaram crescimento alto, o que permite inferir que são tolerantes à acidez e Al tóxico (Tabela 1). Para as bactérias que apresentaram baixo crescimento, foi observado que o alumínio foi mais limitante que a acidez (dados não mostrados). Resultados semelhantes foram reportados por Oliveira & Magalhães (1999) e Hara & Oliveira (2004; 2005), evidenciando variações na tolerância à acidez e alumínio tóxico de isolados de rizóbio.

Solubilização de Fosfato de Cálcio e Alumínio

Das 26 bactérias estudadas, somente 12 solubilizaram o P-Ca, sendo que apenas o isolado INPA R813 apresentou alto índice de solubilização final (I.S. > 4,0), e o isolado INPA R820 apresentou índice de solubilização médio (Tabela 1). Quanto à solubilização de P-Al, somente nove apresentaram a capacidade de solubilização (Tabela 1), sendo que todos apresentaram índice de solubilização baixo (IS < 2,0). Todas as bactérias que solubilizaram P-Al também solubilizaram P-Ca. Estes resultados corroboram com os reportados por Hara & Oliveira (2004). Porém, Toro *et al.* (1996) e Silva Filho & Vidor (2000) identificaram uma baixa ocorrência de isolados que solubilizaram ambos os fosfatos. Segundo Hara & Oliveira (2005), a capacidade de solubilização de P-Al pode

estar relacionada ao fato de que o alumínio e o fosfato ligado a ele predominam nos solos da região.

Produção de AIA

Houve grande variação nas concentrações de AIA produzidas pelos isolados e as estirpes-referência de rizóbio. Todos os isolados e as estirpes-referência testadas em meio de cultura suplementado com diferentes concentrações de L-triptofano sintetizaram AIA. Porém, considerando a média de produção de AIA de todos os isolados (dados não mostrados), quatro apresentaram produção de AIA acima de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, 12 apresentaram produção acima de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e 13 apresentaram produção de AIA abaixo de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 1). Resultados semelhantes foram encontrados por Antoun *et al.* (1998) e Hameed *et al.* (2004) com isolados de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* em meio de cultura suplementado com L-triptofano.

Tabela 1: Tolerância à acidez e Al tóxico, solubilização de fosfatos, produção de AIA por isolados de rizóbio e estirpes-referência.

Isolados / Estirpes	Tolerância à acidez e Al ⁽¹⁾			Solubilização de fosfato ⁽²⁾		Produção de AIA ⁽³⁾
	pH 4,5	pH 4,5 + Al	pH 6,5	P-Ca	P-Al	
INPA R808	+	+	+	+	+	+
INPA R811	+	+	+	-	-	+
INPA R813	+	+	+	+++	-	++
INPA R814a	+	+	+	+	+	+
INPA R814b	+	+	+	+	+	+
INPA R815	+	+	+	+	-	++
INPA R817	+	+	+	+	+	+++
INPA R820	+	+	+	++	+	++
INPA R822	+	+	+	+	-	++
INPA R851	+	+	+	+	+	++
INPA R874	+	-	+	-	-	++
INPA R901	+	+	+	-	-	+
INPA R918	+	+	+	+	+	+++
INPA R921	+	+	+	-	-	++
INPA R927	+	-	+	-	-	+++
INPA R949	+	-	+	-	-	+++
INPA R980	+	-	+	+	+	+
INPA R993	+	+	+	-	-	++
INPA R999	+	-	+	+	+	++
INPA R1003	+	+	+	-	-	++
BR 115	+	+	+	-	-	+
BR 114	+	+	+	-	-	+
BR 112	+	-	+	-	-	++
BR 10016	+	+	+	-	-	+
BR 10026	+	+	+	-	-	++
BR 10052	+	+	+	-	-	+

INPA R, isolados da coleção do INPA; BR, estirpes da coleção da Embrapa Arobiologia.

⁽¹⁾ +, reação positiva (média de crescimento acima de 3,06); -, reação negativa (média de crescimento abaixo de 3,06).

⁽²⁾ +, IS < 2 (baixo); ++, 2 < IS < 4 (médio); +++, IS > 4 (alto).

⁽³⁾ +, produção de AIA abaixo de 100 µg mL⁻¹; ++, produção de AIA acima de 100 µg mL⁻¹; +++, produção de AIA acima de 1000 µg mL⁻¹.

Caracterização fenotípica

As diferenças entre os isolados foram verificadas usando parâmetros morfológicos e fisiológicos, onde nos parâmetros morfológicos, foram caracterizados por um crescimento rápido (14 isolados) e lento (6 isolados) e reação ácida em meio YMA na maioria (19 isolados) (dados não mostrados). Onze isolados formaram colônias < 2 mm de diâmetro, 17 com coloração branca (dados não mostrados). Quanto ao tipo de muco 18 foram caracterizados como viscoso e dois como butírico (dados não mostrados).

Para as características morfológicas dos isolados e das estirpes-referência, foi possível agrupar os isolados que apresentam características semelhantes em cinco grupos, conforme Figura 1 e Tabela 2. O grupo 1 foi formado por isolados e a estirpe-referência BR 115 (*Bradyrhizobium elkanii*) com similaridade de 89%. O grupo 2 apresentou similaridade de 84% entre os isolados e as estirpes-referência BR 10026 (*Rhizobium etli*), BR 112 (*Sinorhizobium fredii*), BR 10016 (*R. tropici*), BR 114 (*B. japonicum*) e BR 10052 (*R. leguminosarum* bv. *phaseoli*). Os grupos 3, 4 e 5 apresentaram índices de similaridade de 78, 75 e 83%, respectivamente, não se agrupando com nenhuma estirpe-referência. Porém, o grupo 4 foi formado pelos isolados já identificados (INPA R811, INPA R814a e INPA R814b). Para as 12 características morfológicas estudadas, foi possível observar índice de similaridade de 100% entre o isolado INPA R851 e BR 10026 e o isolado INPA R927 e as estirpes-referência BR 10016 e BR 112, encontrados no grupo 2.

Quanto às características fisiológicas, foram definidos três grupos (Tabela 3) no dendrograma (Figura 2). O grupo 1 apresentou similaridade entre os isolados e as estirpes-referências BR 10016, BR 114, BR 115 e BR 10052 de 81%, sendo todos os isolados deste grupo já identificados pelo seqüenciamento. O grupo 2 formado por isolados e as estirpes-referência BR 10026 e BR 112 apresentou similaridade de 78%, aproximadamente, com a presença dos isolados INPA R921 e INPA R815 já identificados pelo seqüenciamento. O grupo 3, com similaridade de 75%, não se agrupou com estirpes-referência nem isolados já identificados. Para as características fenotípicas foi encontrado índice de similaridade de 100% entre o isolado INPA R874 e a estirpe-referência BR 112, pertencentes ao grupo 2.

Considerando as características morfológicas mais as fisiológicas, foi construído um dendrograma onde foram formados 3 grupos (Tabela 4) (Figura 3), considerando 24 parâmetros. O grupo 1 foi formado por isolados e as estirpes-referência BR 10016, BR 10052, BR 114 e BR 115, com similaridade de 74%, aproximadamente, onde se agrupou

os isolados já identificados INPA R980, INPA R814a, INPA R814b, INPA R811 e INPA R901. O grupo 2 com similaridade de 80% entre os isolados e as estirpes-referência BR 10026 e BR 112, com a presença do isolado INPA R815 já identificado. O grupo três apresentou similaridade de 83% com o isolado já identificado INPA R921, não apresentando similaridade com estirpes-referência. Neste dendrograma foi possível encontrar índice de similaridade de 92% entre o isolado INPA R851 e a estirpe-referência BR 10026.

Os isolados não identificados apresentaram características morfológicas distribuídas nos gêneros de estirpes-referência e isolados já identificados conforme Moreira & Pereira (2001). Este resultado confirma a baixa especificidade do feijão caupi e concorda com aqueles encontrados por Martins *et al.* (1997a,b), Pereira (2000), Lima *et al.* (2005); Melloni *et al.* (2006) e Soares *et al.* (2006), avaliando a diversidade fenotípica de rizóbios em diversos ecossistemas, utilizando o feijão caupi como planta isca.

A caracterização fenotípica possibilitou um maior conhecimento da população de rizóbio isolados de solos da Amazônia, até então pouco estudada e o agrupamento facilita o desenvolvimento das etapas seguintes de confirmação da nodulação e seleção de rizóbio eficiente para a fixação de N₂ em diferentes variedades de feijão caupi.

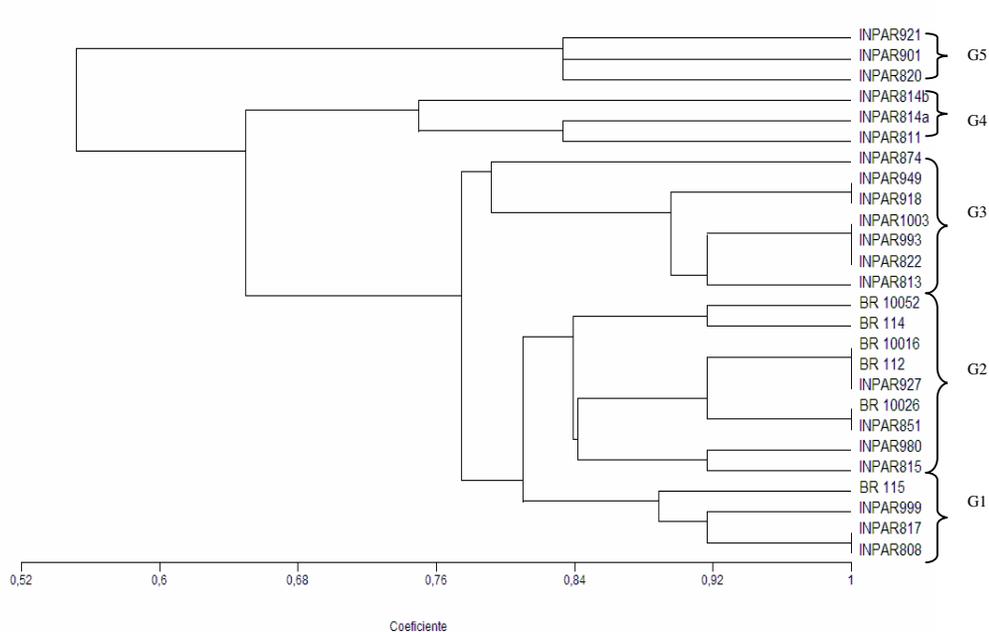


Figura 1: Dendrograma mostrando similaridade dos isolados estudados e das estirpes-referência, considerando 12 características morfológicas (método UPGMA e coeficiente de Simple Matching).

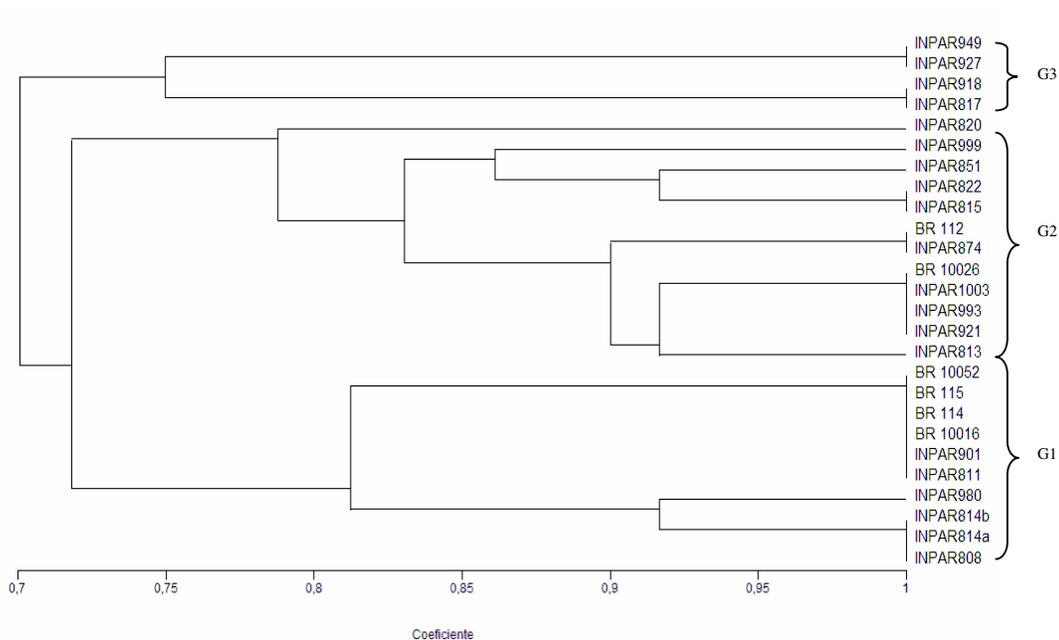


Figura 2: Dendrograma mostrando similaridade dos isolados estudados e das estirpes-referência, considerando 12 características fenotípicas (método UPGMA e coeficiente de Simple Matching).

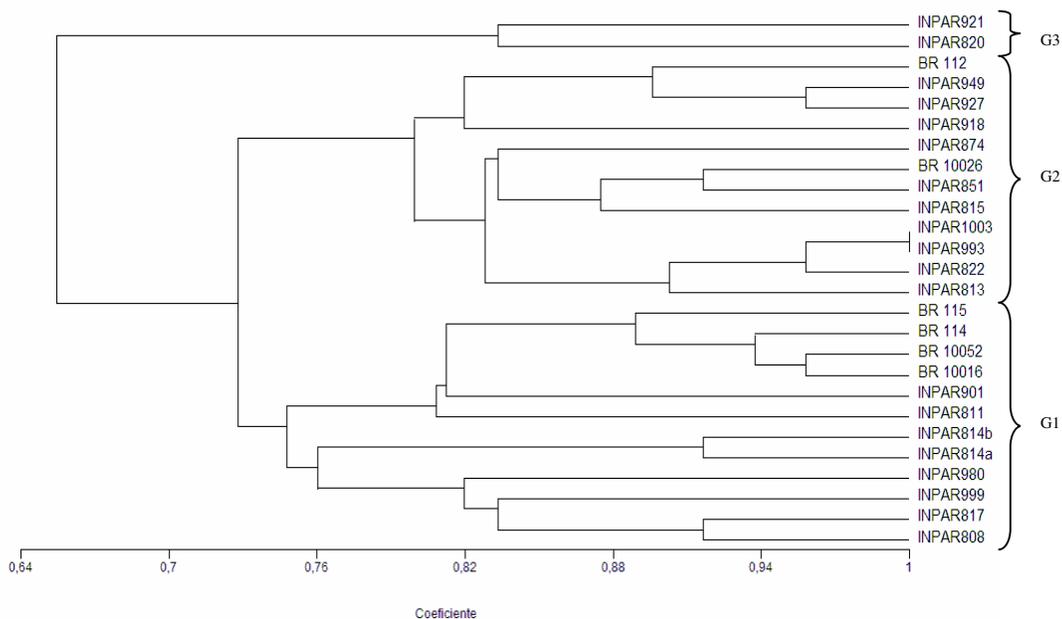


Figura 3: Dendrograma mostrando similaridade dos isolados estudados e das estirpes-referência, considerando 12 características morfológicas mais 12 características fenotípicas (método UPGMA e coeficiente de Simple Matching).

Tabela 2: Grupos dos isolados e estirpes-referência de rizóbio associados a feijão caupi de acordo com a caracterização morfológica (Figura 1).

Grupo	Isolados	Estirpes-referência
G1	INPA R808, INPA R817 e INPA R999	BR 115 (<i>Bradyrhizobium elkanii</i>)
G2	INPA R815, INPA R980, INPA R851 e INPA R927	BR 10026 (<i>Rhizobium etli</i>), BR 112 (<i>Sinorhizobium fredii</i>), BR 10016 (<i>R. tropici</i>), BR 114 (<i>B. japonicum</i>) e BR 10052 (<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>)
G3	INPA R813, INPA R822, INPA R993, INPA R1003, INPA R918, INPA R949 e INPA R874	
G4	INPA R811, INPA R814a e INPA R814b	
G5	INPA R820, INPA R901 e INPA R921	

Tabela 3: Grupos dos isolados e estirpes-referência de rizóbio associados a feijão caupi de acordo com a caracterização fisiológicas (Figura 2).

Grupo	Isolados	Estirpes-referência
G1	INPA R808, INPA R814a, INPA R814b, INPA R980, INPA R811 e INPA R901	BR 10016 (<i>Rhizobium tropici</i>), BR 114 (<i>Bradyrhizobium japonicum</i>), BR 115 (<i>B. elkanii</i>) e BR 10052 (<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>)
G2	INPA R813, INPA R921, INPA R993, INPA R1003, INPA R874, INPA R815, INPA R822, INPA R851, INPA R999 e INPA R820	BR 10026 (<i>R. etli</i>) e BR 112 (<i>Sinorhizobium fredii</i>)
G3	INPA R817, INPA R918, INPA R927 e INPA R949	

Tabela 4: Grupos dos isolados e estirpes-referência de rizóbio associados a feijão caupi de acordo com a caracterização morfológicas mais as fisiológicas (Figura 3).

Grupo	Isolados	Estirpes-referência
G1	INPA R808, INPA R817, INPA R999, INPA R980, INPA R814a, INPA R814b, INPA R811 e INPA R901	BR 10016 (<i>Rhizobium tropici</i>), BR 10052 (<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>), BR 114 (<i>Bradyrhizobium japonicum</i>) e BR 115 (<i>B. elkanii</i>)
G2	INPA R813, INPA R822, INPA R993, INPA R1003, INPA R815, INPA R851, INPA R874, INPA R918, INPA R927 e INPA R949	BR 10026 (<i>R. etli</i>) e BR 112 (<i>Sinorhizobium fredii</i>)
G3	INPA R820 e INPA R921	

Eficiência Relativa e Simbiótica

Todos os 20 isolados estudados no experimento 1 aumentaram significativamente o crescimento das plantas em relação à testemunha (Tabela 5). Entre esses, INPA R808, INPA R811, INPA R814a, INPA R815, INPA R817, INPA R820, INPA R822, INPA R874, INPA R901, INPA R921, INPA R980 e INPA R999 proporcionaram as maiores produções de matéria seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR) e total (MST), porém sem diferirem significativamente do tratamento adubado (com nitrogênio) e as estirpes-referência BR 114 e BR 112. Esses isolados exibiram também número de nódulos (NN), similares aos registrados para as estirpes-referência BR 112 e BR 10016. Quanto à massa seca de nódulos (MSN), os isolados INPA R811, INPA R814a, INPA R815, INPA R820, INPA R817 e INPA R901 mostraram valores significativamente superiores às estirpes-referência. Não foi verificada a presença de nódulos nos tratamentos testemunha e adubado (Tabela 5).

Os isolados que aumentaram significativamente a MSPA, MSR e MST das plantas mostraram eficiência relativa (ER) superiores em relação às demais bactérias avaliadas (nativas e estirpes-referência), porém similares ao tratamento adubado com uréia (Tabela 5). Similarmente, o mesmo foi observado para o acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) usando-se os isolados INPA R817, INPA R921 e INPA R999. Essas bactérias também exibiram os maiores valores de eficiência simbiótica (ES), com percentuais próximos de 80% (Figura 4). Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Carvalho *et al.* (2005), estudando a eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* sp. recomendadas para a cultura da soja. De acordo com Vinuesa *et al.* (1998), isolados de uma mesma espécie podem diferir significativamente quanto à eficiência de fixação de nitrogênio, bem como na sua habilidade para ocupar nódulos.

Esses dados mostram que, apesar da pequena diferença entre MSN das bactérias com os melhores desempenhos simbióticos, os parâmetros acúmulo de N total, produção de matéria seca, ER e ES podem ser usados como bons indicadores da potencialidade de uso dos isolados INPA R808, INPA R811, INPA R814a, INPA R815, INPA R817, INPA R820, INPA R822, INPA R874, INPA R901, INPA R921, INPA R980 e INPA R999 como inoculantes para o feijão caupi. Vale mencionar que os valores médios desses parâmetros foram estatisticamente superiores aos registrados para as estirpes-referência.

Os isolados que exibiram os maiores valores para MSPA, MSR, MST, NN, MSN, ER, ANPA e ES foram iguais ou superiores aos valores encontrados para as estirpes-referência. Resultados semelhantes foram reportados em outros trabalhos, como Martins *et al.* (1997a), Pereira (2000), Motta (2002), Lacerda *et al.* (2004), Lima *et al.* (2005), Soares *et al.* (2006) e Zilli *et al.* (2006), que observaram uma menor eficiência simbiótica das estirpes-referência em relação às estirpes isoladas de nódulos de feijão caupi.

Associando-se os resultados de eficiência simbiótica e ocupação nodular, observou-se que os isolados que apresentaram bom desempenho são potenciais inoculantes para o feijão caupi em solos da Amazônia. Contudo, existe a necessidade da avaliação da contribuição desses isolados para a fixação do N₂ e para a produtividade de caupi através de testes agronômicos em condições de campo.

Tabela 5: Matéria seca da parte aérea (MSPA), raiz (MSR), total (MST), número de nódulos (NN), matéria seca dos nódulos (MSN), eficiência relativa (ER), acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) em feijão caupi inoculado com rizóbio. Experimento 1.⁽¹⁾

Isolados/estirpes	MSPA (g)	MSR (g)	MST (g)	NN ⁽²⁾	MSN (mg) ⁽²⁾	ER (%)	ANPA(g.planta ⁻¹)
INPA R808	3,46 abc	0,56 cdefgh	4,02 abcd	38 ab	253 bcde	85,35 abcd	34,63 bcd
INPA R811	3,66 a	0,81 ab	4,47 ab	35 abc	293 abc	94,83 ab	34,01 bcde
INPA R813	2,09 fghi	0,36 fghij	2,45 hi	16 cde	76 hij	51,87 hi	30,29 def
INPA R814a	3,42 abcd	0,80 ab	4,22 abc	39 ab	280 abcd	89,59 abc	35,55 bcd
INPA R814b	1,78 hi	0,59 bcde	2,37 hi	12 de	52 ij	50,46 hi	32,33 cde
INPA R815	3,90 a	0,80 ab	4,70 a	45 ab	301 ab	99,71 a	34,47 bcd
INPA R817	3,40 abcd	0,52 defghi	3,92 abcd	40 ab	298 ab	83,30 abcd	37,90 ab
INPA R820	3,49 abc	0,80 ab	4,29 abc	40 ab	286 abcd	91,22 abc	37,22 bc
INPA R822	3,72 a	0,56 cdefg	4,28 abc	43 ab	228 bcdef	90,87 abc	34,79 bcd
INPA R851	2,13 fghi	0,35 ghij	2,48 ghi	10 e	49 ij	52,58 hi	28,49 efg
INPA R874	3,47 abc	0,55 cdefgh	4,02 abcd	45 ab	219 bcdef	85,42 abcd	35,71 bcd
INPA R901	3,55 ab	0,75 abc	4,30 abc	54 a	342 a	91,44 abc	36,18 bc
INPA R918	2,00 ghi	0,29 ij	2,29 hi	16 de	86 hij	48,76 hi	28,07 fg
INPA R921	3,67 a	0,79 ab	4,47 ab	39 ab	206 cdefg	94,90 ab	39,17 ab
INPA R927	2,26 efghi	0,37 efghij	2,63 ghi	11 de	34 j	55,77 ghi	24,40 gh
INPA R949	2,24 efghi	0,40 efghij	2,64 ghi	9 e	27 j	56,12 ghi	23,69 gh
INPA R980	3,65 a	0,77 abc	4,42 ab	37 ab	229 bcdef	93,84 ab	32,01 cdef
INPA R993	2,00 ghi	0,33 hij	2,33 hi	9 e	40 ij	49,47 hi	24,42 gh
INPA R999	3,51 abc	0,58 bcdef	4,09 abc	53 a	235 bcde	86,90 abcd	37,57 abc
INPA R1003	2,39 efgh	0,46 defghij	2,85 fghi	10 e	35 j	60,51 fghi	18,87 hi
BR 115	1,59 i	0,47 defghij	2,06 i	14 de	73 hij	43,73 i	34,52 bcd
BR 114	2,84 cde	0,66 abcd	3,50 cdef	30 bcd	144 fgh	74,31 cdef	34,83 bcd
BR 112	2,93 bcde	0,76 abc	3,69 bcde	41 ab	185 efg	78,56 bcde	36,87 bc
BR 10016	2,77 def	0,54 cdefgh	3,31 defg	42 ab	200 defg	70,20 defg	34,31 bcd
BR 10026	2,52 efg	0,46 defghij	2,98 efgh	25 bcde	91 hij	63,41 efgh	32,29 cdef
BR 10052	2,58 efg	0,47 defghij	3,05 efgh	28 bcde	123 ghi	64,83 efgh	35,00 bcd
Testemunha	0,57 j	0,25 j	0,81 j	0 f	0 k	17,32 j	17,53 i
Adubado	3,85 a	0,86 a	4,71 a	0 f	0 k	100 a	42,90 a
CV (%) ⁽³⁾	13,8	22,8	17,4	21,5	26,2	21,1	5,5

⁽¹⁾Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%. ⁽²⁾Dados transformados por raiz de X + 0,5. ⁽³⁾Coefficiente de Variação.

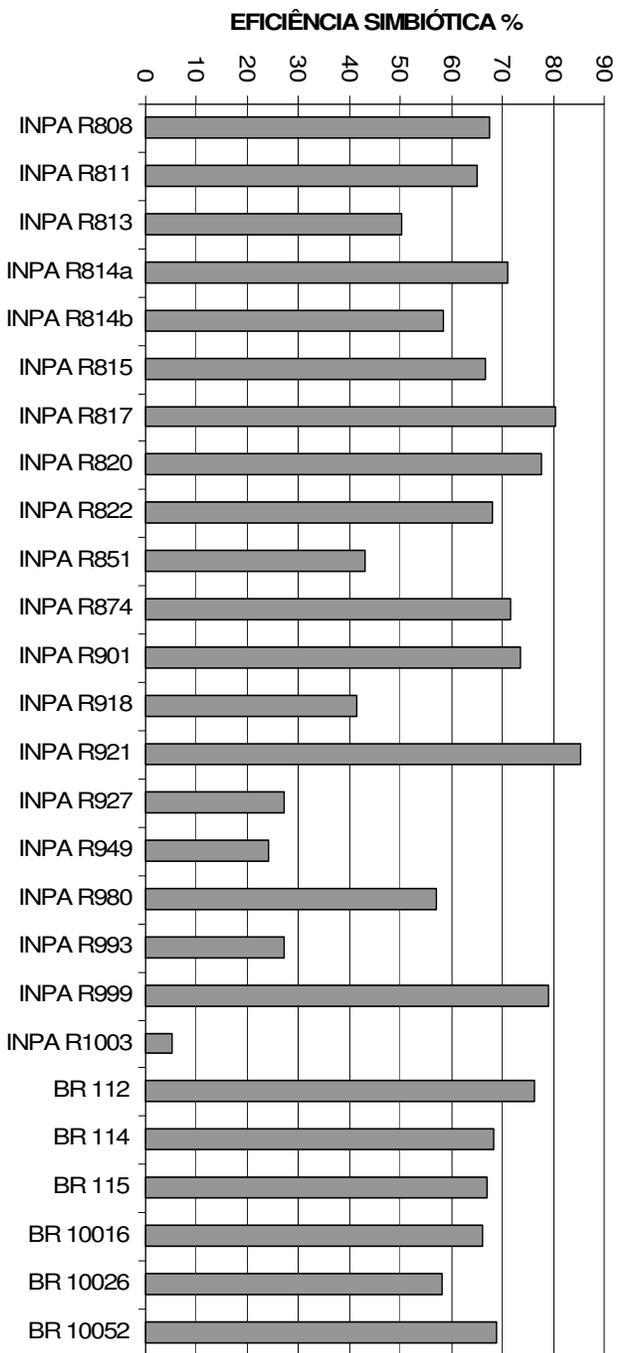


Figura 4: Índices de eficiência simbiótica dos tratamentos inoculados com isolados e estirpes-referências de rizóbios, em relação ao N total acumulado em feijão caupi, 45 dias após o plantio. Experimento 1.

Eficiência de uso de fósforo (EFU-P)

Os resultados do experimento 2, com adubação de fosfato de rocha e inoculação dos isolados solubilizadores de fosfatos encontram-se na Tabela 1. Quando comparado à testemunha e aos demais isolados, os maiores teores de P na parte aérea das plantas foram obtidos com a inoculação das bactérias INPA R808, INPA R814a, INPA R815, INPA R817, INPA R820, INPA R822, INPA R980 e INPA R999, porém sem diferir estatisticamente do tratamento com adubação (Tabela 6). Nesse estudo, os teores de P na parte aérea estão dentro do nível adequado para cultura do feijão caupi, que segundo Malavolta *et al.* (1997) varia entre 1,2 e 1,5 g kg⁻¹.

Comparada à testemunha, a eficiência de utilização de P (EFU-P) nas plantas de feijão caupi aumentou com a inoculação (Tabela 6). Houve variação significativa na EFU-P entre as bactérias avaliadas, com destaque para os isolados INPA R820 e INPA R980, que proporcionaram incrementos na ordem de 770% em relação à testemunha. Esses resultados indicam a importância não somente da adubação do fosfato de rocha, mas também do rizóbio na disponibilidade de P às plantas. Isso decorre da capacidade das bactérias em solubilizar fosfatos de baixa solubilidade, como é o caso do fosfato de rocha. Estudos anteriores mostraram que bactérias com essa habilidade contribuem significativamente com o crescimento das plantas (Cattelan *et al.*, 1999; Whitelaw, 2000; Silva Filho *et al.*, 2002). Um grande número de estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* é capaz de solubilizar fosfatos orgânicos e inorgânicos (Halder & Chakrabarty, 1993; Antoun *et al.*, 1998). Abd-Alla (1994) mostrou que a estirpe TAL 1236 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* contribuiu significativamente para a liberação de fósforo. Em estudo de campo, Chabot *et al.* (1996) concluíram que a solubilização de fosfatos pela estirpe de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* foi um importante mecanismo para promoção do crescimento de milho e alface, em solos de média e alta fertilidade. A capacidade de solubilizar fosfatos insolúveis e de promover o crescimento das plantas torna imprescindível a utilização dessas bactérias como biofertilizantes para cultivos agrícolas, tanto para leguminosas como para não leguminosas. Há a necessidade de se estudar mais ainda o uso dessas bactérias (rizóbio) como inoculantes, enfocando os mecanismos de sobrevivência em solos da região amazônica, para que se possa selecionar isolados que possam solubilizar o fósforo insolúvel, além evidentemente de fixar o N atmosférico.

Tabela 6: Matéria seca total (MST), número de nódulos (NN) fósforo total na parte aérea (P total) e eficiência de utilização de fósforo (EFU-P) em feijão caupi inoculado com rizóbio. Experimento 2. ⁽¹⁾

Isolados	MST (g)	NN ⁽³⁾	P total (g kg ⁻¹)	EFU-P (g ² g ⁻¹)
INPA R808	3,55 ab	43 a	1,48 ab	8,60 abcd
INPA R813	2,58 c	16 c	1,07 d	6,41 cde
INPA R814a	3,74 a	45 a	1,44 abc	9,79 abc
INPA R814b	2,81 bc	14 c	1,12 cd	7,29 bcd
INPA R815	3,63 ab	55 a	1,63 a	8,26 abcd
INPA R817	3,80 a	46 a	1,42 abc	10,22 abc
INPA R820	3,87 a	55 a	1,17 bcd	12,86 a
INPA R822	3,70 a	42 a	1,49 ab	9,32 abcd
INPA R851	2,58 c	9 c	1,0 d	6,82 bcd
INPA R918	2,20 c	18 bc	1,04 d	4,67 de
INPA R980	3,99 a	41 ab	1,25 bcd	12,81 a
INPA R999	3,89 a	46 a	1,58 a	9,59 abcd
Testemunha	1,04 d	0 d	0,67 e	1,66 e
Adubado	4,33 a	0 d	1,65 a	11,50 ab
C.V. ⁽²⁾	8,40	14, 20	8,53	19,36

⁽¹⁾ Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste Tukey a 5%.

⁽²⁾ Coeficiente de variação.

⁽³⁾ Dados transformados por raiz de $X + 0,5$.

4.5.4. CONCLUSÕES

1) Houve grande diversidade entre os isolados quanto às suas características morfológicas e fisiológicas.

2) Os isolados INPA R808, INPA R811, INPA R814a, INPA R815, INPA R817, INPA R820, INPA R822, INPA R874, INPA R901, INPA R921, INPA R980 e INPA R999 são potenciais inoculantes para o caupi, em razão do bom desempenho quanto à eficiência-relativa, simbiótica e nodulação.

3) Os isolados INPA R808, INPA R814a, INPA R815, INPA R817, INPA R820, INPA R822, INPA R980 e INPA R999 proporcionaram maiores teores de P na parte aérea, porém os isolados INPA R820 e INPA R980 apresentaram melhor eficiência de utilização de P (EFU-P), podendo agir como promotores do crescimento de plantas leguminosas e não leguminosas.

4.6. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE RIZÓBIO ISOLADOS DE SOLOS NA AMAZÔNIA BASEADA NA TÉCNICA DE PCR-RFLP

RESUMO

Os estudos de diversidade e taxonomia de bactérias fixadoras de nitrogênio tiveram grande evolução nos últimos anos, especialmente devido às metodologias moleculares. Porém, poucas são as informações referentes à caracterização molecular de rizóbios nativos da Amazônia. Baseado nisso, o presente estudo visou caracterizar geneticamente os isolados de rizóbio nativos da Amazônia. A caracterização genética das bactérias foram determinadas usando o método PCR-RFLP dos genes ribossomais 16S rRNA e as enzimas de restrição *Hinfl*, *MspI*, e *MboI*. A análise incluiu 20 isolados nativos da Amazônia e dez estirpes-referência de diferentes origens. Os resultados indicaram uma grande variabilidade genética com a formação de oito grupos em um dendrograma com um nível de similaridade superior a 50%. Vários grupos genéticos não se agrupam com as estirpes-referências e os isolados já identificados pelo seqüenciamento do gene 16S rRNA, havendo uma grande possibilidade da existência de novas espécies no grupo de isolados estudados. O dendrograma derivado de perfis de PCR-RFLP mostrou que todos os isolados nativos agrupados com os já identificados e com as estirpes-referência, com nível de similaridade maior que 50%, podem ser divididos dentro dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*.

PALAVRAS CHAVES: Diversidade genética, Ecologia microbiana, Diversidade microbiana.

GENETIC CHARACTERIZATION OF RHIZOBIA ISOLATED FROM AMAZONIAN SOILS BASED ON THE TECHNIQUE OF PCR-RFLP

ABSTRACT

The studies of the diversity and taxonomy of fixing nitrogen bacteria presented a great evolution in recent years especially due to the molecular methodologies. However, little is the referring information to the molecular characterization of native rhizobia of the Amazonian. Based on that, the present study sought to characterize the isolated of native rhizobia of the Amazonian. The genetic characterization of bacteria had been determined using method PCR-RFLP of the ribosome genes 16S rRNA and the restriction enzymes *Hinf*I, *Msp*I, and *Mbo*I. The analysis included 20 indigenous Amazonian isolates and ten reference strains of different origins. The results indicated a great genetic variability with the formation of eight groups in one dendrogram with a level of similarity superior to 50%. Various genetic groups did not grouped with the references strains and the isolates ones already identified by sequencing the gene 16S rRNA, hading a great possibility of the existence of new species in the group of isolates studied. The dendrogram derived from PCR-RFLP profiles showed that all the indigenous isolates grouped with the ones already identified and the reference strains, with a level of similarity bigger than 50%, can be divided into the two genders, *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*.

KEY WORDS: Genetic diversity, Microbial diversity, Microbial ecology.

4.6.1 INTRODUÇÃO

O estudo da biodiversidade dentro do grupo de bactérias fixadoras de nitrogênio, especialmente em regiões tropicais, além de buscar entender suas complexas relações ecológicas e evolucionárias, envolve a procura de genótipos tolerantes aos diferentes fatores estressantes ambientais, presentes nessas áreas e limitantes a esta simbiose, visando o manejo mais eficiente desta interação (Straliotto & Rumjanek, 1999a). Os estudos taxonômico e filogenético são necessários para estruturar a biodiversidade do rizóbio presente no solo, facilitar a comunicação entre os cientistas e buscar um maior entendimento da biologia e evolução desta simbiose, com importantes aplicações práticas. A identificação e a caracterização de estirpes de rizóbio têm sido feitas, tradicionalmente, baseadas nos resultados morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e simbióticos. Nos últimos anos, porém, as técnicas de biologia molecular vêm ganhando espaço crescente nos estudos taxonômicos, competitividade e ecologia de rizóbio.

O advento dos métodos moleculares baseados nos estudos do genoma bacteriano constituiu-se numa fonte abundante de dados para rizóbio (Teixeira, 1997, 2000; Teixeira *et al.*, 1998). A taxonomia das bactérias fixadoras de nitrogênio, isoladas em diferentes ecossistemas, em geral tem sofrido uma revisão substancial, devido aos métodos moleculares de análise filogenética (Lafay & Burdon, 1998; Chen *et al.*, 2000; Oliveira, *et al.*, 2002; McInnes *et al.*, 2004; Grange & Hungria, 2004). Os dados levantados nos estudos genéticos de populações dos diferentes gêneros de rizóbio indicam que há um alto grau de diversidade genética deste grupo (Sharma *et al.*, 2002; Tamimi, 2002; Sikora & Redzepovic, 2003).

Os maiores avanços na utilização de técnicas de biologia molecular estão sendo obtidos pela comparação das seqüências de nucleotídeos do DNA, em especial a região que codifica o 16S rRNA, considerado conservado entre as bactérias, mas ao mesmo tempo, suficientemente variável e com uma quantidade de informações capazes de revelar, claramente, as relações filogenéticas entre as espécies (Weisburg *et al.*, 1991 apud Chueire *et al.*, 2000). Os estudos de filogenia também se beneficiaram pela técnica de PCR (“Polymerase Chain Reaction”, ou seja, análise pela reação em cadeia da polimerase), que permite a amplificação de seqüências definidas do DNA (Saiki *et al.*, 1988 apud Chueire *et al.*, 2000) e que também facilitou as análises da molécula do 16S rRNA de bactérias da família *Rhizobiaceae* (McInroy *et al.*, 1999; Segundo *et al.*, 1999). O custo do

seqüenciamento de genes, porém, é elevado e a técnica não está disponível em todos os laboratórios. Assim, outras variações e combinações de métodos estão sendo utilizadas para verificar a posição taxonômica das bactérias e, alguns, mostram boa correlação com o seqüenciamento do 16S rRNA. Destaca-se, entres esses métodos, a reação de PCR associada à metodologia de RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”, polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição), em geral, com ampliações de regiões de genes cromossômicos conservados, como o 16S rRNA. Os fragmentos amplificados são digeridos por enzimas de restrição que reconheçam de 4 a 5 bases (Laguerre *et al.*, 1996; Terefework *et al.*, 1998; Germano *et al.*, 2003).

A identificação das funções bacterianas é praticável, mas é muito mais difícil investigar as funções das espécies e suas possíveis relações. O desafio à frente é identificar o nível de diversidade bacteriana, a composição das espécies e sua distribuição para a manutenção da flexibilidade e tolerância a estresses. A importância da diversidade bacteriana no solo e seu papel nos ecossistemas necessitam, ainda, ser profundamente compreendidos.

Poucas são as informações referentes à caracterização molecular de rizóbios nativos da Amazônia em função da escassez de estudos dessa natureza na região. Assim, este estudo teve, por objetivo, caracterizar geneticamente rizóbios isolados de nódulos de feijão caupi obtidos de amostras de solos da Amazônia, através da técnica de PCR-RFLP dos genes ribossomais 16S rRNA.

4.6.2 MATERIAL E MÉTODOS

Isolados utilizados

Foram utilizados 20 isolados obtidos da Coleção de Rizóbio do Laboratório de Microbiologia do Solo do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) (Tabela 1). Essas bactérias foram previamente isoladas de solos de terra firme e várzea da região, usando o feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) como planta isca (Vincent, 1970; Xavier *et al.*, 1997). Outras 10 estirpes-referência foram obtidas da Coleção de Cultura da Embrapa Agrobiologia (Seropédica, RJ) (Tabela 1).

As bactérias foram repicadas em placa de Petri contendo meio YMA (Vincent, 1970) e incubadas a 28° C por aproximadamente cinco dias.

Tabela 1: Local e amostras de solos coletadas em diferentes regiões no Amazonas em áreas com e sem cultivo, utilizadas como fonte de inóculos de rizóbio. Isolados obtidos após os testes de infectividade em feijão caupi e estirpes-referência utilizadas no estudo.

Local de Coleta ¹	Solo / Cultura ²	Isolados	Identificação 16S rRNA ³	Referência	Planta hospedeira ⁶
Novo Ayrão	Capoeira de 2 anos	INPA R808	Não identificado	-	<i>Vigna</i> ⁷
	Capoeira de 2 anos	INPA R811	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Este trabalho (CENA)	<i>Vigna</i>
	Capoeira de 2 anos	INPA R813	<i>Rhizobium</i> sp	Este trabalho (CENA)	<i>Vigna</i>
	Capoeira de 2 anos	INPA R814a	<i>Rhizobium</i> sp	Este trabalho (CENA)	<i>Vigna</i>
	Capoeira de 2 anos	INPA R814b	<i>Rhizobium</i> sp	Este trabalho (CENA)	<i>Vigna</i>
	Capoeira de 2 anos	INPA R815	<i>Rhizobium</i> sp	Este trabalho (CENA)	<i>Vigna</i>
	Capoeira de 2 anos	INPA R817	Não identificado	-	<i>Vigna</i>
	Capoeira de 2 anos	INPA R820	Não identificado	-	<i>Vigna</i>
	Floresta	INPA R822	Não identificado	-	<i>Vigna</i>
Brasileirinho	Coco (<i>Coco nucifera</i> L.)	INPA R851	Não identificado	-	<i>Vigna</i>
	Biriba (<i>Rollinia mucosa</i> (Jalq.) Baill)	INPA R874	Não identificado	-	<i>Vigna</i>
Marchantaria	Canarana (<i>Echinochloa</i> spp.)	INPA R901	<i>Rhizobium</i> sp	Este trabalho (CENA)	<i>Vigna</i>
Careiro da Várzea	Pimenta (<i>Capsicum</i> spp.)	INPA R918	Não identificado	-	<i>Vigna</i>
	Pimenta (<i>Capsicum</i> spp.)	INPA R921	<i>Rhizobium</i> sp	Este trabalho (CENA)	<i>Vigna</i>
	Canarana (<i>Echinochloa</i> spp.)	INPA R927	Não identificado	-	<i>Vigna</i>
Catalão	Acácia (<i>A. mangium</i> L.)	INPA R949	Não identificado	-	<i>Vigna</i>
Costa do Açutúba	Mamão (<i>Carica papaya</i> L.)	INPA R980	<i>Bradyrhizobium</i> sp	Este trabalho (CENA)	<i>Vigna</i>
Barreirinha	Cupuaçu (<i>T. grandiflorum</i>)	INPA R993	Não identificado	-	<i>Vigna</i>
	Cupuaçu (<i>T. grandiflorum</i>)	INPA R999	Não identificado	-	<i>Vigna</i>
	Cupuaçu (<i>T. grandiflorum</i>)	INPA R1003	Não identificado	-	<i>Vigna</i>

Continuação ...

Embrapa Agrobiologia	Estirpes-Referência⁴		
	BR 112 = LMG 6217	<i>Sinorhizobium fredii</i>	Willems & Collins (1993), De Lajudie <i>et al.</i> (1994) <i>Glycine, Vigna</i>
	BR 114 = USDA 06	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Ando & Yokoyama (1999) <i>Glycine, Vigna</i>
	BR 115 = USDA 76	<i>B. elkanii</i>	Chueire <i>et al.</i> (2003) <i>Glycine, Vigna</i>
	BR 523 = USDA 3592	<i>Mesorhizobium tianshanense</i>	Kwon <i>et al.</i> (2005), Hungria & Campo (2005) <i>Glycyrrhiza</i>
	BR 522 = USDA 3392	<i>M. mediterraneum</i>	Kwon <i>et al.</i> (2005) <i>Cicer</i>
	BR 524 = USDA 4779	<i>M. huakuii</i>	Hungria & Campo (2005) <i>Astragalus</i>
	BR 525 = USDA 1037	<i>S. medicae</i>	Peng <i>et al.</i> (2002), De Lajudie <i>et al.</i> (1994) <i>Medicago</i>
	BR 10016 = CFN 299	<i>Rhizobium tropici</i> tipo II A	van Berkum <i>et al.</i> (1994), Hernandez-Lucas <i>et al.</i> (1995) <i>Phaseolus, Leucaena</i>
	BR 10026 = CFN 42	<i>R. etli</i>	van Berkum <i>et al.</i> (1996), <i>Phaseolus, Medicago</i>
	BR 10052 = LMG 819	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>Phaseoli</i>	Willems & Collins (1993) <i>Phaseolus</i>

⁽¹⁾ Município de Novo Ayrão; Ramal do Brasileirinho, Manaus; Marchantaria, Município Careiro da Várzea; Catalão, Município Careiro da Várzea; Município Careiro da Várzea; Município Rio Preto da Eva; Costa do Laranjal, Município de Manacapuru; Costa do Açutúba, Município de Iranduba; Município de Barreirinha. Todos no Amazonas.

⁽²⁾ Amostras de solos utilizadas como fonte de inoculo em plantas de feijão caupi.

⁽³⁾ Identificação dos isolados pelo seqüenciamento do gene 16S rRNA realizado no CENA (Centro de Energia Nuclear na Agricultura / USP – Campus Piracicaba, SP).

⁽⁴⁾ Estirpes-referência obtidas junto a Coleção de Cultura da Embrapa Agrobiologia (Seropédica, RJ).

Extração de DNA

A partir de protocolos tradicionais, foram realizadas algumas adaptações que permitiram a otimização dos resultados com os isolados obtidos e as estirpes-referência. As bactérias foram repicadas e cultivadas em meio YM (Vincente, 1970) sobre um agitador rotatório (100 rpm) a $26\pm 2^\circ\text{C}$, por três e cinco dias para rizóbios de crescimento rápido e lento, respectivamente. Posteriormente, foi realizada a extração do DNA genômico (Anexo 2).

Perfil de RFLP-PCR da região do 16S rRNA

Após a extração do DNA das bactérias, foi realizada a amplificação do mesmo pela técnica da PCR com os oligonucleotídios fd1 (3' – CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC – 5' e rD1 (5' – CCGAATTCGTGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3'), que amplificam praticamente toda a região do DNA (aproximadamente 1500 pb) que codifica o gene 16S rRNA (Chen *et al.*, 2000; Germano *et al.*, 2003). Cada repetição constituiu, em um volume final de 25 μL , constituída por: 14,2 μL de água deionizada estéril; 2,5 μL de dNTPs (1,5 mM de cada); 2,5 μL de tampão 10X; 2,5 μL MgCl_2 (50 mM); 1,0 μL de cada oligonucleotídeo (5 pmoles μL^{-1}); 0,3 μL de Taq DNA polimerase (5 U/ μL); 1,0 μL de DNA da amostra (10 ng μL^{-1}). A reação foi conduzida em um termociclador “Peltier Thermal Cycler MJ96G” (Biocycler), com um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 2 min.; a 94°C por 15 s; anelamento a 55°C por 45 s; 30 ciclos de desnaturação; e extensão a 72°C por 2 min.; um ciclo final de extensão a 72°C por 5 min.; os tubos foram mantidos a 4°C . Os produtos de PCR foram digeridos com as enzimas de restrição *HinfI*, *MspI* e *MboI* (Invitrogen – Life Technologies) reconhecedoras de 4 (*MspI* e *MboI*) e 5 (*HinfI*) pares de bases. Essas enzimas foram escolhidas após uma simulação com cortes de enzimas, nas seqüências das estirpes-referência, utilizando-se o programa WEBCUTTER v.1.0 disponível “on-line” no “website” <http://www.medkem.gu.se/cutter/>. Para cada enzima, foi preparada uma mistura contendo: 6 μL do produto do PCR; 1 μL do tampão específico para cada enzima (10X); 1,0 μL da enzima (5 U/reação); 2,0 μL de água deionizada estéril; incubado por duas horas a 37°C .

Os fragmentos obtidos foram analisados em eletroforese com gel de agarose (2,5%) corados com brometo de etídio, em tampão TBE 1,0X (5,4 g de Tris-base, 2,75 g de ácido bórico, 2 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0, para um litro de solução), a 100V por 4 horas. As bandas foram visualizadas e fotografadas sob radiação UV. Foi utilizado um marcador molecular (100 bp ladder - Fermentas), para estimar o tamanho dos fragmentos de DNA.

Foi realizado um mapeamento dos sítios de restrição para cada enzima, com intuito de individualizá-los (Amorim, 1997) e permitir a construção de uma matriz geral dos estados de caracteres (presença/ausência de sítios de restrição). Os resultados foram analisados com auxílio do programa MVSP (Multi-Variate Statistical Package versão 3.13) e o método de agrupamento de médias aritméticas (UPGMA). Nessa análise, utilizou-se o coeficiente de similaridade de Jaccard.

4.6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tem sido relatado, freqüentemente, que, embora sejam constatadas elevadas variabilidades morfológica, fisiológica e genética entre estirpes de rizóbio, a região do gene 16S rRNA não reflete essa diversidade. Neste estudo, a amplificação com os oligonucleotídios fD1 e rD1 produziu, em todos os isolados, um único fragmento, com aproximadamente 1.500 pb. Quando esse fragmento foi digerido com três enzimas de restrição (Figuras 1, 2 e 3) e os fragmentos analisados em conjunto, constatou-se grande variabilidade genética (Figura 4) e a formação de 8 grupos com um nível de similaridade superior a 50%. Dois isolados (INPA R817 e INPA R808) e quatro estirpes-referência (BR 524, BR 10026, BR 10016 e BR 112) se agruparam com os demais grupos, porém, com níveis de similaridades inferiores a 50% (Figura 4).

Os grupos um (G1), três (G3), cinco (G5), seis (G6) e sete (G7) foram formados apenas por isolados nativos de rizóbio, não ocorrendo à presença de estirpes-referência (Figura 4, Tabela 2). O grupo 1 foi formado pelos isolados INPA R814a e INPA R811, anteriormente identificados pelo seqüenciamento do gene 16S rRNA, como *Rhizobium* sp. e *Bradyrhizobium japonicum*, respectivamente; o grupo três pelos isolados INPA R851 e INPA R813; o grupo cinco com os isolados INPA R949, INPA R927 e INPA R918; o grupo seis pelos isolados INPA R993, INPA R1003, INPA R822, INPA R921, INPA R901 e INPA R814b, com esses três últimos previamente identificados como *Rhizobium* sp.;

grupo sete pelos isolados INPA R820 e INPA R815 (*Rhizobium* sp.). O grupo dois (G2) foi formado pelas estirpes-referência BR 10052 (*Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*) e BR 523 (*Mesorhizobium tianshanense*), enquanto o quatro (G4) incluiu as estirpes BR 525 (*Sinorhizobium medicae*) e BR 522 (*M. mediterraneum*). Já o grupo 8 (G8) foi formado pelos isolados INPA R999, INPA R874 e INPA R980 (este último identificado como *Bradyrhizobium* sp.), e pelas estirpes-referência BR 115 (*Bradyrhizobium elkanii*) e BR 114 (*Bradyrhizobium japonicum*). Nesse grupo foram observadas similaridades de 93% e 66% entre as estirpes-referência BR 115 e BR 114 e os isolados, respectivamente (Figura 4, Tabelas 2).

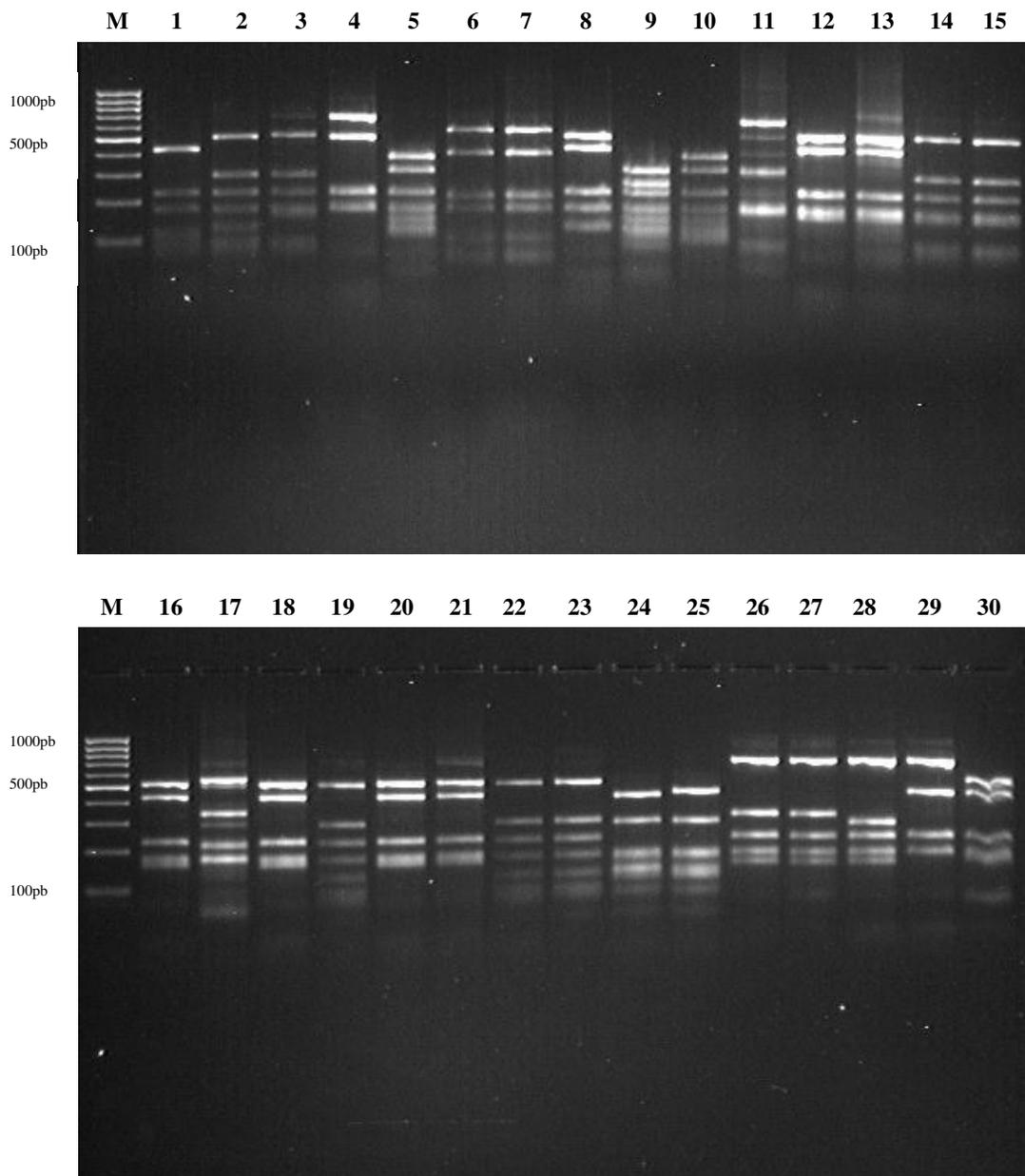
Considerando-se que existem seis gêneros de rizóbio (*Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium*), e que vários grupos fenotípicos (dados anteriormente mostrados) e genéticos não se agruparam com as estirpes-referência, bem como com os isolados já identificados pelo seqüenciamento do gene 16S rRNA, há uma grande possibilidade da existência de novas espécies e/ou estirpes no grupo de isolados nativos estudados. Resultados semelhantes foram documentados por vários autores (Chen *et al.*, 2000; Motta, 2002; Oliveira, *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2002; Tamimi, 2002; Sikora & Redzepovic, 2003; Zilli *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2005; Soares *et al.*, 2006), segundo os quais, rizóbios isolados de diferentes regiões apresentam elevada diversidade fenotípica e genética e podem também representar novas espécies.

O dendrograma derivado dos perfis de PCR-RFLP mostrou que todos os isolados nativos agrupados com os isolados já identificados pelo seqüenciado do 16S rRNA e com as estirpes-referência, com nível de similaridade maior que 80%, podem ser divididos em dois gêneros principais, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*.

Embora a maioria dos isolados agrupados com os isolados já identificados e estirpes-referência, de acordo com as características fenotípicas (dados anteriormente mostrados) e genéticas (PCR-RFLP), tenha sido relacionada com os gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*, dois isolados (INPA R814a e INPA R811) formaram grupos separados ou com baixa similaridade com estirpes-referência e isolados já identificados. Esses resultados indicam que estes grupos divergentes podem pertencer ao gênero *Sinorhizobium*, tendo em vista as suas características morfológicas e fisiológicas (dados anteriormente mostrados). Porém, para confirmar essa inferência e esclarecer a posição taxonômica desses isolados, tornam-se necessários estudos genéticos mais aprofundados como o seqüenciamento da região 16S rRNA.

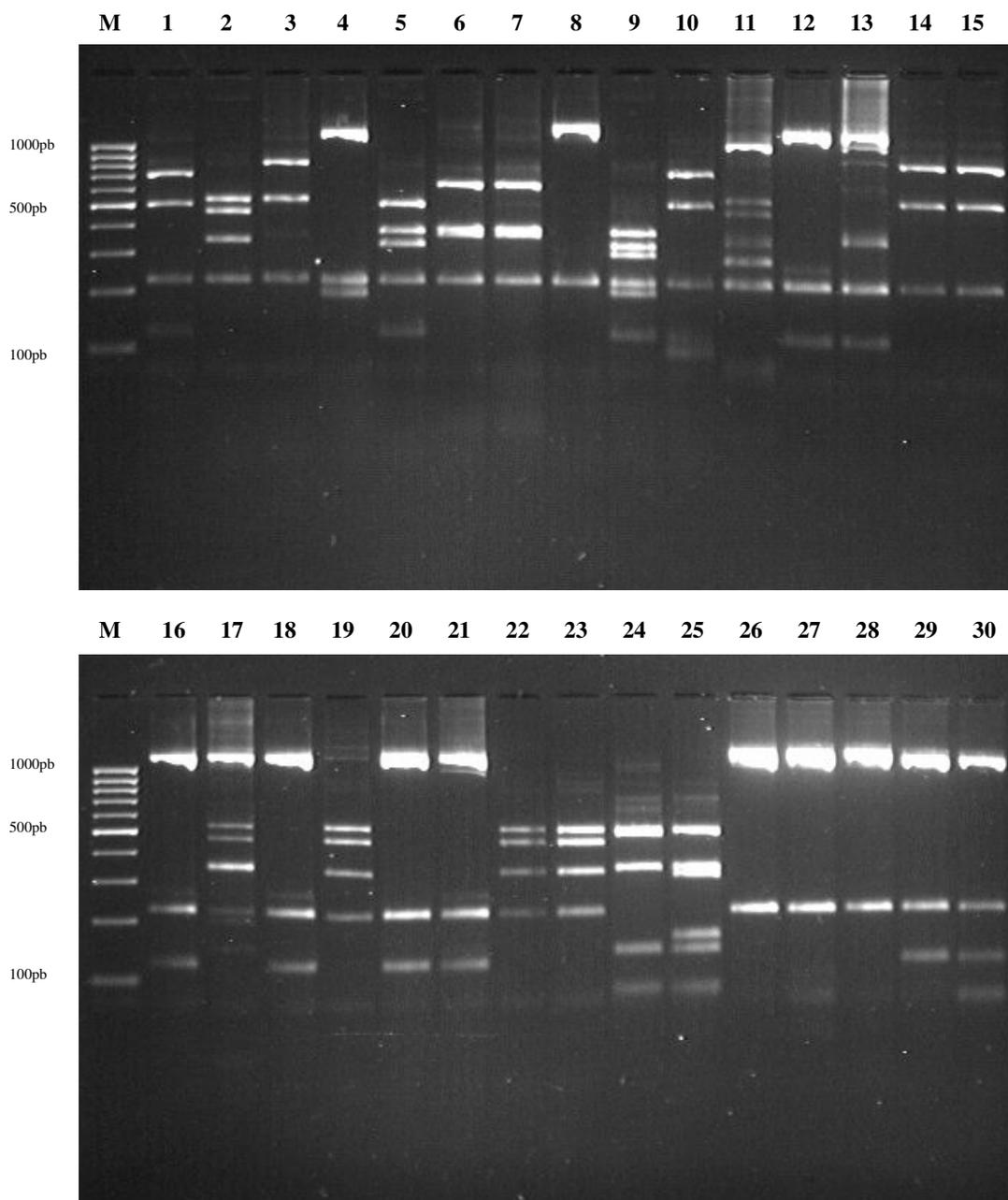
Considerando que os isolados estudados são oriundos de nódulos de feijão caupi, os resultados deste trabalho indicam que, apesar dessa espécie ser nodulada por estirpes de crescimento lento (*Bradyrhizobium*), é predominantemente nodulada por bactérias de crescimento rápido como *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (Oliveira *et al.*, 2002).

O conhecimento taxonômico de isolados selecionados é essencial para a produção e controle de inoculantes comerciais. Além disso, a caracterização genética por meio da técnica de PCR-RFLP do gene 16S rRNA é uma ferramenta útil para o conhecimento da diversidade de rizóbios na Amazônia, até então pouco conhecida (Hara, 2003).



(M) marcador de 100 pares de base; (1) BR 112; (2) BR 115; (3) BR 114, (4) BR 10016; (5) BR 525; (6) BR 523; (7) BR 10052; (8) BR 10016; (9) BR 524; (10) BR 522; (11) INPA R808; (12) INPA R815; (13) INPA R820; (14) INPA R811; (15) INPA R814a; (16) INPA R814b; (17) INPA R817; (18) INPA R822; (19) INPA R874; (20) INPA R901; (21) INPA R921; (22) INPA R980; (23) INPA R999; (24) INPA R813; (25) INPA R851; (26) INPA R918; (27) INPA R927; (28) INPA R949; (29) INPA R1003; (30) INPA R993.

Figura 1: Fragmentos obtidos por PCR-RFLP da região correspondente ao 16S rRNA utilizando a enzima de restrição *MSP I*, em gel de agarose a 2,5%, dos isolados e estirpes-referência.



(M) marcador de 100 pares de base; (1) BR 112; (2) BR 115; (3) BR 114, (4) BR 10016; (5) BR 525; (6) BR 523; (7) BR 10052; (8) BR 10016; (9) BR 524; (10) BR 522; (11) INPA R808; (12) INPA R815; (13) INPA R820; (14) INPA R811; (15) INPA R814a; (16) INPA R814b; (17) INPA R817; (18) INPA R822; (19) INPA R874; (20) INPA R901; (21) INPA R921; (22) INPA R980; (23) INPA R999; (24) INPA R813; (25) INPA R851; (26) INPA R918; (27) INPA R927; (28) INPA R949; (29) INPA R1003; (30) INPA R993.

Figura 2: Fragmentos obtidos por PCR-RFLP da região correspondente ao 16S rRNA utilizando a enzima de restrição *HINF* I, em gel de agarose a 2,5%, dos isolados e estirpes-referência.

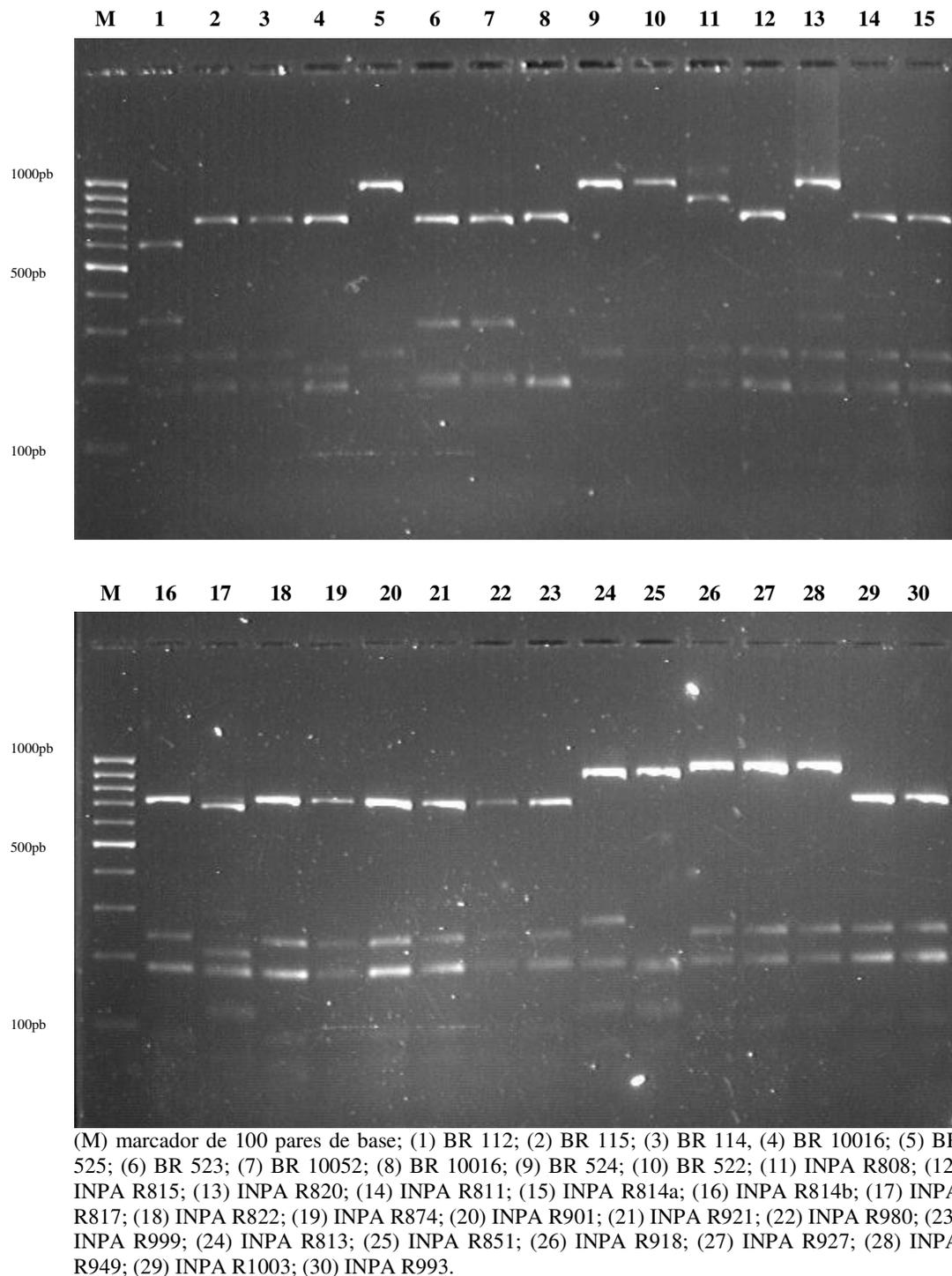


Figura 3: Fragmentos obtidos por PCR-RFLP da região correspondente ao 16S rRNA utilizando a enzima de restrição *MBO* I, em gel de agarose a 2,5%, dos isolados e estirpes-referência.

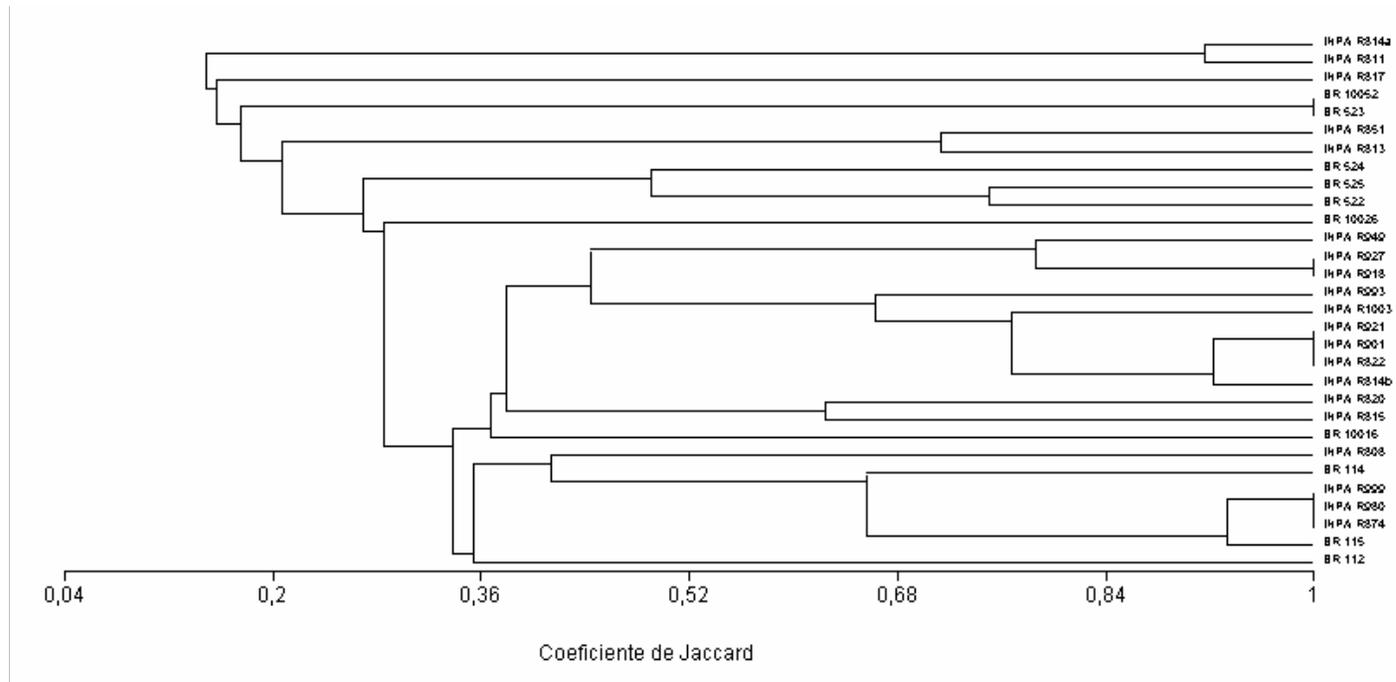


Figura 4: Dendrograma de isolados nativos da Amazônia e estirpes-referência de rizóbio obtido com os fragmentos resultantes da análise por RFLP - PCR da região ribossomal do gene 16S rRNA com três enzimas de restrição (*MSP* I., *HINF* I e *MBO* I). Análise usando o algoritmo UPGMA com o coeficiente de Jaccard.

Tabela 2: Grupos dos isolados nativos da Amazônia e estirpes-referência de rizóbio de acordo com a caracterização genética através dos fragmentos resultantes da análise por RFLP - PCR da região ribossomal do gene 16S rRNA com três enzimas de restrição (*MSP* I, *HINF* I e *MBO* I) (Figura 4).

Grupo	Isolados / Estirpes	Similaridade (%)
G1	INPA R814a e INPA R811	91
G2	BR 10052 e BR 523	100
G3	INPA R851 e INPA R813	71
G4	BR 525 e BR 522	75
G5	INPA R949, INPA R927 e INPA R918	79
G6	INPA R993, INPA R1003, INPA R921, INPA R901, INPA R822 e INPA R814b	66
G7	INPA R820 e INPA R815	63
G8	BR 114, INPA R999, INPA R980, INPA R874 e BR 115	66
Separadas	INPA R817, INPA R808, BR 524, BR 10026, BR 10016 e BR 112	< 50

4.6.4 CONCLUSÕES

- 1) O presente estudo indicou que os 20 isolados avaliados, representativos da população de rizóbios isolados de solos da Amazônia, são geneticamente diversos.
- 2) Os isolados nativos agrupados com os isolados já identificados e as estirpes-referência foram divididos dentro dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. Os isolados com baixa similaridade podem pertencer ao gênero *Sinorhizobium* tendo em vista suas características morfofisiológicas.
- 3) A caracterização genética por meio da técnica da PCR-RFLP do gene 16S rRNA é uma ferramenta útil para o conhecimento da diversidade e da taxonomia de rizóbios nativos da Amazônia, porém, tornam-se necessários estudos genéticos mais aprofundados para a melhor identificação das espécies que ocorrem nesta região.

5.0. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é um processo natural, que usa energia derivada da fotossíntese, em equilíbrio com a natureza onde a lixiviação de nitrato do solo é mínima, apresentando, portanto, pouco ou nenhum potencial de poluição (Franco & Balieiro, 1999). Sua contribuição para a produção de alimentos é ainda muito pequena em relação ao conhecimento atual e o potencial global, se práticas agronômicas adequadas fossem usadas. Certamente o uso de adubos nitrogenados não poderá ser substituído pela FBN, nem estas pelos adubos no contexto da produção agrícola: ambos devem ser complementares. O grande desafio para a pesquisa é aumentar a participação da FBN nos sistemas produtivos, garantindo-lhes a produtividade e a sustentabilidade, em especial na Amazônia.

O nitrogênio, frequentemente, limita as produções agrícolas no Brasil e no mundo. Nesse contexto, sua fixação biológica, realizada por bactérias da família *Rhizobiaceae* que se associam às raízes de diversas leguminosas, desempenham um papel fundamental, não só suprindo as necessidades de N das plantas hospedeiras, como também, enriquecendo o solo com seus restos culturais, evidenciando sua contribuição tanto econômica como social para a agricultura brasileira e mundial (Döbereiner, 1999; Alves *et al.*, 2003).

Foram obtidos grandes avanços nos conhecimentos básicos sobre a simbiose leguminosa-rizóbio, tais como os mecanismos envolvidos na nodulação, desde as trocas de sinais moleculares que ocorre entre o rizóbio e a planta hospedeira, permitindo o reconhecimento de seus respectivos parceiros, até a determinação de proteínas de reconhecimento na planta (Puppepke & Broughton, 1999; Lindström *et al.*, 2002), assim como nos estudos de taxonomia, onde novas espécies foram descritas e reclassificadas através da aplicação e evolução dos métodos moleculares para o estudo da biodiversidade de rizóbio (Hungria *et al.*, 1999; Straliootto & Rumjanek, 1999a).

Neste estudo, novos conhecimentos foram obtidos, além da capacidade simbiótica avaliada nos testes de infectividade, onde foi observado aumento significativo na biomassa de caupi, ocasionado pelas estirpes de rizóbio contidas nas amostras de solos das diferentes regiões de coleta e com população de rizóbio bastante diversa nos parâmetros morfofisiológicos. Os isolados estudados apresentaram capacidade de tolerar a acidez e o alumínio tóxico, condição comum nos solos da Amazônia. Foi observada a capacidade de solubilização de fosfato de cálcio

e alumínio, bem como a síntese de ácido indol-acético, evidenciando que rizóbios isolados de solos da Amazônia têm excelente potencial para serem usados como rizobactérias promotoras do crescimento (RPCP) de plantas leguminosas e não leguminosas. Os resultados obtidos nessa pesquisa corroboram com outras observações de estirpes de rizóbio como RPCP inoculados em leguminosas e não leguminosas (Antoun *et al.*, 1998; Cattelan *et al.*, 1999; Hara & Oliveira, 2004, 2005).

Após os testes de infectividade usando o feijão caupi como planta isca, a caracterização morfofisiológica dos isolados obtidos, a tolerância à acidez e alumínio tóxico, a solubilização de fosfatos e a produção de AIA, foram selecionados 20 isolados para experimentos de eficiência simbiótica comparados com estirpes-referência. Observou-se um desempenho superior de 12 dos 20 selecionados, que, portanto, apresentaram potencial para uso em condições de campo para testes agronômicos em feijão caupi nos solos da região, onde essa cultura tem grande importância social e econômica.

A importância da biodiversidade tem sido cada vez mais ressaltada como fonte de inovação biotecnológica. Neste contexto, a aplicação das técnicas modernas de biologia molecular tem permitido a detecção de grupos de microrganismos fixadores de N₂ até agora desconhecidos, além de revelar a extensão da diversidade genética dentro da família *Rhizobiaceae*.

A caracterização genética dos isolados de rizóbio selecionados, com base na técnica de PCR-RFLP da região 16S rRNA, revelou que esses pertencem aos gêneros *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*, apresentando, também, diversidade entre os isolados e as estirpes-referência.

Este trabalho de seleção de estirpes já resultou em um significativo avanço, conforme discutido nos artigos apresentados. Uma área ainda em fase de desenvolvimento, que visa a construção de um mapa genético do feijão caupi, visando facilitar os programas de melhoramento para a fixação biológica do nitrogênio deve dar impulso mais significativo dentro do objetivo de maximizar a FBN nesta planta. Sua otimização, visando alcançar os patamares de fixação já atingidos por outras culturas como a soja, ainda depende desses estudos básicos, embora a planta apresente esse potencial baseado nos resultados de experimentos conduzidos neste estudo, em condições controladas.

Os estudos da diversidade fenotípica e genotípica de bactérias, especialmente aplicados aos simbiontes de feijão caupi, apresentaram uma grande evolução. No entanto, é a combinação

de vários fatores bióticos e abióticos que vai determinar o sucesso da inoculação. Através do conhecimento da biodiversidade presente nos diferentes sistemas agroecológicos e das características do organismo a ser introduzido, podemos melhorar a adaptabilidade e capacidade competitiva do rizóbio, fatores determinantes do sucesso da prática de inoculação.

Com certeza é uma tecnologia, que mesmo no estágio atual de desenvolvimento, encontra alta aplicabilidade para os pequenos produtores da região amazônica e aqueles ligados à agricultura familiar. No entanto, deve haver concentração de esforços, baseado nas metodologias já estabelecidas, visando o aproveitamento de todo este conhecimento aa nível de campo, nas condições de clima e solo da Amazônia, onde se possa definir o potencial de utilização de cada uma destas técnicas, com o objetivo de melhor atender aos níveis de produtividade destes agricultores.

6. BIBLIOGRAFIAS CITADAS

- Aarons, S.R.; Graham, P.H. 1991. Response of *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* to acidity. *Plant and Soil*, 134:145-151.
- Ab-dalla, M.H. 1994. Solubilization of rock phosphates by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *Folia Microbiologica*, 39(1):53-56.
- Alves, B.J.R.; Boddey, R.M.; Urquiaga, S. 2003. The success of BNF in soybean in Brazil. *Plant and Soil*, 252:1-9.
- Amorim, D.S. 1997. *Elementos básicos de sistemática filogenética*. 2ª Ed. Ribeira Preto. 276p.
- Ando, S.; Yokoyama, T. 1999. Phylogenetic analyses of *Bradyrhizobium* strains nodulating soybean (*Glycine max*) in Thailand with reference to the USDA strains of *Bradyrhizobium*. *Can. J. Microbiol.*, 45 (8):639-645.
- Andrade, D.S.; Murphy, P.J.; Giller, K.E. 2002. Effects of liming and legume/cereal cropping on populations of indigenous rhizobia in an acid Brazilian Oxisol. *Soil Biol. & Biochem.*, 34:477-485.
- Andrade Junior, A.S.; Santos, A.A.; Sobrinhos, C.A.; Bastos, E.A.; Melo, F.B.; Viana, F.M.P.; Filho, F.R.F.; Carneiro, J.S.; Rocha, M.M.; Cardoso, M.J.; Silva, P.H.S.; Ribeiro, V.Q. 2003. *Cultivo do feijão caupi*. Embrapa. Sistema de Produção, 2. Versão Eletrônica. Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br> . Acesso em 02/06/2005.
- Antoun, H.; Beauchamp, C.J.; Goussard, N.; Chabot, R.; Lalande, R. 1998. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant and Soil*, 204:57-67.
- Anuar, A. R.; Sahmsuddin, Z. H.; Yaacob, O. 1995. Contribution of legume-N by nodulated groundnut for growth maize on an soil. *Soil Biol. Biochem.*, 27 (4/5): 595-601.
- Araujo, R.S.; Hungria, M. 1994. *Microrganismos de importância agrícola*. Brasília, Embrapa-CNPAF-SPI. 236p. (Embrapa-CNPAF. Documentos, 44).
- Bano, N.; Musarrat, J. 2003. Isolation and characterization of phorate degrading soil bacteria of environmental and agronomic significance. *Letters Appl. Microbiol.*, 36:349-353.
- Barberi, A.; Moreira, F.M.S.; Florentino, L.A.; Rodrigues, M.I.D. 2004. Crescimento de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe BR 29 em meios de cultivo com diferentes valores de pH inicial. *Ciênc. Agrotec.*, Lavras, 28(2):397-405.
- Bartel, B. 1997. Auxin Biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48:51-56.

- Basu, P.S.; Ghosh, A.C. 1998. Indole acetic acid and its metabolism in root nodules of a monocotyledonous tree *Roystonea regia*. *Current Microbiology*, 37:137-140.
- Batzli, J.M.; Graves, W.R.; Berkum, P. 1992. Diversity among rhizobia effective with *Robinia pseudoacacia* L. *App. Environm. Microbiol.*, 58:2137-2143.
- Bergensen, F.J.; Brockwell, J.; Gibson, A.H.; Schwinghamer, E.A. 1971. Studies of natural populations and mutants of *Rhizobium* in the improvement of legume inoculants. *Plant and Soil*, 46:3-16.
- Berraqueiro, F.R.; Baya, A.M.; Cormenzana, A.R. 1976. Establecimiento de índices para el estudio de la solubilización de fosfatos por bacterias del suelo. *Ars. Farmacéutica*, 17(4):399-406.
- Biswas, J.C.; Ladha, J.K.; Dazzo, F.B. 2000a. Rhizobia inoculation improves nutrient uptake and growth of lowland rice. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 64:1644-1650.
- Biswas, J.C.; Ladha, J.K.; Dazzo, F.B.; Yanni, Y.G.; Rolfe, B.G. 2000b. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. *Agronomy Journal*, 92:880-886.
- Bordelau, L. M.; Prévost, D. 1994. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant and Soil*, 161:115-125.
- Brose, E. 1994. Rhizobia selection for white clover in acid soil. *Pesq. Agrop. Bras.*, 29(2):281-285.
- Broughton, W.J.; Zhang, F.; Perret, X.; Staehelin, C. 2003. Signals exchanged between legumes and *Rhizobium*: agricultural uses and perspectives. *Plant and Soil*, 252:129-137.
- Buendia-Cloveria, A. M.; Rodriguez-Navarro, D. N.; Santa Maria-Linaza, C.; Ruiz-Sainz, J. E.; Temprano-Vera, F. 1994. Evaluation of the symbiotic properties of *Rhizobium fredii* in European soils. *System Appl. Microbiol.*, 17:155-160.
- Bull, A.T.; Ward, A.C.; Goodfellow, M. 2000. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiol. Molecular Biol. Reviews*, 64(3):537-606.
- Bushby, H.V.A. 1990. The role of bacterial surface charge in the ecology of root nodule bacteria: a hypothesis. *Soil Biol. Biochem.*, 22(1):1-9.
- Campo, R.J.; Wood, M. 2001. Residual effects of successive exposure of soybean *Bradyrhizobium* strains to aluminum on solid defined medium. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 36(11):1399-1407.
- Canhos, V.P.; Manfio, G.P. 2001. Recursos Microbiológicos para Biotecnologia. 26p. Disponível On Line. www.mct.gov.br/temas/biotec/tendencias.

- Cardoso, E.J.B.N.; Tsai, S.M.; Neves, M.C.P. 1992. *Microbiologia do solo*. Cardoso, E.J.B.N.; Tsai, S.M.; Neves, M.C.P (Coord.). Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Campinas. 360p.
- Carvalho, F.G.; Selbach, P.A.; Bizarro, M.J. 2005. Eficiência e competitividade de variantes espontâneos isolados de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. recomendadas para a cultura da soja (*Glycine max*). *R. Bras. Ci. Solo*, 29:883-891.
- Cattelan, A.J.; Hartel, P.G.; Fuhrmann, J.J. 1999. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 63:1670-1680.
- Chabot, R.; Antoun, H.; Cescas, M.C. 1996. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Plant and Soil*, 184:311-321.
- Chabot, R.; Beauchamp, C.J.; Kloepper, J.W.; Antoun, H. 1998. Effect of phosphorus on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Soil Biol. Biochem.*, 30(12):1615-1618.
- Chagas Jr., A.F. 2000. *Efeito da inoculação de bactérias solubilizadoras de fosfato na fisiologia de quatro espécies de planta de importância econômica da Amazônia*. INPA – UA, Manaus. 97p. (Tese de Mestrado).
- Chagas Jr., A.F.; Oliveira, L.A. 2001. Tolerância de bactérias solubilizadoras de fosfatos à acidez e ao alumínio. *Ciências Agrárias e Ambientais: Rev. Universidade Federal do Amazonas*, 1(1/2):39-51.
- Chen, H.; Richardson, A.E.; Rolfe, B.G. 1993. Studies of the physiological and genetic basis of acid tolerance in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(6):1798-1804.
- Chen, L.S.; Figueredo, A.; Pedrosa, F.O.; Hungria, M. 2000. Genetic characterization of Soybean Rhizobia in Paraguay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66(11):5099-5103.
- Chueire, L. M. O.; Bangel, E.V.; Mostasso, F.L.; Campo, R.J.; Pedrosa, F.O.; Hungria, M. 2003. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no sequenciamento do gene 16S rRNA. *Rev. Bras. Ciênc. Solo*, 27(50):
- Chueire, L.M. de O; Bangel, E.; Ferreira, C.; Grange, L.; Campo, R.J.; Mostasso, F.L.; Andrade, D.S.; Pedrosa, F.O.; Hungria, M. 2000. *Classificação taxonômica, baseada na caracterização molecular, das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro*. Londrina: Embrapa Soja, 32p. (Embrapa Soja. Boletim de Pesquisa, 3).
- Cline, G.R. 1991. Investigating effects of acidic soils on symbiotic nitrogen fixation. Trivandrum. *Trends in Soil Science*, 1:185-201.

- Correa, O.S.; Barneix, A.J. 1997. Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loti*. *World J. Microbiol. Biotech.*, 13:153-157.
- Coutinho, H.L.C. 1996. Diversidade Microbiana e Agricultura Sustentável. *In: Biodiversidade: Perspectivas e Oportunidades Tecnológicas*, 1996, Campinas. Disponível On Line. www.binbr.org.br/publicações/padct/bio/cap9/1/heitor.html.
- Cunningham, J.E.; Kuiack, C. 1992. Production of citric and oxalic acids and solubilization of calcium phosphates by *Penicillium bilaii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58:1451-1458.
- Dakora, F.D.; Phillips, D.A. 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil*, 245:35-47.
- Day, D.A. 1999. Symbiosome metabolism in legume nodules. *In: Pedrosa, F.; Hungria, M.; Yates, G.; Newton, W.E. (eds.). Nitrogen Fixation: From molecular to Crop Productivity*. Internacional Congress on Nitrogen Fixation, 12, Paraná. 1999. Kluwer Academic Publishers. p. 349-350.
- De Lajudie, P.; Willems, A.; Pot, B.; Dewettinck, D.; Maestrojuan, G.; Neyra, M.; Collins, M.D.; Dreyfus, B.; Kersters, K.; Gillis, M. 1994. Polyphasic taxonomy of rhizobia: Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium* comb. nov., *Sinorhizobium sahelii* sp. nov. and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *J. Systemic Bacteriol.*, 44:715-733.
- Del Papa, M.F.; Balagué, L.J.; Sowinski, S.C.; Wegener, C.; Segundo, E.; Abarca, F.M.; Toro, N.; Niehaus, K.; Pühler, A.; Aguilar, O.M.; Martínez-Drets, G.; Lagares, A. 1999. Isolation and characterization of alfafa nodulating rhizobia present in acidic soils of Central Argentina and Uruguay. *Appl. Envir. Microbiol.*, 65(4):1420-1427.
- Deshwal, V.K.; Dubey, R.C.; Maheshwari, D.K. 2003. Isolation of plant growth-promoting strains of *Bradyrhizoiium (Arachis)* sp. with biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of peanut. *Current Science*, 84(3):443-448.
- Dias, M.C.; Barreto, J.F.; Xavier, J.J.B.N. 2002. *Agricultura Familiar no Amazonas: Cultivo de feijão caupi em várzea. Cultivar BR 8-Caldeirão*. Embrapa Amazônia Ocidental. Manaus. 4p.
- Dilworth, M.J.; Rynne, F.G.; Castelli; Vivas-Marfisi, A.I.; Glenn, A.R. 1999. Survival and exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti* WSM419 are affected by calcium and low pH. *Microbiology*, Reading, 145(7):1585-1593.
- Dobereiner, J. 1997. A importância da fixação biológica de nitrogênio para a agricultura sustentável. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*. Disponível On Line. www.biotecnologia.com.br/revista/bio01/1hp_15.asp.
- Drozdownicz, A. 1997. Bactérias do Solo. *In: Vargas, M.A.T.; Hungria, M. (eds.). Biologia dos Solos dos Cerrado*. Planaltina, 1997. EMBRAPA-CPAC. p. 19-65.

- Ehlers, J.D.; Hall, A.E. 1997. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Field Crop Research*, Amsterdam, 53:187-204.
- EMBRAPA. 1997. *Manual de métodos de análise de solo*. 2ª edição. CNPS /EMBRAPA. 212p.
- Felice, A.E.; Alshinawi, C. 1996. Polymerase chain reaction in molecular biotechnology; appropriate technology for developing countries. *World J. Microbiol. Biotch.*, Oxford, 12:467-471.
- Fernandes, M.F.; Fernandes, R.P.M. 2000. Seleção inicial e caracterização parcial de rizóbios de tabuleiros costeiros quando associados ao guandu. *Rev. Bras. Ci. Solo*, 24:321-327.
- Ferreira, P.A.A.; Vale, H.M.M.; Pereira, J.P.A.R.; Florentino, L.A.; Moreira, F.M.S. 2005. Eficiência de estirpes selecionadas e diversidade fenotípica de populações de rizóbio nativos que nodulam o caupi (*Vigna unguiculata* L.) em Iguatama, MG. In: XXX Congresso Brasileiro de Ciências do Solo. Anais ...Recife. CD ROOM.
- Flis, S. E.; Glen, A R.; Dilworth, M. J. 1993. The interaction between structure: gene cloning and sequencing. In: 8th ed., John Wiley & Sons Inc., *Principles of Genetics*. New York. p. 348-389.
- Fohse, D.; Claassen, N.; Jungk, A. 1988. Phosphorus efficiency of plants. I. External and internal P requirement and P uptake efficiency of different plant species. *Plant and Soil*, 110:101-109.
- Foster, J.W.; Hall, H.K. 1991 Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *S. typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, Washington, 173(16):5129-5135.
- Franco, A.A.; Balieiro, F.C. 1999. Fixação biológica do nitrogênio: Alternativa aos fertilizantes nitrogenados. In: Siqueira, J.O.; Moreira, F.M.S.; Lopes, A.S.; Guilherme, L.R.G.; Faquin, V.; Furtini Neto, A.E.; Carvalho, J.G. (eds.). *Inter-Relação Fertilidade, Biologia do Solo e Nutrição de Plantas*. Viçosa:SBCS, Lavras:UFLA/DCS. p. 577-595.
- Frankenberger, W.T.Jr.; Arshad, M. 1995. *Phytohormones in Soil: Microbial Production and Function*, NY, USA: Marcel Dekker Inc. p.503.
- Freire, J.R.J. 1992. Fixação do nitrogênio pela simbiose rizóbio/leguminosas. In: Cardoso, E.J.B.N.; Tsai, S.M.; Neves, M.C.P. (Eds.). *Microbiologia do solo*. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. p. 121-139.
- Freire Filho, F.R.; Lima, J.A.A.; Ribeiro, V.Q. 2005. *Feijão caupi: avanços tecnológicos*. Freire Filho, F.R.; Lima, J.A.A.; Ribeiro, V.Q (eds.). Brasília, DF. Embrapa Informações Tecnológicas. 519p.
- Freire Filho, F.R.; Lima, J.A.A.; Viana, F.M.P.; Ribeiro, V.Q. 2004. *Feijão caupi: avanços tecnológicos*. Freire Filho, F.R.; Lima, J.A.A.; Viana, F.M.P.; Ribeiro, V.Q (eds.). Teresina: Embrapa Meio Norte. 640p.

- Freire Filho, F.R.; Ribeiro, V.Q.; Barreto, P.D.; Santos, C.A. 1998. Melhoramento genético do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) na região do Nordeste. Embrapa Semi-Árido. Workshop.
- Fuhrmann, J. 1990. Symbiotic effectiveness of indigenous soybean *Bradyrhizobium* as related to serological, morphological, rhizobitoxine and hydrogenase phenotypes. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, v. 56, p. 224-229.
- Garau, G.; Reeve, W.G.; Brau, L.; Deiana, P.; Yates, R.J.; James, D.; Tiwari, R.; O'Hara, G.W.; Howieson, J.G. 2005. The symbiotic requirements of different *Medicago* spp. suggest the evolution of *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* with hosts differentially adapted to soil pH. *Plant and Soil*, 176:263-277.
- Gemell, L.G.; Roughley, R.J. 1993. Field evaluation in acid soils of strains of *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* selected for their tolerance or sensitivity to acid soil factors in agar medium. *Soil Biol. Biochem.*, Oxford, 25(10):1447-1452.
- Germano, M.G.; Galli-Terasawa, L.V.; Chueire, L.M.O.; Hungria, M.; Bangel, E.V.; Campo, R.J. 2003. Identificação de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* / *B. elkanii* mais eficientes e competitivas para a cultura da soja e avaliação das respostas à reinoculação em áreas com populações estabelecidas distintas de *Bradyrhizobium*. In: Hoffmann-Campo, C.B.; Saraiva, O.F. (eds). *Resultado de Pesquisa da Embrapa Soja – 2002. Microbiologia do Solo..* Londrina, Embrapa Soja. p. 42-59. (Embrapa Soja. Documentos, 216).
- Glick, B.R.; Penrose, D.M.; Li, J. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentration by plant growth-promoting bacteria. *J. Theor. Biol.*, 190:63-68.
- Goedert, W.J.; Lobato, E.; Lourenço, S. 1997. Nutrient use efficiency in Brazilian acid soils: Nutrient management and plant efficiency. In: Moniz et al. (ed.). *Plant-Soil Interactions at Low pH. Brazilian Soil Science Society.* p. 97-104.
- Goodson, M.; Rowbury, R.J. 1989. Resistance of acid-habituation *Escherichia coli* to organic acids and its medical and applied significance. *Letters Appl. Microbiol.*, Oxford, 8(6):211-214.
- Gordon, S.A.; Weber, R.P. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology*, 26:192-195.
- Graham, P.H. 1976. Identification and classification of root nodule bacteria. In: Nutman, P.S. (Ed.). *Symbiotic Nitrogen Fixation in Plant.* Cambridge: Cambridge University, p. 99-112.
- Graham, P.H.; Vance, C.P. 2000. Nitrogen fixation in perspective: An overview of research and extension needs. *Field Crops Research*, 65:93-106.
- Graham, P.H.; Vance, C.P. 2003. Legumes: Importance and constraints to greater use. *Plant Physiology*, 131:872-877.

- Graham, P.H.; Draeger, K.J.; Ferrey, M.L.; Conray, M.J.; Hammer, B.E.; Martinez, E.; Aarons, S.R.; Quintino, C. 1994. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR 1899. *Can. J. Microbiol.*, 40:198-207.
- Grange, L.; Hungria, M. 2004. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. *Soil Biol. Biochem.*, 53:1223-1228.
- Gyaneshwar, P.; Naresh Kumar, G.; Parekh, L.J. 1998. Effect of buffering on the phosphate-solubilizing ability of micro-organisms. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14:669-673.
- Gyaneshwar, P.; Kumar, G.N.; Parekh, L.J.; Poole, P.S. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plant. *Plant and Soil*, 245:83-93.
- Gyaneshwar, P.; Parekh, L.J.; Archana, G.; Poole, P.S.; Collins, M.D.; Hutson, R.A.; Naresh Kumar, G. 1999. Involvement of a phosphate starvation inducible glucose dehydrogenase in soil phosphate solubilization by *Enterobacter asburiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 171:223-229.
- Halder, A.K.; Chakrabartty, P.K. 1993. Solubilization of inorganic-phosphate by rhizobium. *Folia Microbiologica*, 38(4):325-330.
- Halder, A.K.; Mishra, A.K.; Chakrabartty, P.K. 1991. Solubilization of inorganic phosphates by *Bradyrhizobium*. *Indian J. Experimental Biol.*, 29(1):28-31.
- Halder, A.K.; Mishra, A.K.; Bhattacharyya, P.; Chakrabartty, P.K. 1990. Solubilization of rock phosphate by *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 36:81-92.
- Hameed, S.; Yasmin, S.; Malik, K.A.; Zafar, Y.; Hafeez, F.Y. 2004. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Agrobacterium* strain isolated from cultivated legumes. *Biol. Fertil. Soils*, 39:179-185.
- Handlesman, J.; Staab, E. 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens, *Plant Cell*, 8:1855-1869.
- Hara, F.A.S. 2003. *Ecologia de rizóbia em solos ácidos e de baixa fertilidade da Amazônia*. Tese de Doutorado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Universidade Federal do Amazonas (INPA/UFAM). Manaus. 220p. (Tese de Doutorado).
- Hara, F.A.S.; Oliveira, L.A. 2004. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. *Acta Amazônica*, 34(3):343-357.
- Hara, F.A.S.; Oliveira, L.A. 2005. Características fisiológicas e ecológicas de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 40(7):667-672.
- Hernandez-Lucas, I.; Segovia, L.; Martinez-Rmero, E.; Pueppke, S.G. 1995. Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:2775-2779.

- Howieson, J.G.; Robson, A.D.; Abbott, L.K. 1992. Acid tolerant species of *Medicago* produce root exudates at low pH which induce the expression of nodulation genes in *Rhizobium meliloti*. *Aust. J. Plant Physiol.*, Murdoch, 19(3):287-296.
- Hungria, M.; Araújo, R. S. 1994. *Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola*. Brasília. CNPSo, CNPAF. EMBRAPA/ SPI. 542p. (EMBRAPA-CNPAF, Documento, 46).
- Hungria, M.; Vargas, M.A.T.; Araújo, R.S. 1997. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. *In: Vargas, M.A.T.; Hungria, M., (eds). Biologia dos Solos do Cerrado*. Planaltina: EMBRAPA-CPAC. 187-294.
- Hungria, M.; Chueire, L.M.O.; Coca, R.G.; Megías, M. 2001a. Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brazil. *Soil Biol. Biochem.*, 33:1349-1361.
- Hungria, M.; Campo, R.; Chueire, L.; Grange, L.; Megías, M. 2001b. Symbiotic effectiveness of fast-growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brazil. *Biol. Fert. Soils*, 33(5):387-394.
- Hungria, M.; Campo, R.J. 2005. Fixação biológica do nitrogênio em sistemas agrícolas. *In: Congresso Brasileiro de Ciências do Solo, XXX, 2005, Recife, Anais Recife. 2005. Palestra. CD ROOM.*
- Hungria, M.; Franchini, J.C.; Campo, R.J.; Graham, P.H. 2005. The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America. *In: Werner, D.; Newton, W.E., (Eds.). Nitrogen Fixation in agriculture, forestry ecology and environment*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, p. 25-42.
- Hungria, M.; Vargas, M.A.T. 2000. Environmental factors affecting grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research*, 65:151-164.
- Hungria, M.; Vargas, M.A.T.; Andrade, D.S.; Campo, R.J.; Chueire, L.M.O.; Ferreira, M.C.; Mendes, I.C. 1999. Fixação biológica do nitrogênio em leguminosas de grãos. *In: Siqueira, J.O.; Moreira, F.M.S.; Lopes, A.S.; Guilherme, L.R.G.; Faquin, V.; Furtin Neto, A.E.; Carvalho, G.G. (Eds.). Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas*. Lavras: SBCS/UFLA/DCS, p. 597-620.
- Igual, J. M.; Rodriguez-Barrueco, C.; Cervantes, E. 1997. The effects of aluminum on nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Casuarina cunninghamiana* Miq. *Plant and Soil*, 190: 41-46.
- Igual, J.M.; Valverde, A.; Cervantes, E.; Velázquez, E. 2001. Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. *Agronomie*, 21:561-568.

- Illmer, P.; Barbato, A.; Schinner, F. 1995. Solubilization of hardly-soluble $AlPO_4$ with P-solubilizing microorganisms. *Soil Biol. Biochem.*, 27(3):265-270.
- Jackson, K.; Sampaio, E.V.B.; Andrade, L.A.; Tiessen, H. 2002. Capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico em variedades de feijoeiro. In: Silveira, L.; Petersen, P.; Sabourin, E. (Eds.). *Agricultura familiar e agroecologia no semi-árido: avanços a partir do agreste da Paraíba*. Rio de Janeiro: AS-PTA, p. 278-288.
- Jensen, E.S.; Hauggaard-Nielsen, H. 2003. How can increased use of biological N_2 fixation in agriculture benefit the environment? *Plant and Soil*, 252:177-186.
- Jesus, E.C.; Moreira, F.M.S.; Florentino, L.A.; Rodrigues, M.I.D.; Oliveira, M.S. 2005. Diversidade de bactérias que nodulam siratro em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 40(8):769-775.
- Johri, J.K.; Surange, S.; Nautiyal, C.S. 1999. Occurrence of salt, pH and temperature tolerant, phosphate-solubilizing bacteria in alkaline soils. *Current Microbiology*, 39:89-93.
- Jordan, D.C. 1984. Family III Rhizobiaceae. In: Kriegel, N.R.; Holt, J.G. (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 234-256.
- Kahind, J.H.P.; Woome, P.; George, T.; Moreira, F.M. De Sá.; Karanja, N.K.; Giller, K.E. 1997. Agricultural intensification, soil biodiversity and ecosystem function in the tropics: the role of nitrogen-fixing bacteria, *Applied Soil Ecology*, Amsterdam, 6(1):55-76.
- Kawai, F.; Zhang, D.; Sugimoto, M. 2000. Isolation and characterization of acid and Al-tolerant microorganism. *FEMS Microbiology Letters*, 189:143-147.
- Keltjens, W.G. 1997. Plant adaptation and tolerance to acid soil; its possible Al avoidance – A review. In: Brazilian Soil Science Society. *Plant-Soil Interactions at Low pH*. p. 109-117.
- Kessel, C.V.; Hartley, C. 2000. Agricultural management of grain legumes: has it led to an increase in nitrogen fixation? *Fiel Crops Research*, 65:165-181.
- Khalid, A.; Arshad, M.; Zahir, Z.A. 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J. Applied Microbiol.*, 96:473-480.
- Kim, K.Y.; McDonald, G.A.; Jordan, D. 1999. Solubilization of hydroxyapatite by *Enterobacter agglomerans* and cloned *E. coli* in culture medium. *Biol. Fert. Soil*, 24:347-352.
- Kim, K.Y.; Jordan, D.; McDonald, G.A. 1998. *Enterobacter agglomerans*, phosphate solubilizing bacteria and microbial activity in soil: Effect of carbon sources. *Soil Biol. Biochem.*, 30:995-1003.
- Kinraide, T.B.; Sweeney, B.K. 2003. Proton alleviation of growth inhibition by toxic metals (Al, La, Cu) in rhizobia. *Soil Biol. Biochem.*, 35:199-205.

- Kuklinsky-Sobral, J.; Araújo, W.L.; Mendes, R.; Geraldi, I.O.; Pizzirani-Kleiner, A.A.; Azevedo, J.L. 2004. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environm. Microbiol.*, 6(12):1244-1251.
- Kwon, S.W.; Park, J.Y.; Kim, J.S.; Kang, J.W.; Cho, Y.H.; Lim, C.K.; Parker, M.A.; Lee, G.B. 2005. Phylogenetic analysis of the genera *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* on the basis of 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequences. *J. Syst. Evol. Microbiol.*, 55:263-270.
- Lacerda, A.M.; Moreira, F.M.S.; Magalhães, F.M.M.; Andrade, M.J.B. de; Soares, A.L. de E.L. 2004. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade de feijão caupi. *Rev. Ceres*, 51:67-82.
- Lafay, B.; Burdon, J. 1998. Molecular diversity of Rhizobia occurring on native shrubby legumes in Southeastern Australia. *Appl. Environm. Microbiol.*, 64(10):3989-3997.
- Laguerre, G.; Mavingui, P.; Allard, M.R.; Charnay, M.P.; Louvrier, P.; Mazurier, S.I.; Rigottier-Gois, L.; Amarger, N. 1996. Typing of rhizobia by PCR-DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. *Appl. Environm. Microbiol.*, Washington, 62:2029-2036.
- Laguerre, G.; van Berkum, p.; Amarger, N; Prevost, D. 1997. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. *Appl. Environm. Microbiol.*, Washington, 63:4748-4758.
- Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp.115–148. E. Stackebrandt & M. Goodfellow (Ed.). Chichester, UK: Wiley.
- Leong, J. 1986. Siderophores: their biochemistry and possible role in the biocontrol of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 24:187-208.
- Lesueur, D.; Diem, H.G.; Dianda, M.; Lesoux, C. 1993. Selection of *Bradyrhizobium* strains and provenances of *Acacia mangium* and *Faidherbia albida*. Relationship with their tolerance to acidity and aluminum. *Plant and Soil*, 149(2):1559-1566.
- Lima, A.S.; Pereira, J.P.A.R.; Moreira, F.M.S. 2005. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. de solos da Amazônia. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 40(11):1095-1104.
- Lindström, K.; Terefework, Z.; Suominen, L.; Lortet, G. 2002. Signalling and development of *Rhizobium*-legume symbioses. *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy*, 102b(1):61-64.
- Lum, M.R.; Hirsch, A.M. 2003. Rots and their symbiotic microbes: Strategies to obtain nitrogen and phosphorus in a nutrient-limiting environment. *J. Plant Growth Regulation*, 21:368-382.

- Macció, D.; Fabra, A.; Castro, S. 2002. Acidity and calcium interaction affect the growth of *Bradyrhizobium* sp. and the attachment to peanut roots. *Soil Biol. Biochem.*, 34:201-208.
- Magalhães, F. M. M., Magalhães, L. M.; Oliveira, L. A.; Dobereiner, J. 1982. Ocorrência de nodulação em leguminosas florestais de terra firme da região de Manaus-AM. *Acta Amazonica*, 12(3):509-514.
- Malavolta, E. 1989. *ABC da Adubação*. 5^a ed. São Paulo. Agronômicas Ceres, ed. 292p.
- Malavolta, E.; Vitti, G.C.; Oliveira, S.A. 1997. *Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e a aplicações*. Malavolta, E.; Vitti, G.C.; Oliveira, S.A. (eds.). 2^a Ed. Piracicaba: Potafos, 319p.
- Marin, V.A.; Baldani, V.L.D.; Teixeira, K.R.S.; Baldani, J.I. 1999. *Fixação Biológica de Nitrogênio: Bactérias Fixadoras de Nitrogênio de Importância para a Agricultura Tropical*. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 34p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 91).
- Martins, L.M.V. 1996. *Características ecológicas e fisiológicas de caupi (Vigna unguiculata) isoladas a partir de solos da região Nordeste do Brasil*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí. 214p.
- Martins, L.M.V.; Rumjanek, N.G.; Neves, N.C.P. 1995. Diversity of cowpea nodulating rhizobia isolated from the semi-arid northeastern region of Brasil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, Rio de Janeiro, 67:467-471.
- Martins, L.M.V.; Neves, M.C.P.; Rumjanek, N.G. 1997a. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil. *Soil Biol. Biochem.*, 29(5/6):1005-1010.
- Martins, L.M.V.; Xavier, G.R.; Neves, M.C.P.; Rumjanek, N.G. 1997b. *Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de "rizóbio"*. Seropédica. Embrapa Agrobiologia. 14p. (Embrapa-CNPAB. Comunicado Técnico nº 19).
- Martins, L.M.V.; Xavier, G.R.; Rangel, F.W.; Ribeiro, J.R.A.; Neves, M.C.P.; Morgado, L.B.; Rumjanek, N.G. 2003. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: A strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. *Biol. Fertil. Soil*, 38(6):333-339.
- Mathesius, U. 2003. Conservation and divergence of signalling pathways between roots and soil microbes – the *Rhizobium*-legume symbiosis compared to the development of lateral roots, mycorrhizal interactions and nematode-induced galls. *Plant and Soil*, 255:105-119.
- McInroy, S.G.; Campbell, C.D.; Haukka, K.; Odee, D.W.; Sprent, J.I.; Wang, W.J.; Young, J.P.W.; Sutherland, J.M. 1999. Characterization of rhizobia from African acacias and other tropical woody legumes using BiologTM and partial 16S rRNA sequencing. *FEMS Microbiology Letters*, Amsterdam, 170:111-117.

- McInnes, A.; Thies, J.E.; Abbott, L.K.; Howieson, J.G. 2004. Structure and diversity among rhizobial strains, populations and communities – a review. *Soil Biol. Biochem.*, 53:1118-1121.
- Mello, R.B.; Faria, S.M. 1998. *Compatibilidade de bactérias fixadoras de nitrogênio, rizóbio, com espécies da família leguminosae*. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 3p. (Comunicado Técnico, N^o 27).
- Melloni, R.; Moreira, F.M.S.; Nóbrega, R.S.A.; Siqueira, J.O. 2006. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. *R. Bras. Ci. Solo*, 30:235-246.
- Mikanová, O.; Kubat, J. 1999. Practical use of P-solubilization activity of *Rhizobium* species strains. *Rostlinná Výroba*, 45(9):407-409.
- Mikanová, O.; Kubat, J.; Vorisek, K.; Randova, D. 1995. The capacity of the strains rhizobium-leguminosarum to make phosphorus available. *Rostlinná Výroba*, 41(9):423-425.
- Mikanová, O.; Nováková, J. 2002. Evaluation of the P-solubilizing activity of soil microorganisms and its sensitivity to soluble phosphate. *Rostlinná Výroba*, 48(9):397-400.
- Mpepereki, S.; Wollum, A.G.; Makonese, F. 1998. Diversity in symbiotic specificity of cowpea rhizobia indigenous to Zimbabwean soils. *Plant and Soil*, The Hague, 186:167-171.
- Moreira, F. M. S. 1995. Nodulação e crescimento de leguminosas em dois solos da Amazônia. *R. bras. Ci. Solo*, 19:197-204.
- Moreira, F.M.S.; Pereira, E.G. 2001. Microsymbionts: rhizobia. In: Swift, M. & Bignell, D. (eds.). *Standard methods for assessment of soil biodiversity and land use practice*. Bogor: ICRAF, 2001. p. 19-24.
- Moreira, F.M.S.; Siqueira, J.O. 2002. *Microbiologia e bioquímica do solo*. Lavras:UFLA. 626p.
- Mostasso, L.; Mostasso, F.L.; Dias, B.G.; Vargas, M.A.T.; Hungria, M. 2002. Selection on bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. *Field Crops Research*, 73:121-132.
- Mota, J.S. 2002. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* sp. isoladas de áreas de mineração de bauxita reabilitadas. Universidade Federal de Lavras, Lavras. 43p. (Dissertação de Mestrado).
- Mukherjee, S.K.; Asanuma, S. 1998. Possible role of cellular phosphate pool and subsequent accumulation of inorganic phosphate on the aluminum tolerance in *Bradyrhizobium japonicum*. *Soil Biol. Biochem.*, 30(12):1511-1516.

- Munns, D.N. 1978. Soil acidity and nodulation. *In: Andrew C.S. & Kamprath E.J. (eds.). Mineral nutrition of legumes in tropical and subtropical soil.* CSIRO, Melbourne, Australia. p. 247-263.
- Nahas, E. 2002. Microrganismos do solo produtores de fosfatases em diferentes sistemas agrícolas. *Bragantia*, Campinas, 61(3):267-275.
- Nautiyal, L. 1997. Rhizosphere competence of *Pseudomonas* sp. NBR 19926 and *Rhizobium* sp. NBR 19513 involved in the suppression of chickpea (*Cicer arietinum* L.) pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 23:145-158.
- Neilands, J.B.; Leong, S.A. 1986. Siderophores in relation to plant growth and disease. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 37:187-208.
- Neves, M.C.P. 1986. Manejo de FBN – Efeitos de estirpes de *Rhizobium*. *In: XII Reunião Latino Americana Sobre Rhizobium.* Anais... Campinas, Instituto Agronômico. p. 485-546.
- Neves, M.C.P.; Martins, L.M.; Xavier, G.R.; Rumjanek, N.G. 1998a. *Levantamento de estirpes de rizóbio capazes de nodular caupi (Vigna unguiculata) em solos do Nordeste do Brasil. I. Sertão.* Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 10p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 46).
- Neves, M.C.P.; Martins, L.M.; Xavier, G.R.; Rumjanek, N.G. 1998b. *Levantamento de estirpes de rizóbio capazes de nodular caupi (Vigna unguiculata) em solos do Nordeste do Brasil. II. Zona da Mata.* Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 8p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 47).
- Newton, W.E. 1999. Nitrogen fixation in perspective. *In: Pedrosa, F.; Hungria, M.; Yates, G.; Newton, W.E. (eds.). Nitrogen Fixation: From molecular to Crop Productivity.* Internacional Congress on Nitrogen Fixation, 12, Paraná., 1999. Kluwer Academic Publishers. p. 3-8.
- Nicholaides, J. J. I.; Sanchez, P. A.; Bandy, D. E.; Villachia, J. H., Coutu, A. J.; Valverde, C. S. 1983. Crop production systems in the Amazon Basin. *In: E. Moran (ed.) The Dilemma of Amazonian Development,* Westview. p. 101-153.
- Oliveira, A.M.R.O.; Freire, J.R.J.; Bangel, E.V.; Meyer, J.V.; Santos, K.C.; Silva, G.; Hungria, M.; Sá, E.S.; Selbach, P. 2002. *Caracterização genética de rizóbio da coleção de culturas SEMIA.* FERTIBIO 2002, Foz do Iguaçu. CD ROOM, Resumo 436.
- Oliveira, A.L.M.; Urquiaga, S.; Baldani, J.I. 2003. *Processos e mecanismos envolvidos na influencia de microrganismos sobre o crescimento vegetal.* Seropédica: Embrapa Agrobiologia, Ago. 2003. 40p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 161).
- Oliveira, L.A. 1988. *Competitive ability of Rhizobium leguminosarum bv. Phaseoli strains.* Tese de Ph. D. University of Minnesota. 125p.
- Oliveira, L. A. 1991a. Phosphorus related to plant growth and plant-microorganism associations in Amazonian soils. *In: Tiessen, H.; López-Hernandez, D.; Salcedo, I. H. (Eds.). Phosphorus*

- Cycles in Terrestrial and aquatic Ecosystems*. Regional Workshop 3: South and central America. Maracay, Venezuela, p. 186-195.
- Oliveira, L. A. 1991b. Ocupação racional da Amazônia: o caminho para preservar. In: Val, A. L.; Fliglioulo, R.; Feldberger, E. (Eds) *Bases Científicas para Estratégias de Preservação e Desenvolvimento da Amazônia: Fatos Perspectivas*. p. 47-52.
- Oliveira, L.A.; Magalhães, H.P. 1999. Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. *Rev. Microbiol.*, 30:203-208.
- Oliveira, L.A.; Moreira, F.W. 1993. Nodulação em *Pueraria phaseoloides* em amostras de solo do experimento "Recuperação de Áreas Degradadas". In: Preisinger, H.; Gasparotto, L. (Eds.). *Rekultivierung degradierter, brachliegender Monokulturflächen in ausgewogene mischkulturflächen unter besonderer Berücksichtigung bodenbiologischer faktoren*. p.66-68.
- Oliveira, L.A.; Smith, T.J.; Bonetti, R. 1992. Efeito de adubações anteriores na nodulação e rendimento da soja e do feijão caupi num latossolo amarelo da Amazônia. *R. Bras. Ci. Solo*, 16:195-201.
- Oliveira, L. A; Vidor, C. 1984a. Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* em soja. I. Eficiência e especificidade hospedeira. *R. Bras. Ci. Solo*, 8:37-42.
- Oliveira, L. A; Vidor, C. 1984b. Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* em soja. II. Capacidade competitiva por sítios de nódulos. *R. Bras. Ci. Solo*, 8:43-47.
- Oliveira, L. A; Vidor, C. 1984c. Capacidade competitiva de estirpes de *Rhizobium japonicum* em solos com alta população deste *Rhizobium*. *R. Bras. Ci. Solo*, 8:49-55.
- Oliveira, L. A; Vidor, C. 1984d. Colonização, sobrevivência e competitividade de estirpes de *Rhizobium japonicum*. *R. Bras. Ci. Solo*, 8:57-62.
- Parkinson, D.; Coleman, D.C. 1991. Microbial communities, activity and biomass. Amsterdam. *Agriculture, Ecosyst. Environm.*, 34:03-33.
- Patten, C.L.; Glick, B.R. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-2-acetic acid. *Canadian J. Microbiol.*, 42:207-220.
- Peick, B.; Graumann, P.; Schmid, R.; Marahiel, M.; Werner, D. 1999. Differential pH-induced proteins in *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium etli* CIAT 611. *Soil Biol. Biochem.*, 31:189-194.
- Peix, A.; Rivas-Boyer, A.A.; Mateos, P.F.; Rodriguez-Barrueco, C.; Martínez-Molina, E.; Velazquez, E. 2001. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biol. Biochem.* 33:103-110.

- Peng, G.X.; Tan, Z.Y.; Wang, E.T.; Reinhold-Hurek, B.; Chen, W.F.; Chen, W.X. 2002. Identification of isolates from soybean nodules in Xinjiang Region as *Sinorhizobium xinjiangense* and genetic differentiation of *S. xinjiangense* from *Sinorhizobium fredii*. *J. Syst. Evol. Microbiol.*, 52:457-462.
- Pereira, E.G. 2000. *Diversidade de rizóbio isolados em diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia*. 93 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- Pereira, P.A.A.; Bliss, F.A. 1989. Selection of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) for N₂ fixation at different levels of available phosphorus under field and environmentally-controlled conditions. *Plant and Soil*, 115:75-82.
- Prinsen, E.; Chauvux, N.; Schmidt, J.; John, M.; Wieneke, U.; Greef, J.D.; Schell, J.; Onckelen, H.V. 1991. Stimulation of indole-3-acetic acid production in *Rhizobium* by flavonoids. *Federation of European Biochemical Societies*, 282(1):53-55.
- Pueppke, S.G.; Broughton, W. 1999. *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 12(4):293-318.
- Raij, B.V. 1991. *Fertilidade do solo e adubação*. São Paulo, Piracicaba: CERES, POTAFOS. 343p.
- Ramirez, M.E.; Israel, D.W.; Wollum II, A.G. 1997. Phenotypic and genotypic diversity of similar serotypes of soybean *Bradyrhizobium* from two soil populations. *Soil Biol. Biochem.*, Oxford, 29:1539-1545.
- Riccillo, P.M.; Muglia, C.I.; Bruijn, F.J.; Roe, A.J.; Booth, I.R.; Aguilar, O.M. 2000. Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance. *J. Bacteriol.*, 182(6):1748-1753.
- Robarge, W.P.; Johnson, D.W. 1992. The effects of acidic deposition on forested soils. New York. *Advances in Agronomy*. 47:39-43.
- Rodríguez, H.; Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Research Review Paper. *Biotechnology Advances*, 17:319-339.
- Rodrigues, L.A.; Martins, M.A.; Salomão, M.S.M.B. 2003. Uso de micorrizas e rizóbio em cultivo consorciado de eucalipto e sesbânia. II- Absorção e eficiência de utilização de fósforo e frações fosfatadas. *R. Bras. Ci. Solo*, 27:593-599.
- Sá, E.L.S. 2001. Diversidade fenotípica e genética de rizóbios isolados de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) em solos ácidos de Cunha-SP. Piracicaba, Universidade de São Paulo. 109p. (Tese de Doutorado).

- Saiki, R.K.; Gelfand, D.H.; Stoffel, S.; Scharf, S.J.; Higuchi, R.; Horn, E.T.; Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, Washington, 239:487-491.
- Sanchez, P. A.; Bandy, D. E.; Villochia, J. H.; Nicholaides, J. J. 1982. Amazon basin soils: management for continuous crop production. *Science*, 216: 821-827.
- Sanginga, N. 2003. Role of biological nitrogen fixation in legume based cropping systems; a case study of West Africa farming systems. *Plant and Soil*, 252:25-39.
- Schoenfeld, R.; Alves, J.B.; Schuh, C.; Silveira, M.S.; Binz, A.; Anzanello, R.; Selbach, P.A.; Camargo, F.A.O.; Sá, E.L.S. 2005. Efeito da inoculação de rizóbios como bactérias promotoras de crescimento em arroz irrigado (*Oryza sativa*). In: XXX Congresso Brasileiro de Ciências do Solo. Recife. Anais Palestra. CD ROOM.
- Segundo, E.; Martinez-Abarca, F.; Dillewijn, P. van; Fernandez-Lopez, M.; Lagares, A.; Martinez-Drets, G.; Niehaus, K.; Puhler, A.; Toro, N.; van Killewijn, P. 1999. Characterization of symbiotically efficient alfalfa-nodulation rhizobia isolated from acid soils of Argentina and Uruguay. *FEMS Microbiology Ecology*, Amsterdam, 28:169-176.
- Sessitsch, A.; Howieson, J.G.; Perret, X.; Antoun, H.; Martínez-Romero, E. 2002. Advances in *Rhizobium* research. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21(4):323-378.
- Sharma, R.S.; Mohammed, A.; Babu, C.R. 2002. Diversity among rhizobiophages from rhizospheres of legumes inhabiting three ecogeographical regions of India. *Soil Biol. Biochem.*, 34:965-973.
- Sidiqui, M.Y.; Glass, A.D.M. 1981. Utilization index: a modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plant. *J. Plant. Nut.*, 4:289-302.
- Sikora, S.; Redzepovic, S. 2003. Genotypic characterisation of indigenous soybean rhizobia by PCR-RFLP of 16S rDNA, rep-PCR and RAPD analysis. *Food Technol. Biotechnol.* 41(1):61-67.
- Silva Filho, G.N.; Vidor, C. 2000. Solubilização de fosfato por microrganismos na presença de fontes de carbono. *R. Bras. Ci. Solo*, 24:311-319.
- Silva Filho, G.N.; Narloch, C. Scharf, R. 2002. Solubilização de fosfatos naturais por microrganismos isolados de cultivos de *Pinus* e *Eucalyptus* de Santa Catarina. *Pesq. Agropec. Bras.*, 37(6):847-854.
- Silva, A.F.; Nascimento, L.R.S.; Santos, C.E.R.S.; Freitas, A.D.S.; Lyra, M.C.C.P.; Sampaio, E.V.S.B. 2005. Isolamento e caracterização morfofisiológica de isolados de rizóbio em associação com caupi oriundos do Estado da Paraíba. In: XXX Congresso Brasileiro de Ciências do Solo. Anais ...Recife. CD ROOM.

- Siqueira, J.O.; Moreira, F.M.S. 1996. Microbiologia do solo e a sustentabilidade agrícola: Enfoque em fertilidade do solo e nutrição do vegetal. *In: Universidade do Amazonas (Ed). Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas.* p. 1-42.
- Siqueira, J.O.; Moreira, F.M.S.; Grise, B.M.; Hungria, M.; Araújo, R.S. 1994. *Microorganismos e Processos Biológicos do Solo: Perspectivas Ambientais.* Brasília-SPI. (EMBRAPA-CNPAF. Documentos, 45). 142p.
- Sivan, A.; Chet, I. 1992. Microbial control of plant diseases. *In: Mitchell, R. (Ed). Environm. Microbiol..* New York: Wiley-Liss. p. 335-354.
- Slattery, J.F.; Pearce, D.J.; Slattery, W.J. 2004. Effects of resident rhizobial communities and soil type on the effective nodulation of pulse legumes. *Soil Biol. Biochem.,* 36:1339-1346.
- Smith, G.S.; Johnson, C.M.; Cornforth, I.S. 1983. Comparison of nutrient solutions for growth of plants in sand culture. *New Phytol.,* 94:537-548.
- Soares, A.L.L.; Pereira, J.P.A.R.; Ferreira, P.A.A.; Vale, H.M.M.; Lima, A.S.; Andrade M.J.B.; Moreira, F.M.S. 2006. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). I – Caupi. *R. Bras. Ci. Solo,* 30:795-802.
- Somasegaran, P.; Hoben, H. J. 1985. *Methods in legume-Rhizobium technology.* NifTAL Project and MIRCEN, Hawaii, 365p.
- Soto, M.J.; van Dillewijn, P.; Martínez-Abarca, F.; Jiménez-Zurdo, J.I.; Toro, N. 2004. Attachment to plant roots and *nod* gene expression are not affected by pH or calcium in the acid-tolerant alfalfa-nodulating bacteria *Rhizobium* sp. LPU83. *FEMS Microbiol. Ecology,* 48:71-77.
- Specht, A.W.; Erdman, L.W.; Means, U.M.; Resnicky, J.W. 1956. Effect of nutrition on *Trifolium hirtum* inoculated with *Rhizobium trifolii*. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.,* 29:489-495.
- Sprent, J.I. 1994. Evolution and diversity in the legume-rhizobium symbiosis: Chaos theory? *Plant and Soil,* Dordrecht, 161:1-10.
- Stamford, N.P.; Vasconcelos, I.; Almeida, R.T. 1988. Fixação biológica de nitrogênio em caupi na região Nordeste brasileira. *In: Araújo, J.P.P.; Watt, E.E. (Eds.). O caupi no Brasil: Brasília: IITAS/Embrapa,* p. 478-504.
- Stralioatto, R.; Rumjanek, N.G. 1999a. *Aplicação e evolução dos métodos moleculares para o estudo da biodiversidade do rizóbio.* Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 58p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 93).
- Stralioatto, R.; Rumjanek, N.G. 1999b. *Biodiversidade do rizóbio que nodula o feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.) e os principais fatores que afetam a simbiose.* Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 51p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 94).

- Swelim, D.M.; Hashem, F.M.; Kuykendall, L.D.; Hegazi, N.I.; Abdel-Wahab, S.M. 1997. Host specificity and phenotypic diversity of *Rhizobium* strains nodulating *Leucaena*, *Acacia* and *Sesbania* in Egypt. *Biol. Fertil. Soils*, 25:224-232.
- Sylvester-Bradley, R.; Asakawa, N.; La Torraca, S.; Magalhães, F.M.M.; Oliveira, L.A.; Pereira, R.M. 1982. Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfato na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. *Acta Amazônica*, 12(1):15-22.
- Tamimi, S.M. 2002. Genetic diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from root nodules of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in the soils of the Jordan valley. *Appl. Soil Ecology*, 19:183-190.
- Teixeira, K.R. 1997. *Bases moleculares e genética da fixação biológica de nitrogênio*. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 26 p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 32).
- Teixeira, K.R. 2000. *Avaliação da expressão do gene nif e outros envolvidos no processo de FBN: Proposta de um modelo de estudo da interação bactéria-planta*. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 15 p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 113).
- Teixeira, K.R.; Marin, V.A.; Baldani, J.I. 1998. *Nitrogenase: Bioquímica do processo de FBN*. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 25 p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 84).
- Terefework, Z.; Nick, G.; Suomalaine, S.; Paulin, L.; Lindström, K. 1998. Phylogeny of *Rhizobium galegae* with respect to other rhizobia and agrobacteria. *International J. Systematic Bacteriol.*, Washington, 48:349-356.
- Thakuria, D.; Talukdar, N.C.; Goswami, C.; Hazarika, S.; Boro, R.C.; Khan, M.R. 2004. Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. *Current Science*, 86(7):978-985.
- Thornton, F.C.; Davey, C.B. 1983. Response of the clover *Rhizobium* symbiosis to soil acidity and *Rhizobium* strain. *Agronomy Journal*, 75:557-560.
- Toro, M.; Azcón, R.; Herrera, R. 1996. Effects on yield and nutrition of mycorrhizal and nodulated *Pueraria phaseoloides* exerted by P-solubilizing rhizobacteria. *Biol. Fertil. Soils*, 21:23-29.
- Unkovich, M.J.; Pate, J.S. 2000. An appraisal of recent field measurements of symbiotic N₂ fixation by annual legumes. *Field Crops Research*, 65:211-228.
- van Berkum, P.; Beyene, D.; Eardly, B.D. 1996. Phylogenetic relationships among *Rhizobium* species nodulating the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Syst. Bacteriol.*, 46(1):240-244.

- van Berkum, P.; Navarro, R.B.; Vargas, A.A. 1994. Classification of the uptake hydrogenase-positive (Hup+) bean rhizobia as *Rhizobium tropici*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 (2):554-561.
- Vance, C.P.; Graham, P.H. Allan, D.L. 1999. Biological nitrogen fixation: Phosphorus – A critical future need?. In: , F.; Hungria, M.; Yates, G.; Newton, W.E. (eds.). *Nitrogen Fixation: From molecular to Crop Productivity*. Internacional Congress on Nitrogen Fixation, 12, Paraná. Pedrosa1999. Kluwer Academic Publishers. p. 509-514.
- Vandamme, P.; Pot, B.; Gillis, M.; De Vos, P.; Kersters, K.; Swings, J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Reviews*, 60:407-438.
- Vargas, M.A.T.; Hungria, M.; 1997. *Biologia dos Solos dos Cerrado*. Planaltina: EMBRAPA-CPAC. 524p.
- Vega-Hernández, M.C.; Leon-Barrios, M.; Pérez-Galdona, R. 2002. Indole-3-acetic acid production from indole-3-acetonitrile in *Bradyrhizobium*. *Soil Biol. Biochem.*, 34:665-668.
- Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255:571-586.
- Vidor, C.; Oliveira, L.A.; Lovato, P.E. 1986. Sobrevivência e competição de estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. In: *Reunião Latino Americana de Rhizobium, XII*. Universidade do Paraná, Paraná. p. 247-299.
- Vincent, J. M. 1970. *A manual for practical study of root nodule bacteria*. IBP Handbook N. 15. Blackwell Scient. Publ. 140p.
- Vinuesa, P.; Rademaker, J.L.W.; de Bruijin, F.J.; Werner, D. 1998. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64:2096-2104.
- Wani. S. P.; Rupela, O. P., Lee, K. K. 1995. Sustainable agriculture in the semi-arid tropics through biological nitrogen fixation in grain legumes. *Plant and Soil*, 147:19-49.
- Watkin, E.L.J.; O'Hara, G.W.; Glenn, A.R. 1997. Calcium and acid stress interact to affect the growth of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii*. *Soil Biol. Biochem.* 29(9/10):1427:1432.
- Watkin, E.L.J.; O'Hara, G.W.; Glenn, A.R. 2003. Physiological responses to acid stress of an acid-soil tolerant and acid-soil sensitive strain of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Soil Biol. Biochem.*, 35:621-624.

- Watkin, E.L.J.; O'Hara, G.W.; Howieson, J.G.; Glenn, A.R. 2000. Identification of tolerance to soil acidity in inoculant strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii*. *Soil Biol. Biochem.*, 32:1393-1403.
- Weisburg, W.G.; Barns, S.M.; Pelletier, D.A.; Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, Washington, 173:697-703.
- Whitelaw, M.A. 2000. Growth promotion of plant inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Advances in Agronomy*, New York, 69:99-151.
- Willems, A.; Collins, M.D. 1993. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. *J. Syst. Bacteriol.*, 43(2):305-313.
- Wood, M. 1995. A mechanism of aluminum toxicity to soil bacteria and possible ecological implications. *Plant and Soil*, 171:63-69.
- Xavier, G.R.; Martins, L.M.V.; Neves, M.C.P.; Rumjanek, N.G. 1998. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea rhizobia population. *Biol. Fertil. Soils*, 27:386-392.
- Xavier, G.R.; Martins, L.M.V.; Zilli, J.E.; Peixoto, R.C.; Rumjanek, N.G. 1997. *Protocolo operacional cultivo de planta-isca para isolamento de rizóbio a partir de nódulo de planta-isca*. Seropédica: Embrapa-Agrobiologia, Dez. 1997. 7p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 43).
- Xie, H.; Pasternak, J.J.; Glick, B.R. 1996. Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizo-bacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that overproduce indoleacetic acid. *Curr. Microbiol.*, 32:67-71.
- Zahran, H.H. 1999. Rhizobium-Legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol. Molecular Biol. Reviews.* p. 968-989.
- Zaidi, A.; Khan, M.S.; Amil, M. 2003. Interactive effect of rhizotrophic microorganisms on yield and nutrient uptake of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *European J. Agronomy*, 9:15-21.
- Zilli, J.E.; Almeida, D.L.; Rumjanek, N.G.; Neves, M.C.P. 1998. *Levantamento da biodiversidade de rizóbio em diferentes áreas de um sistema integrado de produção agroecológica*. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 15p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 69).
- Zilli, J.E.; Rumjanek, N.G.; Freire Filho, G.R. Neves, M.C.P. 2000. *Levantamento de rizóbios isolados de nódulos de caupi cultivado em amostras de solos do Cerrado do Estado do Piauí*. Seropédica: Embrapa Agrobiologia. 23p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 125).
- Zilli, J.E.; Valisheski, R.R.; Freire Filho, F.R.; Neves, M.C.P.; Rumjanek, N.G. 2004. Assessment of cowpea rhizobium diversity in cerrado areas of northeastern Brazil. *Brazilian J. Microbiol.*, 35:281-287.

Zilli, J.E.; Valichesi, R.R.; Rumjanek, N.G.; Simões-Araújo, J.L.; Freire Filho, F.R.; Neves, M.C.P. 2006. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isolados de solo do Cerrado em caupi. *Pesq. Agropec. Bras.*, 41(5):811-818.

ANEXOS

ANEXO 1:

Solução nutritiva para plantas cultivadas em vasos com areia ou vasos Leonard. Modificada de Smith *et al.*, 1983, *New Phytol.* 94:537-548 e Specht *et al.*, 1956, *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 29:489-495.

SOLUÇÃO ESTOQUE

Solução A: 4,62 g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ em 200 mL de água destilada.

Solução B: 24 g de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 200 mL de água destilada.

Solução C: 20 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em 200 mL de água destilada.

Solução D: 16 g de $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ em 200 mL de água destilada.

Solução E: 1 g de NaFeEDTA em 200 mL de água destilada.

Solução F: Micronutrientes: Adicionar em 50 mL de água destilada:

KCl	0,680 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,630 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,068 g
H_3BO_3	0,630 g
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,068 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,063 g
H_2SO_4 (S.G. 1,83)	0,270 mL

Solução G: 16 g de AlCl_3 em 200 mL de água destilada.

MODO DE PREPARAR

Esterilizar cada uma das soluções em autoclave por 40-60 minutos por 121 °C. Para cada litro da solução final (em água destilada e esterilizada), adicionar 1,25 mL de cada uma das soluções A, B, C, E e G. Adicionar também, 0,1 mL da solução F e 0,6 mL da solução D para cada litro da solução final.

OBS: Pode ser que o $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ usado (Solução B) apresente elevada precipitação após a esterilização em autoclave. Neste caso, esterilizar o $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ separadamente da água e adicionar na água esterilizada. Isto pode ser feito colocando o $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em pó em algum recipiente de vidro ou embrulho de papel alumínio para autoclavar separadamente da água.

ANEXO 2:**EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO** (Adaptado de Germano *et al.*, 2003)

1. Crescer as bactérias em 20 mL de meio YM de 3 a 5 dias (para rizóbio) sob agitação;
2. Centrifugar a suspensão bacteriana a 12.000 RPM por 10 min (4 – 5°C);
3. Descartar o sobrenadante;
4. Acrescentar 1 mL TEN (Tris 50 mM, pH 8,0; EDTA 20 mM, pH 8,0; NaCl 1,5M) e homogeneizar;
5. Acrescentar 100 µL de SDS (Sodium Duodecyl Sulfate) 10%, e homogeneizar;
6. Acrescentar 20 µL de Lizosima (5 mg/mL), incubar a 37°C por 1 hora;
7. Acrescentar 20 µL de Proteinase K (10 mg/mL), incubar a 56°C por 1 hora;
8. Acrescentar 100 µL de NaCl 1,5M, e 100 µL de CTAB 5%, incubar a 65°C por 20 min;
9. Retirar 0,8 mL do produto clarificado, colocar em microtubos novos de 2,0 mL;
10. Acrescentar 0,8 mL (V/V) de fenol hidratado, homogeneizar invertendo os tubos, por 5 min;
11. Centrifugar 8 min a 6.000 RPM;
12. Retirar a fase aquosa, transferindo para microtubos novos;
13. Acrescentar 0,8 mL (V/V) de clorofane (Fenol:Clorofórmio, v/v), homogeneizar invertendo os tubos por 5 min;
14. Proceder conforme os passos 11 e 12;
15. Acrescentar 0,8 mL (V/V) de Clorofórmio, homogeneizar invertendo os tubos, por 5 min;
16. Proceder de acordo com os passos 11 e 12;
17. Acrescentar Isopropanol (v/v 0,8 mL), inverter os microtubos e observar a nuvem de precipitação do DNA;
18. Centrifugar por 30 min a 12.000 RPM;
19. Retirar cuidadosamente o Isopropanol, e acrescentar 100 µL de Etanol 70% gelado, homogeneizar e centrifugar por 10 min;
20. Retirar o etanol 70%, e deixar os microtubos sobre a bancada, até que o DNA esteja completamente seco;
21. Acrescentar 100/150 µL de TE 10:1, e armazenar a 4°C *overnight*.

ANEXO 3

Metodologia de seqüenciamento do gene 16S rDNA (Lab. De Biologia Celular e Molecular, CENA-USP. Responsável Dra. Siu Mui Tsai).

REAÇÃO DE PCR-16S

- Condições de Mix para Bactérias (25 µl):

Buffer 10X PCR	2,5	
MgCl ₂ 50 mM	1,0	
dNTP's 10 mM	0,5	
Primer 16S-F 5 pmoles/µl	1,0	
Primer 16S-R 5 pmoles/µl	1,0	
DNA 10-50 ng		1,0
Taq DNA Polymerase 5U/µl	0,3	
Água esterilizada	17,7	
		25,0

- Desnaturação Inicial - 4 minutos a 96 °C

30 ciclos	{	1 minuto a 94 °C
		30 segundos a 55°C
		2 minutos a 72 °C

- extensão final - 10 minutos a 72 °C

- Armazenar a 4 °C.

PRECIPITAÇÃO DE PRODUTO DE PCR EM TUBOS EPPENDORF

- Transferir todo o volume do produto de PCR (25 μ L) para tubos Eppendorf de 500 μ L. Adicionar 60 μ L de isopropanol 100% e 20 μ L de água ultrapura autoclavada. Misturar (vórtex). Incubar por 2 horas à -20°C;

- Centrifugar a 14.000 rpm, por 25 min, a temperatura ambiente. Descartar o sobrenadante (totalmente) com micropipeta (P 200). Não deixar a ponteira tocar o precipitado. Usar a mesma ponteira para todos os tubos;

- Adicionar 250 μ L de etanol 70% (diluir em água ultrapura imediatamente antes de usar). Misturar (vórtex) e centrifugar a 14.000 rpm, por 5 min, a temperatura ambiente;

- Descartar o sobrenadante (totalmente) com micropipeta (P 200 e P 10);

- Secar a 40 °C (bloco aquecedor para microtubos), por 10 min ou no concentrador de DNA por 10 min;

- Ressuspender em 30 μ L de água ultrapura autoclavada, vortexar e dar um pulso na microcentrifuga;

- Carregar 5 μ L em gel de agarose 1%;

- Guardar o restante em freezer -20°C até a próxima etapa (digestão com enzimas de restrição).

REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO (PRODUTO DE PCR)

- Transferir água ultrapura (Ex: milli-Q) autoclavada para os orifícios da placa de 96 cavidades ou para microtubos de PCR (de 200 μ L). Considerar que água + DNA = volume final de 5 μ L;

- Adicionar 100 ng de DNA;

- Em um microtubo de PCR, fazer uma mistura (“mix”) contendo:

2 μ L de DYEnamic,

1 μ L de primer [5 pmoles. μ L-1]*

2 μ L de buffer 2,5X

* O primer a ser utilizado é variável (específico para cada produto de PCR).

- Agitar o mix no vórtex por 5 segundos. Transferí-lo para a placa ou microtubos;
- Fazer a amplificação no termociclador utilizando o seguinte programa:

30 ciclos $\left\{ \begin{array}{l} 20 \text{ segundos a } 95 \text{ }^\circ\text{C} \\ 15 \text{ segundos a } 55^\circ\text{C} \\ 1 \text{ minuto a } 60 \text{ }^\circ\text{C} \end{array} \right.$

- Armazenar a 4 °C.
- Manter a 4°C até a precipitação.

TAMPÃO UTILIZADO: Buffer 2,5X (Save Money):

2 mL de 1 M Tris-HCl (Cf=200 mM) (pH 9.0)

50 µL de 1 M MgCl₂ (Cf=5 mM)

7,95 mL de água ultrapura (EX: milli-Q) autoclavada.

LISTA DOS PRIMER PARA O SEQUENCIAMENTO

- Primer externos 16S rRNA

fd1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')

rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (Weisburg et al., 1991)

- Primer internos 16S rRNA

341-357f - (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3')

357-341r - (5'-CTGCTGCCTCCCGTAGG-3')

685-704f - (5'-GTAGSGGTGAAATSCGTAGA-3')

704-685r - (5'-TCTACGSATTTACCSCTAC-3')

1099-1114f - (5'-GCAACGAGCGCAACCC-3')

1114-1099r - (5'-GGGTTGCGCTCGTTGC-3')

(Lane, 1991)

PRECIPITAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA (MICROTUBOS)

- Transferir todo o DNA sequenciado (10 μ L) para tubos Eppendorf de 500 μ L. Adicionar 2 μ L de acetato sódico/EDTA. Misturar (vórtex). Adicionar 60 μ L de Etanol absoluto. Misturar (vórtex);

- Centrifugar a 14.000 rpm, por 20 min, a temperatura ambiente. Descartar o sobrenadante (totalmente) com micropipeta (P 200). Não deixar a ponteira tocar o precipitado. Usar a mesma ponteira para todos os tubos;

- Adicionar 150 μ L de etanol 70% (diluir em água ultrapura imediatamente antes de usar). Misturar (vórtex) e centrifugar a 14.000 rpm, por 5 min, a temperatura ambiente;

- Descartar o sobrenadante (totalmente) com micropipeta (P 200 e P 10);

- Secar a 40 °C (bloco aquecedor para microtubos), por 10 min;

- Caso as amostras não sejam sequenciadas, armazená-las no freezer a – 20 °C por no máximo 3 semanas.

- Caso as amostras sejam imediatamente sequenciadas no ABI 3100, ressuspender em 10 μ L de Hi-Di Formamide (tirá-la do freezer durante a secagem do DNA), agitar no vórtex e dar um pulso na microcentrífuga a 14.000 rpm.