

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS
BACTERIANOS DE NÓDULOS E RIZOSFERA DE SOJA
EM DIFERENTES MANEJOS DE CULTIVO

Maira Rejane Costa

Bióloga

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Agosto de 2011

D
I
S
S.
/
C
O
S
T
A

M.
R.

2
0
1
1

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS
BACTERIANOS DE NÓDULOS E RIZOSFERA DE SOJA
EM DIFERENTES MANEJOS DE CULTIVO**

Maira Rejane Costa

Orientadora: Prof. Dr. Eliana G. Macedo Lemos

Co-orientador: Dr. Fábio Martins Mercante

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Agosto de 2011

Costa, Maira Rejane
C837c Caracterização molecular de isolados bacterianos de nódulos e rizosfera de soja em diferentes manejos de cultivo / Maira Rejane Costa. - - Jaboticabal, 2011
 xiii, 72 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011
Orientadora: Eliana Gertrudes Macedo Lemos
Banca examinadora: Lúcia Maria Carareto Alves, Maria José Valarini
Bibliografia

1. *Bradyrhizobium* spp. 2. Diversidade genética. 3. fALP. I. Título. II. Jaboticabal- Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 631.461.5

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

MAIRA REJANE COSTA – nascida em Dourados, MS, no dia 02 de agosto de 1983, Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), no ano de 2007. De 2005 à 2009 realizou estágio nas áreas de Microbiologia do Solo com ênfase em Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) e Atributos Microbiológicos do Solo, na *Embrapa Agropecuária Oeste*. Durante o estágio, atuou principalmente nos seguintes temas: avaliação da biomassa microbiana (índices derivados como bioindicadores de qualidade do solo) e fixação biológica de nitrogênio em leguminosas, especialmente soja e feijoeiro. Em 2007 apresentou o trabalho de conclusão do curso, intitulado: "Sobrevivência de *Bradyrhizobium japonicum* em sementes de soja tratadas com fungicidas e os efeitos sobre a nodulação das plantas", sob a orientação do Dr. Fábio Martins Mercante, pesquisador da *Embrapa Agropecuária Oeste*. Em 2009, ingressou no Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), do campus de Jaboticabal SP. No período de 2009-2011, durante a realização do curso de pós-graduação, foram desenvolvidas atividades na área de diversidade genética e molecular de microrganismos fixadores de nitrogênio, no Departamento de Tecnologia, Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas (LBMP), sob a orientação da Prof^a Dr^a Eliana G. de Macedo Lemos.

EPÍGRAFE

A diferença que faz um dia...

Você nunca sabe quando vai viver um dia inesquecível...

Os dias que você pensa que serão grandes... jamais atingem a proporção imaginada...

São os dias comuns, os que começam normalmente...

Esses acabam se tornando os dias mais importantes!

Hoje é o dia em que minha vida começa.

Hoje eu me torno uma cidadã do mundo.

Hoje eu me torno responsável perante alguém que não seja eu mesmo ou meus pais.

Responsáveis por mais que minhas notas.

Hoje, eu me torno responsável perante o mundo.

Pelo meu futuro.

Para todas as possibilidades que a vida tem para oferecer.

A partir de hoje, meu trabalho é aparecer com os olhos atentos e com vontade. Para quê? Não sei.

...Para qualquer coisa.

...Para TUDO.

...Para assumir a VIDA.

...Para assumir o AMOR.

...Para assumir todas as responsabilidades e possibilidades!

Hoje, meus amigos, minha vida começa.

E, eu mal posso esperar!!!

Shonda Rhimes

DEDICATÓRIA

A Deus e aos meus pais Carlos e Silmeire Costa

AGRADECIMENTOS

Como é bom sentir a sensação de missão cumprida. Agradeço a Deus que me fortaleceu durante toda essa caminhada: - sem sua ajuda, nada seria possível.

Agradeço ao meu pai, que sempre me apoiou e me deu muito carinho: - Ah meu ídolo, muito obrigada por seu amor incondicional. Esses olhos verdes conseguiram enxergar meu futuro de longe!

E minha mãe, como posso agradecer esta grande mulher? – Me sinto orgulhosa de tê-la sempre ao meu lado, me escutando, apoiando e estando ao meu lado em todos os momentos desta jornada.

Tenho muito a agradecer aos meus irmãos Marcos e Marcia. Esses dois que escutaram minhas reclamações, minhas dúvidas e compartilharam de tantos momentos bons: - Marcos, obrigada pelas cervejas que me fizeram relaxar quando ia a Dourados e Márcia, como sinto falta da sua companhia para aquele mate.

Ainda neste cenário familiar, não posso esquecer o meu cunhado Renato: - Valeu por me fazer rir quando eu queria chorar.

E como dizia Vinicius de Moraes, "Amigos a gente não faz. Amigos a gente reconhece". Sendo assim, segue meus sinceros agradecimentos às irmãs que Deus me fez escolher, Layana Pimentel e Caroline Prezzotto: - Laya você é demais!! . Carol, você é fantástica, quero ser assim quando crescer! Amo vocês!!

Agradeço ao Clóvis Daniel Borges, Carlos Rocha e Joyce Cocarolli: - Pessoal, como foi importante o ombro amigo de vocês nos momentos que precisei.

Obrigada meu grande amigo, Vladimir Andrei Tarasiuk: - Seu apoio e carinho foram muito importantes para mim.

Jamais se esqueceria da Marta, Matilde e Izabel Cristina, pessoas que não somente passaram pela minha vida, mas que estiveram sempre ao meu lado e dentro do meu coração: - Obrigada pela acolhida quando precisei.

Um agradecimento especial à Fátima e Cecília (Ciça) do Laboratório do Professor Pizauro: - Como foi bom chamá-las de AMIGAS aqui em Jaboticabal.

Obrigada às minhas queridas Helena, Maria Luíza (Malú), Elisângela e Viviane Vieira: - Valeu pelo companheirismo no laboratório.

Agradeço às festas, cervejas e conversas. Dentro deste contexto, um obrigado de coração aos meus companheiros de risadas, Paulo (Paulão), Fernando (Mandioca), Thiago (Magrilo), Bruno (Baby), Rodrigo (Jabá), Felipe (Feipa) Gustavo Claudiano (Mano), Juan Lopes e Anderson Silva (Parazinho): - Como foi bom descobrir o valor do companheirismo, justiça, lealdade e bondade.

Obrigada ao meu inspirador intelectual, Dr. Fábio Martins Mercante: - Fábio, como me fez sua confiança em mim, você me incentivou muito nesta trajetória!

Agradeço à minha grande orientadora, Profa Dra Eliana G. Macedo Lemos: - Obrigada por me acolher em seu laboratório, pela oportunidade para desenvolver este trabalho, pela confiança e por principalmente acreditar nesta vitória que foi a defesa de mestrado.

Por último, mas não sem menos importância, me lembro do Dr. João Carlos Campanharo, Viviane Schultz, Silvana Pompéia, Eliamar Pedrinho e Fabrício: - Obrigada pelos auxílios prestados no laboratório, apoio e paciência com o meu aprendizado.

A todas as pessoas, que direta ou indiretamente contribuíram para a execução dessa dissertação de Mestrado: - Muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 A importância do ciclo do N.....	3
2.2 Fixação do Nitrogênio.....	5
2.3 Fixação Biológica do Nitrogênio (FBN).....	6
2.4 Complexo Nitrogenase.....	8
2.5 Etapas do processo de FBN entre leguminosas e rizóbio.....	11
2.6 Genética da FBN do hospedeiro/simbionte.....	13
2.7 Taxonomia de rizóbios.....	17
2.8 Manejos do solo e diversidade de microrganismos.....	20
2.9 AFLP (Polimorfismo de Comprimento Fragmento Amplificado).....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1 Delineamento experimental e de manejo do solo.....	24
3.2 Isolamento de bactérias.....	26
3.3 Extração de DNA.....	27
3.4 Uso do marcador molecular fAFLP.....	28
3.5 Amplificação da sequência conservada da região do gene 16S rDNA através de PCR utilizando os oligonucleotídeos pA e pc5B.....	30
3.6 Reação da PCR para sequenciamento do fragmento da região do gene 16S rDNA amplificado.....	31
3.7 Sequenciamento automático dos produtos de PCR do gene 16S rDNA.....	32
3.8 Análise das sequências.....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33

4.1 Diversidade genética de isolados de rizóbio sob diferentes manejos do solo, através do uso do marcador molecular fAFLP.....	33
4.2 Diversidade genética de isolados de rizóbio, sob diferentes manejos do solo, através do sequenciamento do gene 16S rDNA.....	39
5. CONCLUSÃO.....	48
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
7. APÊNDICE - Relação de estirpes isoladas de nódulos de soja sobre manejos do solo e safras diferentes.....	69

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Caminhos biológicos e os processos envolvidos no ciclo de nitrogênio.....	4
FIGURA 2 - Modelo da estrutura do complexo nitrogenase.....	9
FIGURA 3 - Modelo da estrutura do funcionamento do complexo nitrogenase.....	10
FIGURA 4 - Eventos morfológicos na FBN que ocorrem na raiz, desde a infecção até a formação do nódulo.....	12
FIGURA 5 - Modelo físico de amostragem nos diferentes sistemas de produção, em Dourados, MS.....	25
FIGURA 6 - Árvore filogenética baseada na diversidade genética, através do uso do marcador fAFLP, de 115 isolados de soja e comparada com as estirpes padrões de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> (5079 e 5080) e <i>B. elkanii</i> (587 e 5019).....	34
FIGURA 7 - Grupo 1 e suas subdivisões referentes a árvore filogenética de diversidade genética gerada através do marcador fAFLP.....	35
FIGURA 8 - Grupo 2 e suas subdivisões referentes a árvore filogenética de diversidade genética gerada através do marcador fAFLP.....	38
FIGURA 9 - Árvore filogenética baseada nas sequências parciais do gene 16S rDNA de estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> spp padrões para inoculantes de soja e 42 isolados de nódulos de soja em campo sob diferentes sistemas de manejo.....	47

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 - Tipos de usos do solo, quantidade de isolados de plantas de soja e característica de cada sistema de manejo empregado para o cultivo da soja.....	26
TABELA 2 - Condições de amplificação da PCR, utilizando se os oligonucleotídeos iniciadores da região do gene 16S rDNA.....	30
TABELA 3 - Etapas do programa de amplificação da região do gene 16S rDNA no termociclador.....	31
TABELA 4 - Reação de sequenciamento parcial do gene 16S rDNA.....	31

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS BACTERIANOS DE NÓDULOS E RIZOSFERA DE SOJA EM DIFERENTES MANEJOS DE CULTIVO

RESUMO- O crescimento da produção e o aumento da capacidade competitiva da soja brasileira estão associados aos avanços científicos e à disponibilização de tecnologias ao setor produtivo. A fim de maximizar os benefícios da FBN, o estudo da diversidade genética de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* relacionada com diferentes sistemas de manejo da cultura da soja é imprescindível para entender as interações entre a população de rizóbios presentes no solo com as estirpes de inoculantes em ambientes diferentes. O objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade genética de rizóbios em solos cultivados com soja sob diferentes sistemas de manejo caracterizados com rotação e sucessão de culturas recomendadas para o estado de Mato Grosso do Sul. A partir de amostras de DNA extraídos destas bactérias foi utilizado o marcador molecular fAFLP para estimar a diversidade genética dos 119 isolados de nódulos de soja, e em seguida realizado o sequenciamento parcial do gene 16S rDNA para definir a posição das bactérias em nível de gênero e, em alguns casos, em nível de espécie. Os resultados obtidos, com base no fAFLP, permitiu a divisão dos isolados em dois grupos. No primeiro grupo posicionaram-se a maioria dos isolados do sistema plantio direto e dois representantes do sistema convencional que pertencem à safra 2006-2007. Em relação ao segundo grupo, foi observada uma heterogeneidade elevada entre os isolados de diferentes safras e sistemas de manejo (convencional, plantio direto e sistema integrado lavoura pecuária. Com a análise de diversidade genética com base no sequenciamento do gene 16S rDNA, as sequências das 42 estirpes (incluindo as estirpes padrões recomendadas para a fabricação de inoculantes para soja) foi constatado a formação de 2 filos: Proteobactérias (com as classes alpha, beta e gama) e Firmicutes. Foi concluído que os diferentes manejos do solo aliados aos sistemas de rotação e sucessão de culturas podem influenciar na diversidade genética de isolados de nódulos de soja. E no sistema de manejo Plantio direto, foi observado maior manutenção e diversidade de bactérias pertencentes ao filo Proteobactéria.

Palavras-Chave: *Bradyrhizobium* spp, diversidade genética, fAFLP, manejos do solo.

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF BACTERIAL ISOLATE FROM RHIZOSFERE NODULES AND SOYBEAN CROP IN DIFFERENT MANAGEMENT

ABSTRACT- The growth of crop production and increased competitiveness of Brazilian soybean are associated with scientific advances and the availability of technology to the productive sector. In order to maximize the benefits of BNF, the study of genetic diversity of *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium elkanii* related to different management systems of the soybean crop is essential to understand the interactions between the population of rhizobia in the soil with the inoculant strains in different environments. The objective of this study was to assess the genetic diversity of rhizobia in soils cultivated with soybean under different management systems characterized by crop rotation and succession recommended for the state of Mato Grosso do Sul. Fluorescent AFLP molecular marker was used to estimate the genetic diversity of 119 isolates from soybean nodules. Samples of DNA extracted from these bacteria were used and partial sequencing of the 16S rDNA was performed to define the position of bacteria at genus level and, in some cases, species level. The results, based on fAFLP, allowed the division of the isolates into two groups. Most isolates of the no-tillage system and two isolates from the conventional system that belong to the 2006-2007 season represented the first group. The second group was represented by a high heterogeneity among the isolates from different crops and management systems (conventional, no-tillage and integrated crop-livestock). The analysis of genetic diversity based on the sequencing of the 16S rDNA of forty-two strains (including standard strains recommended for the production of inoculants for soybeans) allowed the formation of two phyla: Proteobacteria (with the alpha, beta and gamma classes) and Firmicutes. Also a sister group of Firmicutes was formed by non-cultivable. It was concluded that the different soil management practices combined with the crop rotation and succession can influence the genetic diversity of isolates from soybean nodules. And in no tillage management system, was observed more maintenance and diversity of bacteria belonging to the phylum Proteobacteria.

Keywords: *Bradyrhizobium* spp, genetic diversity, fAFLP, soil management practices.

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas três décadas, a soja (*Glycine max* (L.) Merrill) foi a cultura que mais cresceu no Brasil, correspondendo 49% da área plantada em grãos no país (MAPA, 2011). Das 214 mil toneladas produzidas no mundo, o país é responsável por 25% dessa produção que compreende um valor de 56 mil toneladas o que faz assim dele o segundo maior produtor razão pela qual essa leguminosa possui importância na economia brasileira (MAPA 2010).

A estimativa da área cultivada com soja na safra 2010/11 é de 24,08 milhões de hectares, indicando um incremento no crescimento de 2,6% o que corresponde a uma área de aproximadamente de 611 mil hectares (CONAB, 2011).

O crescimento da produção e o aumento da capacidade competitiva da soja brasileira estão associados aos avanços científicos e à disponibilização de tecnologias ao setor produtivo. Entre estas tecnologias, destaca-se o desenvolvimento de inoculantes com estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio (coletivamente chamados de rizóbios), selecionadas pela pesquisa e com elevada eficiência simbiótica, que resultou na independência da cultura em relação aos fertilizantes nitrogenados, sendo fundamental para viabilizar economicamente a cultura da soja no país (MERCANTE et al., 2011).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo no qual alguns procariontes comumente e coletivamente chamados de rizóbios possuem a capacidade de estabelecer simbiose com plantas leguminosas. Estas bactérias diferenciam-se em bacterióides nos nódulos da planta hospedeira e através da enzima nitrogenase reduzem o nitrogênio atmosférico em amônia. Em troca, a planta supre a bactéria com fontes de energia e carbono para sua manutenção (ZAKHIA & LAJUDIE., 2001; MERCANTE et al., 2002; EPSTEIN & BLOOM., 2006).

O processo de inoculação de sementes de soja com *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) e *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019) apresenta-se como uma tecnologia de baixo custo para o fornecimento de N, sendo

também responsável pelo aumento da produção desta cultura no país (CHUEIRE et al., 2000).

A fim de maximizar os benefícios da FBN, o estudo da diversidade genética de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* relacionada com diferentes sistemas de manejo da cultura da soja é imprescindível para entender as interações entre a população de rizóbios presentes no solo com as estirpes de inoculantes em ambientes diferentes (GALLI-TERASAWA et al., 2003). Deve-se ressaltar que o sucesso da FBN, no Brasil, é resultado de pesquisas e de seleção de estirpes compatíveis com as cultivares brasileiras, com alta eficiência de FBN e adaptadas às diferentes condições ambientais em que a soja é cultivada no país.

Neste contexto, as análises moleculares para avaliações de diversidade genética de microrganismos são indispensáveis para pesquisas de filogenia, taxonomia, competitividade e ecologia de rizóbio. O uso do marcador molecular fAFLP (Amplified Fragment Length Polimorphism), que tem como base o uso da PCR, na sua forma fluorescente (fAFLP), é uma técnica utilizada para visualizar milhares de fragmentos de restrição de DNA amplificados (VOS et al., 1995). Segundo ZABEAU & VOS (1993), esta técnica é usada em testes de paternidade ou "fingerprints", estudos de monitoramento de identidade de um isolado ou de similaridade entre diversos isolados (diversidade genética).

Considerando o sistema dinâmico dos microrganismos do solo associados aos diferentes sistemas de produção agrícola empregado para o cultivo da soja, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a variabilidade genética de rizóbios em solos cultivados com soja sob diferentes sistemas de manejo caracterizados com rotação e sucessão de culturas recomendadas para o estado de Mato Grosso do Sul.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A importância do Ciclo do Nitrogênio

O nitrogênio (N) é considerado o elemento essencial para as plantas, pois está presente na composição das mais importantes biomoléculas, tais como ATP, NADPH, NADH, clorofila, proteínas e inúmeras enzimas (MIFLIN & LEA.,1976; HARPER., 1994; BREDEMEIER & MUNDSTOCK., 2000).

As principais fontes fornecedoras de N necessário ao crescimento das plantas são 1 - nitrogênio do solo, proveniente da decomposição da matéria orgânica e das rochas, 2 - nitrogênio fornecido por fertilizantes, e 3 - nitrogênio fornecido pelo processo de fixação biológica do nitrogênio atmosférico. Existe, também, uma pequena contribuição pela reação das descargas elétricas com o N, resultando em nitrato, que é adicionado ao solo. O processo pelo qual o nitrogênio circula através das plantas e do solo pela ação de organismos vivos é conhecido como “ciclo do Nitrogênio” (Figura 1).

No solo o nitrogênio uma vez fixado em amônia ou nitrato inicia um ciclo biogeoquímico e passa por várias formas orgânicas e inorgânicas antes de retornar a N₂. Os aminoácidos, amônia e amônio produzidos a partir do nitrogênio ou liberados pela decomposição de matéria orgânica do solo, tornam-se objeto de competição entre plantas e microrganismos (Figura 1). Como resultado dessa competição, as plantas desenvolveram diversos mecanismos para a fixação do nitrogênio (SIQUEIRA & FRANCO., 1988; FISHER & NEWTON., 2002) .

Existem organismos que vivem próximo à superfície do solo e fixam o nitrogênio através da decomposição de animais e vegetais mortos. As bactérias saprófitas e várias espécies de fungos são os principais responsáveis pela decomposição de materiais orgânicos mortos (SIQUEIRA & FRANCO., 1988). Estes microrganismos utilizam as proteínas e os aminoácidos e liberam o excesso de nitrogênio sob a forma de amônio.

Ao morrer e ser degradados libera seu nitrogênio no solo, na forma de moléculas de amônia (amonificação).

Outros tipos de bactérias transformam a amônia em nitratos (nitrificação) e é, nessa forma, que as plantas absorvem o nitrogênio do solo, por meio de suas raízes (SIQUEIRA & FRANCO., 1988). Os herbívoros obtêm nitrogênio ao alimentarem se das plantas (Figura 1).

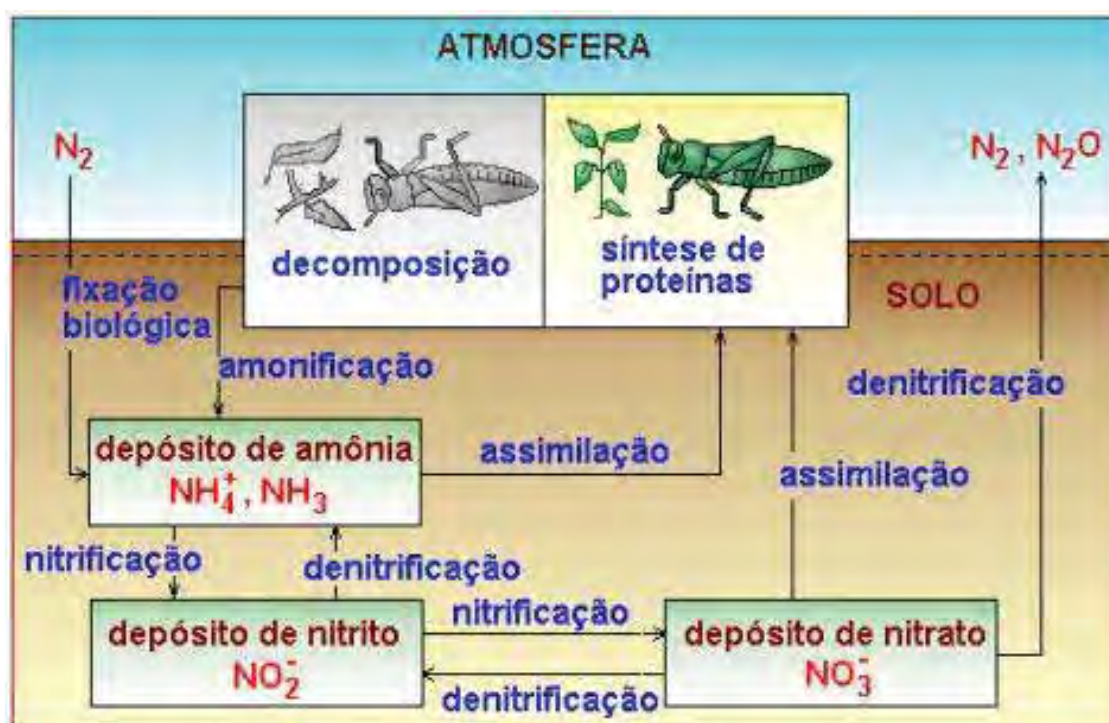


Figura 1_ Caminhos biológicos e os processos envolvidos no ciclo de nitrogênio.

Fonte_ <http://arcadenoe.ning.com/profiles/blogs/a-cultura-industrial-e-ciclo>

Os rizóbios são bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico que em resposta a sinais emitidos por plantas leguminosas, infectam e formam nódulos nas raízes dessas plantas. Ao fixarem o nitrogênio do ar, essas bactérias fornecem parte dele às plantas (FISHER & NEWTON., 2002) propiciando o nitrogênio necessário para o seu desenvolvimento. Além disto, também disponibilizam o nitrogênio para outras culturas quando é adotada a prática da rotação de culturas.

A devolução do nitrogênio à atmosfera, na forma de N_2 , é feita graças à ação de outras bactérias, chamadas denitrificantes. Elas podem transformar os nitratos do solo em N_2 , que volta à atmosfera, fechando o ciclo (Figura 1).

2.2 Fixação do nitrogênio

A atmosfera contém grandes quantidades de moléculas de nitrogênio (N_2), cerca de 80% do volume. Embora esteja presente em grande porcentagem no ar atmosférico, a forma do N_2 molecular não é assimilável para a maioria dos organismos, devido à tripla ligação estável entre os dois átomos de nitrogênio. A energia necessária para quebrar esta tripla ligação e gerar formas reativas (como amônia, por exemplo) é oriunda de processos natural ou industrial conhecidos como Fixação do nitrogênio.

A fixação natural do nitrogênio (atmosférica e biológica) se dá a uma taxa de 190×10^{12} g/nitrogênio/ano, desse total as emissões relâmpagos são responsáveis por 8%, um adicional de 2% é proveniente do ácido nítrico (HNO_3) que se precipita na Terra em forma de neve ou chuva e os 90% restantes resultam da fixação biológica de nitrogênio (FBN), em que bactérias fixam o nitrogênio molecular (N_2) em amônia (NH_3). Os procariontes que fixam nitrogênio, em contraste com os processos industriais, realizam a FBN em temperaturas e pressões ambientes (SIQUEIRA & FRANCO., 1988; EPSTEIN E BLOOM., 2006).

A fixação industrial do nitrogênio é um processo que consiste em converter nitrogênio e hidrogênio molecular em amônia quando submetido à temperatura (400-650°C) e pressão elevadas (20-40mpa). Processo conhecido como Haber-Bosch. As necessidades para esta síntese química são: hidrogênio (derivado do gás petróleo); catalisador contendo ferro; altas temperaturas (300 a 600°C e altas pressões (200 a 800 atm.)). Consequentemente existe um custo elevado para a síntese de fertilizantes, resultante principalmente da necessidade de gastos com fontes de petróleo, que também não são renováveis (SIQUEIRA & FRANCO., 1988; FISHER & NEWTON., 2002).

Assim a vantagem da fixação biológica sobre a produção industrial de fertilizante é que para a síntese de fertilizante nitrogenado o processo industrial -Haber Boch- consome 2% da energia mundial (BRITISH PETROLEUM, 1996). Além do consumo de energia de fontes não renováveis, os fertilizantes nitrogenados possuem baixa eficiência (em torno de 50%) pelas plantas, levando a estimativas da necessidade de 480 kg de N para a produção de 3.000 Kg ha⁻¹ de soja (MERCANTE *et al.*, 2004). De acordo com o exposto acima, observa-se, uma necessidade de explorar todas as possibilidades que visam incrementar de forma positiva a Fixação Biológica de Nitrogênio.

2.3 Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN)

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) é muito importante e tem sido explorada indiretamente desde muitos séculos, quando a rotação de culturas com leguminosas era praticada para melhorar a fertilidade do solo. Hoje, esse processo é conhecido e na natureza é realizado por apenas algumas classes de microrganismos, denominados diazotróficos (FRANCO & SIQUEIRA., 1988; FISHER & NEWTON., 2002; BALDANI *et al.*, 2009).

A diazotrofia, habilidade de reduzir o nitrogênio atmosférico à amônia é uma característica encontradas em *Bacteria* e *Archeabacteria* (SAWADA *et al.*, 2003). Embora a habilidade de reduzir nitrogênio atmosférico à amônia esteja presente em vários gêneros às condições fisiológicas necessárias para a FBN variam de espécie para espécie.

Os rizóbios são caracterizados por fixarem nitrogênio atmosférico em uma relação de simbiose com plantas leguminosas. Nessa relação simbiótica as raízes são infectadas por bactérias bastonetes, classificadas na ordem Rhizobiales, nas famílias Rhizobiaceae , Phyllobacteriaceae, Bradyrhizobiaceae e Hyphomicrobiaceae (GARRITY & HOLT.,2001).

No entanto, existem bactérias fixadoras de nitrogênio de vida livre, as que se associam com raízes e colmos de plantas e alguns tipos de algas azuis (BERINGER et al., 1979). Todavia a extensão da FBN para plantas não leguminosas encontra-se presentes em diversos estudos (BALDANI et al., 2009).

A enzima nitrogenase presente nos bacteroides é responsável pelo sucesso da fixação biológica de nitrogênio e é expressa quando: a) bactérias que vivem em simbiose com leguminosas (*Rhizobium* e *Bradyrhizobium*) durante a fixação simbiótica do N₂; b) microrganismos diazotróficos associativos, como: *Beijerinckia* spp. e cana-de-açúcar, *Pseudomonas* sp e arroz, c) bactérias de vida livre (*Azotobacter*, *Clostridium* e *Klebsiella*) e d) algumas cianobactérias (*Anabaena*) (BALDANI et al., 2009) .

A soja é uma das leguminosas mais focalizadas no processo de fixação biológica de nitrogênio. No Brasil, a obtenção total de N fixado pelo complexo soja e *Bradyrhizobium* tem sido estimado em até 94% (HUNGRIA et al., 2006) e que, na ausência da simbiose, os custos com adubação nitrogenada se elevam, resultando em perda de competitividade comercial da soja (HUNGRIA et al., 2007; GELAIM et al., 2011).

A simbiose entre planta e microrganismo ocorre com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* spp e *Sinorhizobium* sp . As estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 de *Bradyrhizobium japonicum* e as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 de *Bradyrhizobium elkanii* são recomendadas, segundo a RELARE, para uso na produção de inoculantes comercialmente produzidos para o processo de FBN em plantas de soja.

No entanto, a eficiência da FBN depende de fatores químicos (concentração de cloreto de sódio, metais, temperatura, pH, níveis tóxicos de alumínio e manganês e níveis baixos de cálcio, potássio, magnésio e molibdênio), físicos (estrutura e erosão do solo, umidade, temperatura), biológicos (ciclagem de nutrientes, matéria orgânica do solo) e genéticos (genes *nif* e *nod*, proteína reguladora NodD, substâncias quimiotáticas, Fatores Nod) relacionados com a simbiose soja/bactéria.

Estudos realizados em condições edafoclimáticas de Mato Grosso do Sul, teve como objetivos avaliar o efeito da reinoculação da soja em solos sob sistema plantio direto ou convencional, identificar as estirpes e/ou combinações de estirpes de

Bradyrhizobium mais eficientes além de verificar os efeitos da aplicação de diferentes doses de adubo nitrogenado na cultura da soja. Como resultado, a adição de fertilizantes nitrogenados reduziu a nodulação em plantas de soja, não foi observado incrementos no rendimento de grãos na cultura da soja com a adição de fertilizantes nitrogenados e a reinoculação pode proporcionar ganhos significativos no rendimento dos grãos de soja (MERCANTE *et al.*,2004).

Em outro trabalho objetivou-se avaliar o potencial simbiótico de variantes espontâneos isolados de estirpes de bradirrizóbios que já apresentam características desejáveis para a produção de inoculantes, como as estirpes SEMIA 587, SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 5080, como uma ferramenta auxiliar ao processo de seleção de novas estirpes que possam competir com a população de bradirrizóbios naturalizada nos solos cultivados e fixar eficientemente o N₂ na cultura da soja. Como resultados, CARVALHO *et al* (2005) observaram que variantes com diferentes potenciais para fixação de nitrogênio podem coexistir numa mesma população de bradirrizóbios, podendo alterar a eficiência simbiótica e a competitividade das estirpes utilizadas em inoculantes para a cultura da soja.

2.4 Complexo Nitrogenase

A origem da nitrogenase está relacionada com a mudança que ocorreu na atmosfera terrestre ancestral durante as etapas primordiais para a evolução dos seres vivos. A sensibilidade do complexo da nitrogenase a diversos agentes oxidantes é uma evidência de que este complexo evoluiu em condições ambientais livres de elementos como O₂, o qual é limitante para uma eficiente transformação do N₂ atmosférico em moléculas de amônio (BALDANI *et al.*, 2009).

O processo de fixação do nitrogênio tanto industrial quanto biológico requer uma grande quantidade de energia devido à ativação necessária para quebrar a tripla ligação estável no N₂. Segundo HEYTLER *et al.*, (1994) os cálculos do metabolismo de

carboidratos em leguminosas mostram que uma planta consome 12g de carbono orgânico por nitrogênio fixado.

BURK & BURRIS., (1941) descrevem o complexo da enzima nitrogenase como um sistema de dois componentes do tipo metalo-proteína (as proteínas Fe e MoFe), sendo que nenhuma das quais tem atividade catalítica por si só (Figuras 2 e 3). A nitrogenase de molibdênio consiste de uma ferro-proteína (Fe-proteína) e de uma molibdênio-ferro-proteína (MoFe-proteína). A Fe-proteína funciona como doadora de elétrons para a MoFe-proteína (que contém o cofator da enzima, FeMoco), num processo dependente de hidrólise de MgATP.

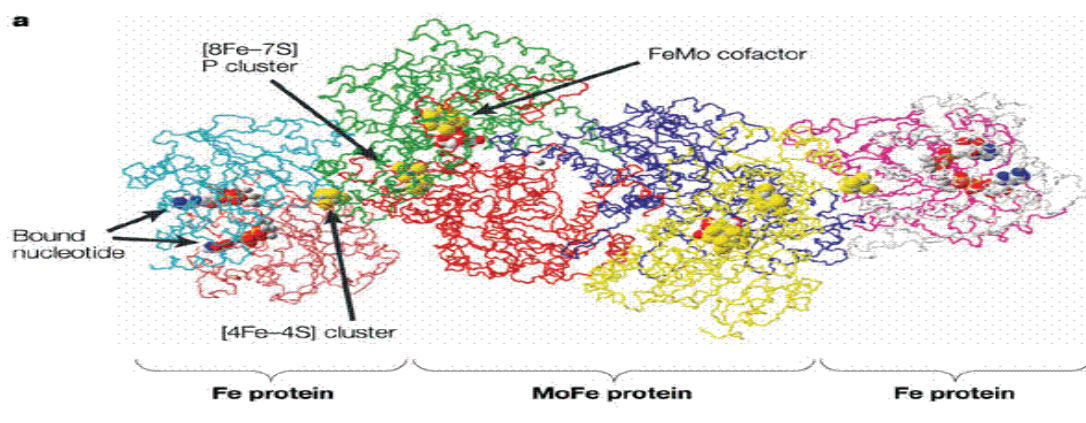


Figura 2: Modelo da estrutura do complexo nitrogenase (dinitrogenase redurase em azul e verde; dinitrogenase em cinza e rosa).

Fonte: <http://www.nature.com/nrmicro/journal/v2/n8/images/nrmicro954-f1.gif>

No processo de FBN a redução de N_2 para NH_3 é catalisada pela enzima nitrogenase. Contudo sob condições naturais, a nitrogenase reduz H^+ a H_2 gasoso e assim esse processo pode competir com a redução de N_2 . Entretanto, alguns rizóbios, contém uma enzima, a hidrogenase, que pode romper as moléculas de H_2 formado e gerar elétrons para a redução de N_2 , aumentando assim a eficiência da fixação biológica de nitrogênio (MARSCHNER, 1995).

No caso dos microrganismos aeróbios (*Rhizobium* e *Bradyrhizobium*), cria-se o paradoxo da necessidade de O_2 para gerar ATP e redutores para a nitrogenase, mas ao

mesmo tempo manter uma concentração de O_2 suficientemente baixa para não inativar a enzima. A proteína responsável pelo transporte de oxigênio nos microsimbiontes é a leghemoglobina que fornece cuidadosamente quantidade controladas de O_2 (FISHER & NEWTON., 2002).

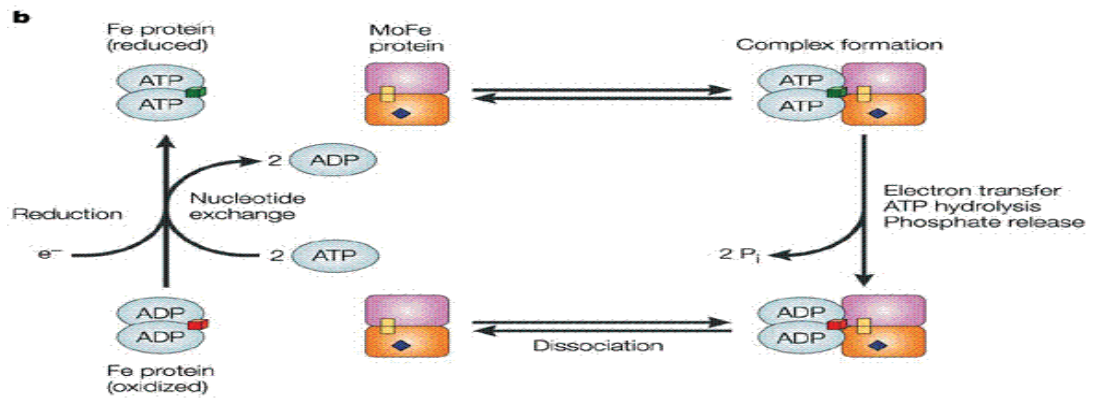


Figura 3: Modelo da estrutura do funcionamento do complexo nitrogenase.

Fonte: <http://www.nature.com/nrmicro/journal/v2/n8/images/nrmicro954-f1.gif>

Assim o complexo enzimático da dinitrogenase de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* pode ser irreversivelmente inativado pela exposição aos níveis atmosféricos desse gás, com meias-vidas no ar de aproximadamente 30 segundos a 10 minutos. Para evitar a inativação das enzimas quando expostas a determinadas concentrações de oxigênio, os microrganismos fixadores de nitrogênio desenvolveram mecanismos onde eles funcionam sob condições anaeróbias naturais ou em ambiente interno anaeróbio na presença de aproximadamente 21% de oxigênio do ambiente externo (EPSTEIN & BLOOM.,2006).

Todavia, as bactérias desenvolveram dois mecanismos de proteção para resolver o problema de toxicidade do oxigênio nos nódulos contra a ação do oxigênio; 1) as células do cortex da raiz perto da superfície externa dos nódulos, formam uma barreira impedindo a difusão desse gás e 2) A leg-hemoglobina, proteína, produzida pela planta, que capta o oxigênio, desviando seu fluxo para o sistema de transferência de

elétrons, de modo que ele não pode interferir na atividade da nitrogenase (EPSTEIN & BLOOM.,2006) .

Além de reduzir N-atmosférico a amônia, uma das características funcionais da nitrogenase é sua baixa especificidade por substrato, sendo também capaz de reduzir outras moléculas com ligações triplas, como acetileno, azida de nitrogênio, cianeto de hidrogênio e óxido nitroso (SILVER & POSTGATE.,1973; BALDANI *et al.*, 2009).

2.5 Etapas do processo de FBN entre leguminosas e rizóbios

A simbiose entre rizóbios e leguminosas é um processo deliberado. Para a formação dos nódulos, o rizóbio, introduzido através da inoculação ou presente no solo precisa se multiplicar na superfície antes de penetrar nas raízes.

Inicialmente as plantas liberam atrativos químicos que desencadeiam a ligação entre a bactéria e a parede celular do pêlo absorvente – raiz (Figura 4). Geralmente os nódulos são visíveis de cinco a dez dias após o plantio, enquanto que a atividade da nitrogenase só é detectada quatro a 10 dias após o aparecimento dos mesmos (FRANCO & SIQUEIRA.,1988). Em todas as leguminosas a fixação de N₂ não começa até que a planta possa dispor de parte dos produtos da fotossíntese para esta atividade, ou até que haja um excesso de C em relação ao N da planta (SIUQEIRA & FRANCO.,1988;EPSTEIN & BLOOM.,2006;)

A bactéria penetra no sistema radicular da soja, através dos pelos radiculares, e forma os nódulos. Dentro dos nódulos, a ligação tripla dos átomos do N₂ é quebrada pelo complexo enzimático da nitrogenase e o N₂ é transformado em amônia, forma de N que a soja pode absorver e utilizar para sua nutrição (PERRET *et al.*,2000). A amônia liberada pelas células bacterianas é absorvida pela planta e rapidamente convertida em formas orgânicas (amidas ou ureídos), antes de ser exportada (RHIJN & VANDERLEYDEN.,1995) . Em plantas de soja a amônia é convertida em alantoína, ácido alantóico e citrulina (ureídos) que transportam o nitrogênio de locais de fixação

para locais em que sua desanimação fornecerá nitrogênio para a síntese de aminoácidos e nucleosídeos.



Figura 4: Eventos morfológicos que ocorrem na raiz, desde a infecção até a formação do nódulo.

Fonte: www.plantphys.net

A migração das bactérias para as raízes das plantas hospedeiras é uma resposta quimiotática mediada por atrativos químicos (flavonóides, betaínas e lectinas) secretados pelas raízes.

As substâncias quimiotáticas são produzidas nos pêlos radiculares e receptores da leguminosa para fatores Nod, no qual sua função consiste em direcionar rizóbios determinados para hospedeiros apropriados e facilitar a ligação do rizóbio às paredes celulares de um pêlo radicular. Estes atrativos ativam a proteína (NodD) do rizóbio, a qual induz então, a transcrição dos outros genes *nod* do rizóbio. Os genes *nod* do rizóbio ativados pelo *Nod D* codificam proteínas de nodulação envolvidas na biossíntese de fatores *Nod* (RHIJN & VANDERLEYDEN.,1995; TEIXEIRA., 1997).

Os processos de infecção e organogênese ocorrem simultaneamente durante a formação do nódulo radicular (Figura 4). Os rizóbios ligados aos pêlos radiculares liberam fatores Nod que induzem a curvatura do pêlo radicular tornando-se circundados pelo pequeno compartimento formado pela curvatura do pêlo. A parede celular do pêlo

radicular se degrada nas regiões de curvatura permitindo o acesso direto das células bacterianas à membrana plasmática vegetal (EPSTEIN E BLOOM., 2006).

O cordão de infecção é uma etapa que consiste na formação de uma extensão tubular interna da membrana plasmática produzida pela fusão das membranas das vesículas derivadas do Complexo de Golgi chamado de sítio de infecção. Os rizóbios se proliferam e a linha de infecção alonga-se através do pelo radicular e de camadas de células corticais em direção ao primórdio do nódulo. Quando a linha de infecção alcança células especializadas dentro do nódulo, sua extremidade funde-se com a membrana do hospedeiro e libera células bacterianas que são cobertas por uma membrana derivada da membrana plasmática da célula hospedeira. As ramificações da linha de infecção possibilitam a bactéria infectar muitas células (MYLONA *et al.*, 1995).

O primórdio do nódulo se forma na posição oposta aos polos do protoxilema do feixe vascular da raiz e é composto por células corticais radiculares infectadas que se diferenciam e começam a se dividir.

Os bacteroides são organelas endossimbiontes fixadoras de N₂ que se formam quando a planta emite sinais e as bactérias param de se dividir.

2.6 Genética da FBN do hospedeiro/simbionte

O estudo com genes envolvidos na FBN teve como base o organismo *Klebsiela pneumoniae* onde se verificou que os genes encontram-se agrupados em uma região do genoma abrangendo 24 Kb (1 Kb= 1.000 pares de bases), organizados em 7-9 operons (*nifJ*, *nifHDKTY*, *nifENX*, *nifUSVWZ*, *nifM*, *nifF*, *nifLA* e *nifBQ*) e identificados 20 genes (ARNOLD *et al.*, 1988). Devido ao envolvimento direto dessas regiões codificadoras com o processo de FBN, esses genes foram denominados de *nif* (nitrogen fixation) (STREICHER *et al.*, 1972; DIXON *et al.*, 1977; KENNEDY, 1977; ELMERICH *et al.*, 1978; MACNEIL *et al.*, 1978; MERRICK, 1988, ARNOLD *et al.*, 1988; TEIXEIRA., 1997).

Assim a FBN é um processo complexo realizado por genes denominados *nif* que codificam para proteínas que participam neste processo e por genes que participam na formação dos nódulos que são chamados genes de nodulação, *nod* ou *nol*. Os genes *nod* são classificados como comuns ou como específicos ao hospedeiro (RHIJN & VANDERLEYDEN.,1995; TEIXEIRA., 1997).

Além da função estrutural, outros genes *nif* estão relacionados com outros processos durante a FBN, como por exemplo, geração de energia para a nitrogenase, processamento e maturação pós traducional da nitrogenase e regulação da expressão ao nível de transcrição. Os genes *nif* HDK codificam as proteínas estruturais do complexo enzimático nitrogenase que é caracterizado pela presença de duas metaloproteínas, a Fe-proteína e a MoFe- proteína (TEIXEIRA., 1997).

No solo as bactérias são atraídas para a rizosfera após a liberação de exudatos (isoflavonoides, lecitinas) que ativam a transcrição do operon Nod box (*nod* ABC), que é regulado pela proteína NodD, induzindo a expressão dos genes *nod* (RHIJN & VANDERLEYDEN., 1995;TEIXEIRA., 1997; EPSTEIN & BLOOM.,2006).

Os genes com funções essenciais dividem se em dois grupos; 1) Genes essenciais da nodulação (genes *nod*, *nol* e *noe*) no qual são divididos em três classes, são elas: genes *nod* comuns, específicos e regulatório. 2) genes essenciais envolvidos nos estádios de infecção e formação do nódulo (genes *exo*, *lps*, *ndv*) que são responsáveis pela formação/alterações da superfície celular bacteriana e desenvolvimento nodular.

Os genes essenciais da nodulação denominados *nod* comuns são chamados de induzíveis (MULLIGAN & LONG., 1985) e se apresentam, em algumas bactérias, na forma do operon *nod*ABC sendo essenciais nos estádios de pré-infecção e responsáveis pela síntese da estrutura do Fator Nod apresentando homologia funcional entre os rizóbios.

Como resultado da expressão dos genes *nod* ocorre a síntese de oligossacarídeos lipoquitínicos ou então chamados de “Fatores *nod*” que estão relacionadas com o processo de encurvamento do pelo radicular, divisão celular córtex

raiz, indução do meristema do nódulo e seleção planta – microorganismo (RHIJN & VANDERLEYDEN.,1995).

Os Fatores Nod é um sistema molecular de reconhecimento que permite aos pêlos radiculares promover a entrada de rizóbios. A diversidade da estrutura dos Fatores Nod e suas respectivas plantas hospedeiras baseia se na aquisição dos genes nod ABC que ocorreu algo paralelo a evolução dos rizóbios (MOULIN et al., 2004).

Em 2003, RADUTOIU e colaboradores, trabalharam com os mutantes de da leguminosa *Lotus japonicus*. Eles descobriram que plantas com mutações em dois genes, ou NFR1 e NFR5, não respondem ao Fator Nod e, portanto não são infectados pelo rizóbio.

TOURNER & YOUNG (2000) indicam que a diversificação entre linhagens de rizóbios ocorreu antes do aparecimento de leguminosas. A capacidade de nodulação desenvolveu se em uma linhagem de bactérias e que possivelmente os genes simbióticos foram transferidos para diferentes gêneros e espécies através da transferência lateral (GALIBERT et al.,2001; KANEKO et al., 2000, 2002; SULLIVAN & RONSON, 1998; SULLIVAN et al., 2002).

Assim os genes *nod* comuns são caracterizados por apresentarem regiões no DNA que são estruturalmente conservadas e funcionalmente intercambiáveis entre espécies de *Rhizobium*, *Azorhizobium* e *Bradyrhizobium* sem alterar a gama de hospedeiros (MARTINEZ et al., 1990; RHIJN e VANDERLEYDEN., 1995; TEIXEIRA.,1997).

Alterações nos genes da nodulação podem provocar ausência de nodulação (nod⁻) afetando assim a FBN. Por exemplo, em *Rhizobium etli*, o gene NodA, é separado por cerca de 20kb da genes nodBC. A inativação dos genes nodABC inibe a capacidade de provocar qualquer reação simbiótica na planta, incluindo o encurvamento do pelo da raiz, formação do cordão de infecção, divisões das células corticais, formação de nódulos, tipo de desenvolvimento do nódulo e a localização do nódulo (VÁSQUEZ et al., 1991; RHIJN & VANDERLEYDEN.,1995).

Diferentes dos genes *nod* comuns, os genes *nod* específicos são responsáveis pela nodulação de uma planta específica e, portanto esses genes não apresentam

homologia funcional aos genes das demais espécies de rizóbios. Além dos genes *nod* comuns que são encontrados em todas as bactérias e que são essenciais para a simbiose, os genes *nod* específicos são responsáveis pela diversidade das estruturas nod e plantas hospedeiras. Eventos complexos como aquisição de genes específicos para a simbiose e transferência lateral foram processos que favoreceram a evolução desses microrganismos (MOULIN et al., 2004).

Estudos com mutantes dos genes *exo* (síntese de exopolissacarídeos), genes *lps* (síntese de lipossacarídeos) e genes *ndv* (síntese de polissacarídeos capsulares ou antígenos K e B-1,2 glucanas) podem resultar em nódulos presentes (*nod*⁺) na rizosfera, porém com ausência de fixação biológica de nitrogênio (*fix*⁻) (RHIJN E VANDERLEYDEN.,1995).

O gene *nod D* regulatório, que é expresso de modo constitutivo através da transcrição do operon nod ABC (*nod box*), produz a proteína que regula a transcrição dos outros genes *nod* (Figura 4).

Em síntese, os genes *nod A*, *nod B* e *nod C* (genes *nod* comuns) são encontrados em todas as estirpes de rizóbios, enquanto os específicos ao hospedeiro, como *nod P*, *nod Q* e *nod H*, ou *nod F*, *nodE* e *Nod L*, diferem entre as espécies de rizóbio, e determinam a gama de hospedeiros.

Em *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* e *Rhizobium loti* os genes da nodulação, especificidade hospedeira (genes específicos) e da fixação do nitrogênio estão localizados em regiões do cromossoma (APPELBAUM et al.,1988; CHUA et al., 1985; GOETHALS.,1989; RHIJN & VANDERLEYDEN.,1995). Situação diferente ocorre na maioria das espécies de *Rhizobium* que esses mesmos genes encontram-se em um DNA extra cromossomal, chamado de PSYM – plasmídeo simbiótico (MERCANTE et al., 2002).

Contudo além dos genes *nif*, *nod* outros genes também são importantes durante a FBN. Tais como os genes *ntrA*, *ntrBC*, *fix*, *fdx* e *rnf* que codificam para proteínas que indiretamente atuam na FBN desempenhando funções como regulação ao nível de metabolismo geral dos compostos nitrogenados, sensoreamento e sinalização do nível

de N celular, transporte de elétrons para a nitrogenase e até o estabelecimento da interação bactéria-planta (TEIXEIRA., 1997).

2.7 Taxonomia de rizóbios

A taxonomia de bactérias, em geral, esteve em estado de fluxo por mais de 100 anos, pois sistematas davam grande valor a testes fenotípicos e características morfológicas nos antigos esquemas de classificação, resultando na formação de grupos taxonômicos relativamente heterogêneos e muitas vezes artificiais.

Para estudos de taxonomia de rizóbio eram utilizados testes morfológicos, fisiológicos, bioquímicos, enzimático e simbiótico (VINCENT., 1970; JORDAN.,1984). Porém com os avanços da biologia molecular, estudos de taxonomia, ecologia e competitividade de rizóbios, vem ganhando espaço crescente nas pesquisas com esse afim. Hoje os maiores avanços para estudo de filogenia e taxonomia estão sendo obtidos pela comparação das sequências de nucleotídeos do DNA, em especial a região que codifica 16S rRNA, considerado conservado entre as bactérias, mas ao mesmo tempo suficientemente variável e com uma quantidade de informações capaz de revelar, claramente, as relações filogenéticas entre as espécies (WOESE., 1987; WEISBURG et al., 1991).

Quanto aos estudos taxonômico das bactérias da espécie *Rhizobium japonicum*, a partir de 1982, foram reclassificadas em um novo gênero, *Bradyrhizobium* (“bradus”, grego, significando lento), que apresentava uma única espécie definida, *Bradyrhizobium japonicum* (JORDAN,1984). Em suma aproximadamente até 1984 para a ordem Rhizobiales havia uma família, dois gêneros e seis espécies.

Entretanto após os avanços na biologia molecular como ferramenta para taxonomia, principalmente nas análises que consideram o gene 16S rRNA, a classificação sistemática da ordem Rhizobiales encontra se organizada em quatro famílias (Bradyrhizobiaceae, Hyphomicrobiaceae, Phyllobacteriaceae e Rhizobiaceae), seis gêneros (*Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*,

Allorhizobium e *Azorhizobium*), mais de trinta espécies e diversas biovares (GARRITY & HOLT., 2001; CHUEIRE et al., 2003; TOLEDO et al., 2009).

KUYKENDALL et al. (1992) sugeriram a subdivisão de *Bradyrhizobium* em duas espécies, *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* após a detecção da grande variabilidade genética e fisiológica, observadas por alguns autores, entre as estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* (CHUEIRE et al., 2000). Todavia, com a utilização de métodos modernos de sistemática bacteriana, como a taxonomia numérica, hibridização de ácidos nucleicos, análise 16S rRNA, entre outras demonstrou a diversidade genética dentro da família Bradyrhizobiaceae.

As diferenças morfológica, fisiológica e genética entre as espécies *Bradyrhizobium japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) e *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019) recomendadas comercialmente para a cultura da soja foram confirmadas por alguns estudos. RUMJANEK (1993) analisou por hibridização 16S rRNA e indicou que as SEMIAS 587 e 5019 pertenciam a *Bradyrhizobium elkanii*.

LEMOS (1994) com a análise de múltiplos locos enzimáticos, sorologia, morfologia de colônia e atividade de hidrogenase confirmou a divisão de dois grupos das estirpes recomendadas para inoculantes SEMIA 5079-5080 pertencentes à espécie *B. japonicum* e SEMIA 587-5019 pertencentes a *B. elkanii*. Essa divisão também foi confirmada por LUNGE et al (1994) com o uso de RAPD e RFLP(com genes *nif* e *nod*).

Em 2003, estudos realizados por CHUEIRE et al., determinaram também a posição taxonômica das estirpes utilizadas em inoculantes comerciais para as duas culturas, pelo sequenciamento da região do DNA que codifica o gene 16S rRNA. O sequenciamento permitiu definir que duas das estirpes recomendadas para a cultura da soja, SEMIA 587 e SEMIA 5019 (= 29 w), pertencem à espécie *Bradyrhizobium elkanii* e as duas outras, SEMIA 5079 (=CPAC 15) e SEMIA 5080 (= CPAC 7), à espécie *B. japonicum*.

A indicação de uma estirpe de rizóbio, a ser utilizada como inoculante, só ocorre após estudos detalhados que permita a avaliação de seu potencial em estabelecer a associação simbiótica e fixar biologicamente o nitrogênio, bem como sua capacidade de competição com as bactérias nativas que atuam na nodulação de uma determinada

leguminosa. Esta indicação acontece nas reuniões dos especialistas a cada dois anos, as RELARE (Rede de Laboratórios para a Recomendação, Padronização, e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola).

Diferentes instituições brasileiras de pesquisa são depositárias de coleções de rizóbio/bradirrizóbios. Mas uma delas, a FEPAGRO/UFRGS (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária/Universidade Federal do Rio Grande do Sul - MIRCEN, Porto Alegre, RS), é a responsável pela manutenção e distribuição de estirpes recomendadas para serem utilizadas nos inoculantes comerciais.

Diversos estudos taxonômicos vêm relatando uma alta diversidade no gênero *Bradyrhizobium* spp (WASIKE et al., 2009; GALLI-TERASAWA.,2003; BATISTA et al., 2007). E até hoje nove espécies de *Bradyrhizobium* tem sido identificadas: *Bradyrhizobium japonicum* (JORDAN., 1982), *Bradyrhizobium elkanii* (KUYKENDALL.,1992), *Bradyrhizobium liaoningense* (XU et al.,1995), *Bradyrhizobium yuanmingense* (YAO et al.,2002), *Bradyrhizobium betae* (RIVAS et al.,2004), *Bradyrhizobium canariense* (VINUESA et al.,2005), *Bradyrhizobium iriomotense* (ISLAM et al.,2008), *Bradyrhizobium jicamae* (RAMIREZ-BAHENA et al.,2009) e *Bradyrhizobium pachyrizi* (RAMIREZ-BAHENA et al.,2009) (RISAL et al., 2010).

Estudos básicos que permitam em um primeiro momento diferenciá-las e agrupá-las são essenciais, haja vista que estirpes idênticas recebidas de diferentes fontes podem estar catalogadas como diferentes, aumentando em muito os gastos com a manutenção e riscos de contaminação dos estoques. Assim, existem coleções de estirpes isoladas e recomendadas, porém muitas ainda requerem uma classificação sistemática adicional que permita um agrupamento e uma diferenciação mais apropriada, além de novas identificações, que possibilite uma recomendação adequada do uso dessas estirpes bacterianas (TOLEDO et al.,2009).

As diferenças das sequências de bases no genoma, presente entre as estirpes, podem ser obtidas através de vários métodos de marcadores moleculares, tais como: relação mol% G+C, análise da seqüência de nucleotídeos (DNA e/ou rRNA); hibridização DNA; DNA e/ou RNA; perfil do polimorfismo obtido com a amplificação ao acaso do DNA (RADP) ou dos fragmentos de restrição (RFLP); perfil obtido com

seqüências repetitivas no genoma (REP e ERIC), entre outros. Essa classificação com marcadores moleculares (RFLP, AFLP, RAPD entre outros) é essencial para comparar e identificar os rizóbios nativos dos solos brasileiros, além de entender as interações entre planta e simbiote.

Na caracterização de estirpes da coleção, que considera genes conservados e simbióticos, o produto do gene *16S rRNA*, é o principal componente da subunidade ribossômica menor dos procariotos (BROSIUS et al., 1978), constituída por moléculas de ácido ribonucleico e proteínas, a qual é parte do maquinário celular responsável pela síntese proteica.

Devido à presença desse gene em todas as bactérias, esta sequência de bases apresenta características conservativas ao longo da evolução e pode servir como indicadores de como os microrganismos estiveram relacionados durante a evolução ao longo de milhões de anos (OLSEN & WOESE, 1993).

Portanto, a homologia entre as seqüências de 16S rRNA que é suficientemente variável, mas que carrega as informações necessárias para permitir a análise filogenética de bactérias, consegue definir a posição das bactérias em nível de gênero e, em alguns casos, em nível de espécie (GARRITY & HOLL, 2001) sendo uma ferramenta de suma importância em estudos de taxonomia e filogenia.

2.8 Manejos do solo e diversidade de microrganismos

A soja chegou à região Centro Oeste aproximadamente na década de 1970, após o incentivo da expansão da produção da cultura em região dos Cerrados. A exploração primária baseia-se na produção de grãos em lavouras mecanizadas e bovinocultura de corte extensivo, apresentando baixos índices de eficiência, além de crescentes taxas de degradação dos solos e do potencial produtivo (SALTON et al., 2001; SILVA et al., 2008).

Assim os métodos convencionais de preparo do solo, como o plantio convencional (PC) que é caracterizado pelo uso de semeadura com preparo mecânico

do solo, através da aração e da gradagem, têm tido um impacto negativo nos organismos do solo, bem como na construção da estrutura do solo e na sua manutenção (MARTIUS et al., 2001). Baixas quantidades de nutrientes, redução da atividade microbiana e matéria orgânica e acidificação do solo, são algumas consequências do uso de tecnologias inadequadas de solos aráveis (VARGAS & HUNGRIA., 2000; BALOTA et al., 2004).

Portanto, a busca de conhecimento da biodiversidade de microrganismos desses solos é uma componente chave para a sustentabilidade, desempenhando papéis importantes na manutenção das propriedades físicas e químicas do solo e no fornecimento de nutrientes para as plantas. Os sistemas conservacionistas como o plantio direto (PD) que consiste do não revolvimento do solo para a semeadura, apenas com a abertura de um pequeno sulco para entrada da semente, dos fertilizantes e de outros insumos, quando necessários estão sendo implementados a fim de otimizar a exploração agropecuária nos sistemas de produção conduzidos em plantio direto com rotação entre lavoura e pecuária. Em muitos casos, o PD considera a cobertura do solo, adubação verde, terraceamento, e a adubação orgânica (HUNGRIA et al., 1997).

Como consequências de práticas conservacionistas para o manejo do solo, o uso de plantas de cobertura favorece o aumento do teor de C orgânico total (LOVATO et al., 2004), recicla nutrientes e melhora a estabilidade da estrutura do solo pelo efeito físico das raízes sobre a formação e manutenção dos agregados do solo (ALBUQUERQUE et al., 2005; SILVA et al., 2008).

Segundo LAL (1991), a rotação entre culturas anuais e pastagens é uma das alternativas para se obter um manejo sustentável do solo e da água nos trópicos. De acordo com MELO (1996), este sistema tem demonstrado ser técnica e economicamente viável (SILVA et al., 2008).

A prática de rotação, que considera o plantio de seqüências de culturas diferentes, além de manter e melhorar a qualidade do solo altera o habitat devido à diferença de extrato (ou exsudato) de nutrientes, profundidade das raízes, quantidade de resíduos e da diferença de seus componentes presentes no solo. Por conseguinte, a

biodiversidade e a atividade biológica podem ser estimuladas diante desse sistema dinâmico do solo (BALOTA, 2004).

As leguminosas contribuem com nitrogênio, beneficiando, com isso, as pastagens subsequentes e os animais na reciclagem de nutrientes, com retorno ao sistema dos nutrientes contidos no tecido vegetal através de dejetos (SILVA et al., 2008).

Neste contexto, a FBN é um processo fundamental na sustentabilidade e as condições físicas, químicas e biológicas do solo frente a um determinado manejo podem influenciar na simbiose (planta/microrganismo) e assim afetar a diversidade genética de *Bradyrhizobium* spp, uma vez que as bactérias que fixam nitrogênio em plantas de soja são caracterizados por apresentarem uma plasticidade genômica (APUNNU et al 2008; LIMA et al., 2005; GALLI-TERASAWA et al., 2003), envolvendo transferência horizontal (BARCELLOS et al., 2007; QUIAN et al.,2003; MOULIN et al., 2004) e vertical (MOULIN et al., 2004) de genes, recombinação gênica incluindo deleção, inserção e integração de vários elementos do DNA (SAWADA et al., 2003; VINUESA et al., 2005;BATISTA et al., 2007;).

2.9 fAFLP (Polimorfismo no Comprimento do Fragmento Amplificado)

O fAFLP proposto por ZABEAU e VOS (1993), é um marcador dominante utilizado para visualizar diversos fragmentos de restrição de DNA amplificados simultaneamente. Esta técnica é usada em testes de paternidade ou *fingerprints*, estudos de monitoramento de identidade de um isolado ou a diversidade genética entre diversos isolados.

VOS et al (1995) citam que as vantagens desta técnica é realizar a caracterização de populações microbiana através da ampla cobertura do genoma em estudo e que a complexidade do AFLP impressões digitais podem ser vantajosamente gerido pela adição de bases seletiva para os primers de PCR durante a amplificação.

A tecnologia do fAFLP, segundo VOS et al (1995), combina com o RFLP (Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição) associada com a flexibilidade da PCR (técnica baseada na ligação do primer em sequências reconhecidas –adaptadores- para a restrição do DNA). Os “fingerprints” são produzidos inicialmente com uma sequência conhecida usando uma sequência conhecida limitada de primers genéricos.

As vantagens no uso do marcador molecular fAFLP consistem nos seguintes aspectos:

- O número de marcadores simultaneamente analisados em um único gel é o mais alto entre as tecnologias de marcadores hoje disponíveis. Portanto, esta técnica é muito eficiente em amostragens amplas e simultâneas de um genoma, sendo possível construir um mapa genético com aproximadamente 200 a 300 marcadores com apenas 5 a 7 géis de eletroforese (FERREIRA E GRATAPAGLIA.,1998) .
- Grande poder de detecção de variabilidade genética que explora simultaneamente o polimorfismo de presença e ausência de sítios de restrição, tal como no ensaio de RFLP, e a ocorrência ou não de amplificação a partir de sequências arbitrárias, tal como no ensaio de RAPD. Consegue-se com isso uma flexibilidade significativa na obtenção de marcadores polimórficos.
- Maior robustez do ensaio AFLP quando comparado com o ensaio RAPD. Uma vez que primers do fAFLP são mais longos e utilizados na etapa de PCR, o que aumenta significativamente a especificidade da amplificação, evitando com isso a competição que ocorre durante a PCR no ensaio RAPD. AFLP reúne, portanto, a vantagem da PCR específica com a vantagem da RAPD em se explorar sequências arbitrárias.

O primeiro passo da técnica fAFLP é a geração de fragmentos de restrição pelo uso de duas endonucleases de restrição *EcoRI* e *MseI* (revisado por FERREIRA & GRATAPAGLIA.,1998). Os adaptadores são ligados nas extremidades dos fragmentos de DNA, gerando um DNA molde para a subsequente amplificação por PCR. As

seqüências dos adaptadores e o sítio de restrição servem como um local de ligação do primer para uma subsequente seleção de baixo nível ou amplificação “pré seletiva” dos fragmentos de restrição.

O primer complementar *Msel* contém uma citosina na extremidade 3'. O primer complementar *EcoRI* contém uma adenina na extremidade 3'. Apenas aqueles fragmentos genômicos que tenham um adaptador em cada extremidade amplificam exponencialmente durante a amplificação por PCR.

Esse passo efetivamente “purifica” o alvo a partir de seqüências que amplificam apenas linearmente, ou seja, aquelas com uma extremidade modificada. Amplificações adicionais por PCR são feitas para reduzir a complexidade da mistura de tal modo que possa ser resolvida em um gel de poliacrilamida. Essas amplificações usam primers seletivos escolhidos.

Após a amplificação por PCR com esses primers, uma porção de cada amostra é analisada em um seqüenciador de DNA. A amplificação seletiva com um primer *EcoRI* e um primer *Msel* amplifica principalmente fragmentos com extremidades *EcoRI-Msel*. Os fragmentos com extremidades *EcoRI-EcoRI* não amplificam bem. Os fragmentos *Msel-Msel* não são visualizados porque eles não contêm a marcação com corantes fluorescentes. Apenas os fragmentos contendo extremidade *EcoRI* são detectados. Genomas individuais produzem distintos perfis de fragmentos de restrição com cada par de primer de amplificação.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental e de manejo do solo

A área experimental da Embrapa Agropecuária Oeste, está situada no município de Dourados (22° 14' 00" S e 54° 49' 00" W), no estado do Mato Grosso do Sul. O solo da região é classificado do tipo Latossolo Vermelho Distroférico com relevo plano. O

clima, segundo FIETZ & FISH (2006), é Cwa, mesotérmico úmido, com verões quentes, chuvosos e invernos secos. As amostragens foram realizadas em cinco repetições (plantas) para cada sistema de manejo considerado em pontos distanciados em dez metros ao longo de um transecto (Figura 5).

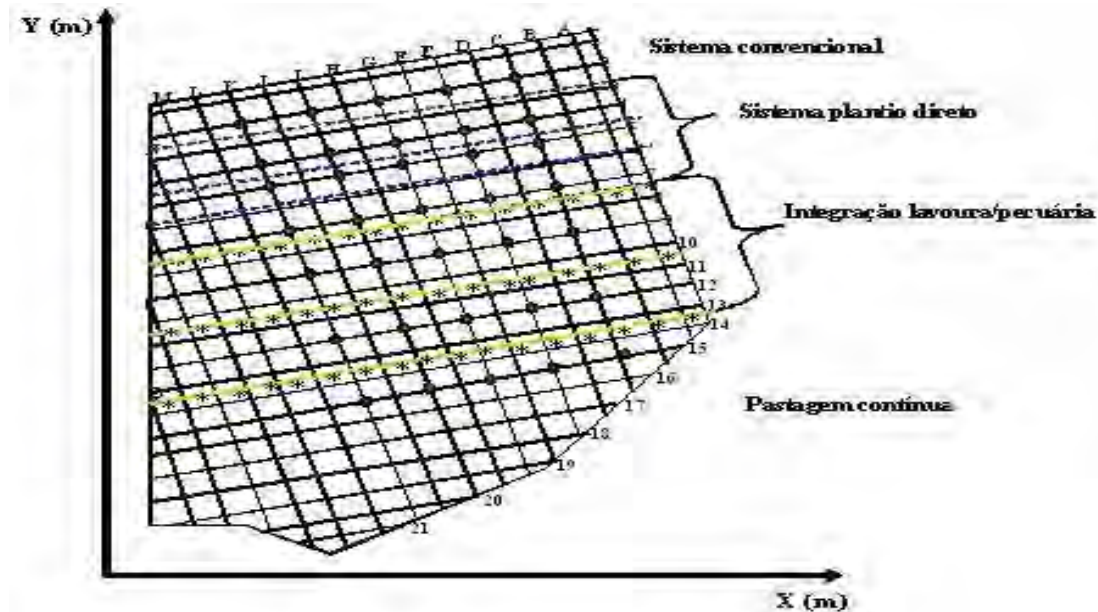


Figura 5_Modelo físico de amostragem nos diferentes sistemas de produção, em Dourados, MS. Os pontos correspondem aos locais de amostragem de plantas de soja.

Os sistemas de manejo foram implementados em 1995, com sistemas intensivos de produção, sendo caracterizados como: 1) Sistema convencional (SC) com monocultivo de soja no verão e de aveia no outono/inverno, onde o solo foi preparado com grades de disco, 2) Sistema plantio direto subdividido em três faixas (a, b e c) cultivo em plantio direto com rotação de culturas, tendo se no verão a sequência soja/soja/ milho e no outono/inverno aveia/ trigo/ nabo forrageiro 3) Sistema integração lavoura-pecuária (ILP) subdividido em duas faixas (a e b) soja/aveia, conduzidas em plantio direto, rotacionadas, a cada dois anos, com pastagem *Brachiaria decubens* e 4) Pastagem contínua (PC) (Tabela 1).

Tabela 1_ Tipos de usos do solo, quantidade de isolados de plantas de soja e característica de cada sistema de manejo empregado para o cultivo da soja.

Uso do solo	Totais isolados por safras			Caracterização do manejo
	04-05	05-06	06-07	
Convencional	14	13	11	Sistema convencional de cultivo que envolve aração e gradagem. Na maioria das vezes, o sistema convencional favorece a perda de matéria orgânica do solo alimentando o processo de degradação, promovendo a desorganização do sistema, resultando em menores produções de biomassa e maiores perdas de nutrientes, água e solo.
Int. Lavoura Pecuária	12	-	10	Uso do solo com sistemas conservacionistas. Combina a vantagem de fornecer grandes quantidades de resíduos para a formação de cobertura do solo para a lavoura subsequente sob sistema PD.
Plantio direto	14	20	24	Sistema conservacionista, com temperatura 5-10°C menor do que no Sistema Convencional, teor de umidade favorável, elevado aporte de resíduos, diminuem processos de erosão e lixiviação do solo.

3.2. Isolamento de bactérias

O isolamento foi conduzido no Laboratório de Microbiologia do Solo da *Embrapa Agropecuária Oeste* (CPAO), no Município de Dourados, MS. Nesta avaliação, as sementes de soja, foram inicialmente inoculadas com a mistura das estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 de *Bradyrhizobium japonicum* e SEMIA 587 e SEMIA 5019 de *Bradyrhizobium elkanii*, produzido pela Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – FEPAGRO (associada ao MIRCEN). Após a inoculação das sementes de soja, as mesmas foram levadas para o campo experimental da *EMBRAPA CPAO* caracterizado por rotação e sucessão de diferentes culturas.

Quando as plantas de soja atingiram a fase de florescimento, foi realizado o isolamento de nódulos de raízes de soja referentes à safra 2004/2005, 2005/2006 e 2006/2007. Inicialmente os nódulos de soja foram desinfestados superficialmente com álcool etílico a 95% por sessenta segundos, em seguida imersas em hipoclorito de sódio a 3 a 6% por cinco minutos sendo então lavadas com água esterilizadas por cinco minutos.

Após a desinfestação dos nódulos de soja, as bactérias foram isoladas com auxílio de uma pinça sendo então plaqueadas em meio de cultura com extrato de levedura, manitol e ágar (meio yeast-mannitol agar, YMA, VINCENT, 1970) modificado (contendo 5,0 g L⁻¹ de manitol-C₆H₁₄O₆), com vermelho congo (0,00125 %) como indicador. Para caracterização, foram utilizados os atributos de cor, mucosidade, transparência, bordas, elevação e reação ácida ou básica, definidos por VINCENT (1970). O meio de cultura para o desenvolvimento de rizóbios em placas foi esterilizado em autoclave a 121°C a 1,0 atmosfera por 20 minutos e preparado com no mínimo 24 horas de antecedência. As placas de Petri contendo meio de cultura foram colocadas em estufa na temperatura entre 28°C e 30°C para permitir o desenvolvimento das bactérias durante aproximadamente 7 dias.

3.3. Extração DNA

Após o isolamento das bactérias, as mesmas foram transferidas para o LBMP (Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas), do Departamento de Tecnologia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, campus de Jaboticabal SP.

Inicialmente as bactérias foram colocadas novamente em meio YMA com vermelho congo durante sete dias. Após esse período as mesmas foram transferidas para meio líquido YMB (yeast- manitol) e depois de crescidas foram misturadas a glicerol 25% e estocadas a -80° C.

Para o preparo do "pellet" para a extração, as bactérias mantidas em meio YMA com vermelho congo foram transferidas para o meio TY no qual permaneceram durante 48 horas. Depois foram acondicionadas em microtubos de 1,5 mL com NaCl 0,85% centrifugadas a 16266 x g. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente evitando a perda do pellet da cultura de bactérias.

A extração de DNA dos isolados de *Bradyrhizobium* spp foi realizada conforme o protocolo de MARMUR (1961). Para obter o DNA purificado, o procedimento de

extração, incluiu que para cada aproximadamente 50 mg do pellet celular da bactéria foi ressuspendido em 400 µl de NaCl 0,85%, centrifugado 15 294 xg e descartado o sobrenadante. Em seguida, foi adicionado 40 µl da solução lisozima (20 mg/mL), 13 µl da solução de RNase (10 mg/mL) e 44 µl de SDS 20%. Para a etapa de purificação de ácidos nucleicos, foi utilizado o etanol absoluto e 70% com o objetivo de precipitar e purificar as amostras de DNA. O pellet de DNA foi ressuspendido em aproximadamente 60 µl de TE 10/1 para estimar a concentração de DNA. As amostras de DNA foram diluídas para 100 ng de DNA ml⁻¹ sendo então acondicionadas a -20 °C.

3.4. Uso do marcador molecular fAFLP

Foram testadas 6 possibilidades de combinações dos iniciadores (1- EcoRI C-Ned/ MseI G; 2- EcoRI G-Joe/ MseI C; 3-EcoRI A- Fam/MseI G; 4-EcoRI AG-Joe / MseI Ø; 5-EcoRI T-Joe/ MseI CG e 6- EcoRI AT- Ned/ MseI C), utilizando as 115 amostras de DNA referentes aos isolados de rizóbios.

O padrão interno de tamanho molecular GeneScan-500 (ROX) usado no fAFLP é marcado por fluorescência com a cor vermelha (ROX), possuindo 15 fragmentos com os seguintes comprimentos (pb): 50, 75, 100, 139, 150, 160, 200, 250, 300, 340, 350, 400, 450, 490 e 500.

Tal procedimento foi realizado conforme o AFLP (Microbial Mapping Protocol) da Applied Biosystem. **Digestão:** O DNA foi digerido utilizando-se a seguinte reação: a 250 ng de DNA, adicionaram-se 1,0 µl de tampão React (500 mM Tris HCl, pH 80; 100mM MgCl₂), 5U de EcoRI (0,3 µl), 5U de MseI (0,5 µl). A reação foi incubada por 14 horas a 37°C, e após esse período, as enzimas foram inativadas a 65°C por 20 minutos. **Ligação dos adaptadores:** retiraram-se 4,0 µl da reação de digestão e acrescentaram-se 1,0 µl do tampão T₄ ligase, 0,5 µl da enzima T₄ ligase, 0,33 µl do adaptador para o corte da MseI e 0,33 µl do adaptador para o corte da Eco RI (ambos previamente pareados a 95°C por 5 minutos). A ligação ocorreu por 2 horas a 20°C e, em seguida, a amostra foi diluída 8 vezes. **Amplificação pré-seletiva:** Retiraram-se 2 µl da reação

diluída preparada a partir das reações de digestão e ligação dos adaptadores e acrescentaram-se 0,5 µl da mistura dos primers pré-seletivos AFLP EcoRI e MseI e 7,5 µl de AFLP Core Mix. As amostras foram colocadas no termociclador com o seguinte programa: 1º) um ciclo de 2' a 72°C; 2º) 20 ciclos de 20'' a 94°C, 30'' a 56°C e 2' a 72°C; 3º) ciclo 4°C. Os produtos amplificados na reação pré-seletiva foram diluídos 4 vezes. **Amplificação seletiva:** retirou-se 2,5 µl da reação pré-seletiva diluída e acrescentaram-se 7,5 µl do AFLP Core Mix, 0,5 µl do primer XXX da EcoRI marcado por fluorescência e 0,5 µl do primer XXX da MseI. Após o preparo das reações, as amostras foram colocadas no termociclador com o seguinte programa: 1º) 2' a 94°C; 2º) um ciclo de 20'' a 94°C, 30'' a 66°C e 2' a 72°C; 3º) um ciclo de 20'' a 94°C, 30'' a 65°C e 2' a 72°C, sendo que até o 10º passo foram marcados pela diminuição em 1°C do ciclo intermediário da fase anterior até chegar à temperatura de 56°C, e o restante igual; 11º) 21 ciclos de 20'' a 94°C, 30'' a 56°C e 2' a 72°C; 12º) um ciclo de 30' a 60°C. Retirou-se 1,5 µl da reação seletiva e adicionaram-se 8,37 µl de um mix contendo 8,0 µl de formamida deionizada e 0,37 do padrão interno de peso molecular GeneScan-500 [ROX] marcado por fluorescência vermelha. No termociclador, desnaturou-se a reação a 95°C por 5min. Após a desnaturação da formamida as amostras foram levadas para o sequenciador ABI Prism 3100 DNA Analyzer (Applied Biosystems). Os pares de primers utilizados: 1) EcoRI C-Ned/ MseI G; 2) EcoRI G-Joe/ MseI C; 3) EcoRI A- Fam/MseI G; 4) EcoRI AG-Joe / MseI Ø; 5) EcoRI T-Joe/ MseI CG e 6) EcoRI AT- Ned/ MseI C.

A análise dos dados foi conduzida através do software Genescan 3.1(Perkin-Elmer) utilizado para determinar o comprimento dos fragmentos da amostra pela comparação com o tamanho do DNA padrão. Foram gerados eletroferogramas dos fragmentos com os tamanhos de 50-500 pares de base. Com os perfis de fAFLP obtidos de cada isolado foi montada uma matriz binária através do software Genotyper 2.5 (Perkin-Elmer). A matriz foi utilizada para a construção da árvore filogenética através do software Philip. O dendrograma foi gerado por UPGMA, através do software MEGA, ilustrando a distância genética entre os isolados.

3.5 Amplificação da sequência conservada da região do gene 16S rDNA através de PCR utilizando os oligonucleotídeos pA e pc5B.

Nas reações de amplificação das quarenta e duas estirpes foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores universais que geram um fragmento de aproximadamente 1,5 Kb, o pA "forward" e o pc5B "reverse" (WILSON.,1990).

Os volumes dos reagentes, as condições de amplificação do DNA bem como a otimização dos mesmos, estão listados na Tabela 2.

Os produtos da amplificação foram analisados em gel de agarose 1,5% fundida em tampão TEB (Tris-base 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, p.H 8,3), contendo brometo de etídio (0,5% $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gel). Uma alíquota de 3 μl foi aplicada no gel, acrescida de 3 μl de tampão da amostra (0,10% de azul de bromofenol + 40% de glicerol). A corrida eletroforética foi realizada em uma cuba horizontal, e conduzida em tampão TBE 1x, adicionado de brometo de etídio (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), durante 1 hora a 100 V constante. O padrão de peso molecular utilizado foi de 0,3 μg do DNA "Ladder" de 1 Kb (Invitrogen). A visualização foi realizada sob luz ultravioleta e a imagem de gel documentada em um fotodocumentador modelo GEL DOC 1000 (BIO RAD), utilizando se o programa Quantity One.

Tabela 2_ Condições de amplificação da PCR, utilizando se os oligonucleotídeos iniciadores da região do gene 16S rDNA.

REAGENTES (concentração)	VOLUME REAÇÃO
DNA (40 ng/ 3 μL)	3
Tampão da enzima (10X)	2
MgCl ₂ (50 mM)	0,6
DNTPs (10 mM)	0,4
Taq DNA polimerase (5U/ μL)	0,5
Oligonucleotídeo iniciador pA (50 ng/ μL)	0,8
Oligonucleotídeo iniciador pc5B (50 ng/ μL)	0,8
Água MilliQ	11,9
TOTAL	20

Tabela 3_ Etapas do programa de amplificação da região do gene 16S rDNA no termociclador.

Programa utilizado no termociclador para amplificação da região do 16S rDNA
1) 94° C – 2 minutos
2) 50° C – 30 segundos
3) 72° C – 1 minuto
4) 94° C – 30 segundos
5) 30 ciclos (etapas 2 a 4)
6) 72° C – 5 minutos
7) 4° C – tempo indeterminado

3.6 Reação da PCR para sequenciamento do fragmento da região do gene 16S rDNA amplificado.

As reações de sequenciamento foram realizadas em placas de PCR, e seus reagentes apresentam se na Tabela 4. Foram efetuadas reações para os oligonucleotídeos iniciadores pA (forward) e pc5B (reverse) de forma independente. As condições utilizadas no termociclador estão especificadas na Tabela 3.

Tabela 4_ Reação de sequenciamento parcial do gene 16S rDNA.

REAGENTES	VOLUMES NAS REAÇÕES
pA-	0,6
produto de PCR 16S	3,5
terminadores dynamics	0,4
tampão 2,5 X (400 mM tris-HCl, p.H 9,0: 10 mM MgCl ₂)	5,5
Total	10
REAGENTES	VOLUMES NAS REAÇÕES
pc5B	0,6
produto de PCR 16S	3,5
terminadores dynamics	0,4
tampão 2,5 X (400 mM tris-HCl, p.H 9,0: 10 mM MgCl ₂)	5,5
Total	10

3.7 Sequenciamento automático dos produtos de PCR do gene 16S rDNA

Após a reação, as amostras foram preparadas para o sequenciamento parcial (forward) de DNA em microplacas. Para a precipitação, foram adicionados 80 µL de isopropanol 75%, sendo as mesmas agitadas levemente. Posteriormente, as amostras permaneceram por 15 minutos em temperatura ambiente e foram centrifugadas a 3.220xg por 45 minutos, a 20° C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e a placa deixada por 5 minutos em temperatura ambiente, invertida em papel absorvente. Foram adicionados 200 µL de etanol 70% e a microplaca foi submetida a centrifugação de 3.220xg por 10 minutos, a 20° C. Após a centrifugação o sobrenadante foi novamente dispensado e a placa invertida novamente sobre papel absorvente para uma breve centrifugação (spin).

A desnaturação foi realizada com Hi-Di Formamide – Catálogo - P/N 4311320 (ABI Prism) a 95° C, por 5 minutos, sendo então sequenciados no 3700 DNA Analyzer ABI Prism (Applied Biosystems).

3.8 Análises das Sequências

A sequência parcial de nucleotídeos obtida foi comparada com Banco Internacional de Genes, National Center for Biotechnology Information (NCBI) e utilizada para alinhamento com outras sequências previamente conhecidas e disponíveis no banco de dados NCBI, utilizando-se o programa BLAST (ALTSCHUL et al. 1997).

Para o alinhamento sequencial múltiplo de todas as sequências que apresentaram similaridade foi utilizado o programa Clustal W 1.8 (THOMPSON et al., 1994) O ajuste das sequências de DNA, de forma que todas estivessem completamente alinhadas, foi efetuado com o auxílio do programa BioEdit (HALL, 2001). Para o cálculo de significância estatística da similaridade entre as sequências, foi utilizada a análise de amostragem “bootstrap” (SWOFFORD et al., 1996) para 1.000 replicações.

O método de distância “neighbor-joining” (SAITOU; NEI, 1987) foi usado para a construção da árvore filogenética. Para a visualização gráfica da árvore construída, foi utilizado o programa MEGA 4 (KUMAR et al., 1996), e para a construção da matriz, o algoritmo p -distance.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Diversidade genética de isolados de rizóbios, sob diferentes manejos do solo, através do uso do marcador molecular fAFLP.

Entre os isolados de nódulos de soja sob diferentes manejos, através do uso do fAFLP, foi observada a formação de dois grupos (Figura 6). No primeiro grupo posicionaram-se a maioria dos isolados do sistema plantio direto e dois representantes do sistema convencional que pertencem à safra 2006-2007, com exceção de um isolado do plantio direto (PDA 2.1) da safra 2005-2006. As estirpes padrões de *Bradyrhizobium japonicum* (5079 e 5080) e *Bradyrhizobium elkanii* (587 e 5019) formaram um grupo monofilético com os isolados do grupo 1 (Figuras 6 e 7).

Assim, com base nas figuras 6 e 7 (grupo 1) observa-se uma diversidade de isolados no sistema plantio direto safra 2006-07. O sistema de plantio direto, principalmente em condições tropicais, apresenta efeitos positivos no solo que estão atribuídos a fatores como baixa temperatura, quantidade elevada de matéria orgânica, preservação dos agregados e disponibilidade de carbono que favorece tanto a biomassa microbiana e muitas classes de microrganismos, incluindo os rizóbios (POWLSON & JENKINSON.,1981; FERREIRA et al.,2000). Por conseguinte, esse tipo de uso do solo favorece tanto a sustentabilidade na agricultura quanto auxilia no estabelecimento de populações de rizóbios além valorizar a diversidade genética. Todos esses fatores contribuem a uma elevada produtividade com baixo custo (HUNGRIA & VARGAS.,2000).

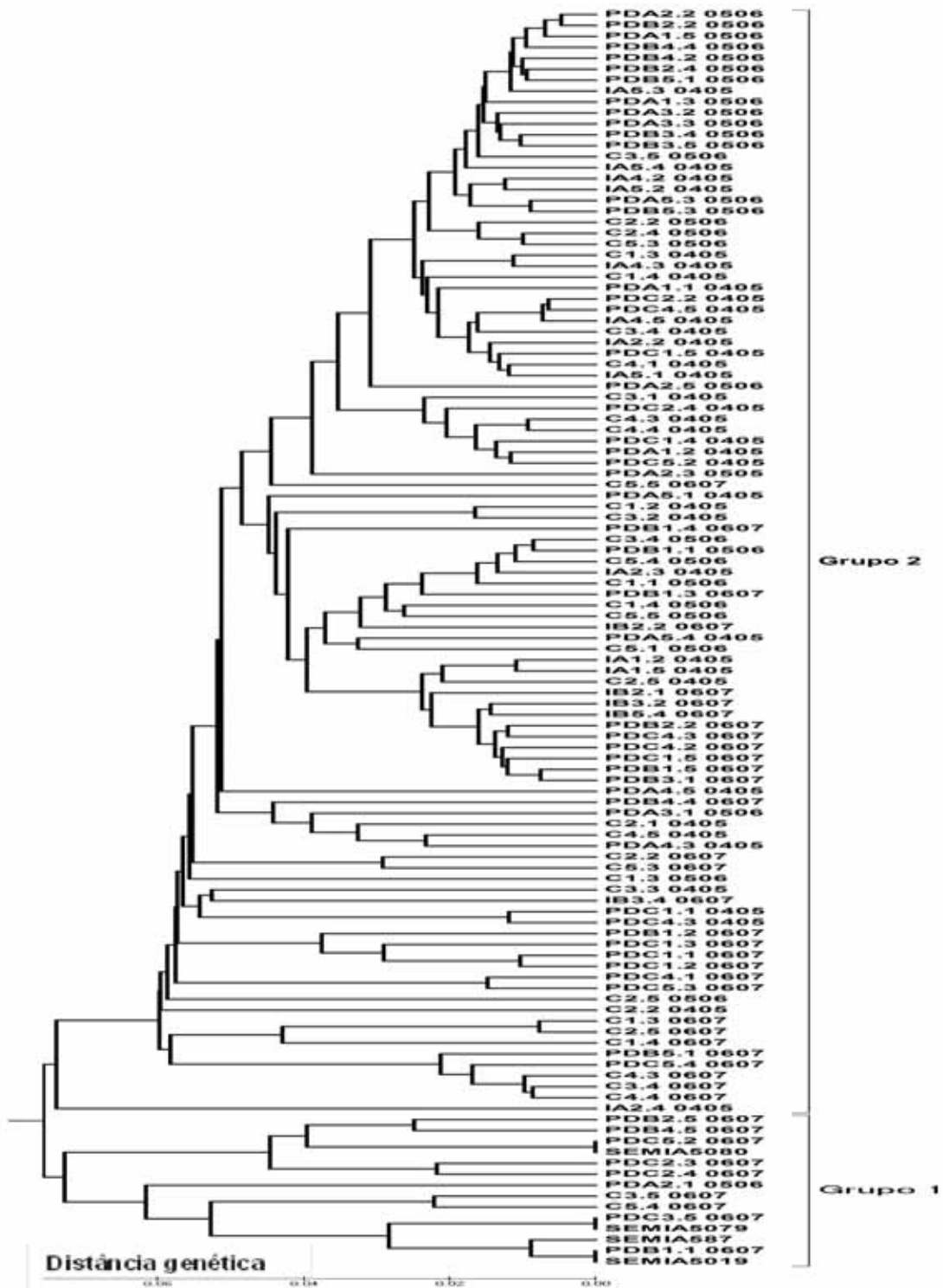


Figura 6_ Árvore filogenética baseada na diversidade genética, através do uso do marcador fAFLP, de 115 isolados de soja e comparada com as estirpes padrões de *Bradyrhizobium japonicum* (5079 e 5080) e *B. elkanii* (587 e 5019) para o uso e fabricação de inoculantes microbianos. Dendrograma gerado com o programa MEGA versão 4.0 através do método de agrupamento UPGMA.PDA (plantio direto faixa A), PDB (plantio direto faixa B), PDC (plantio direto faixa C), PC (plantio convencional), ILA (integração lavoura pecuária faixa A), ILB (integração lavoura pecuária faixa B).

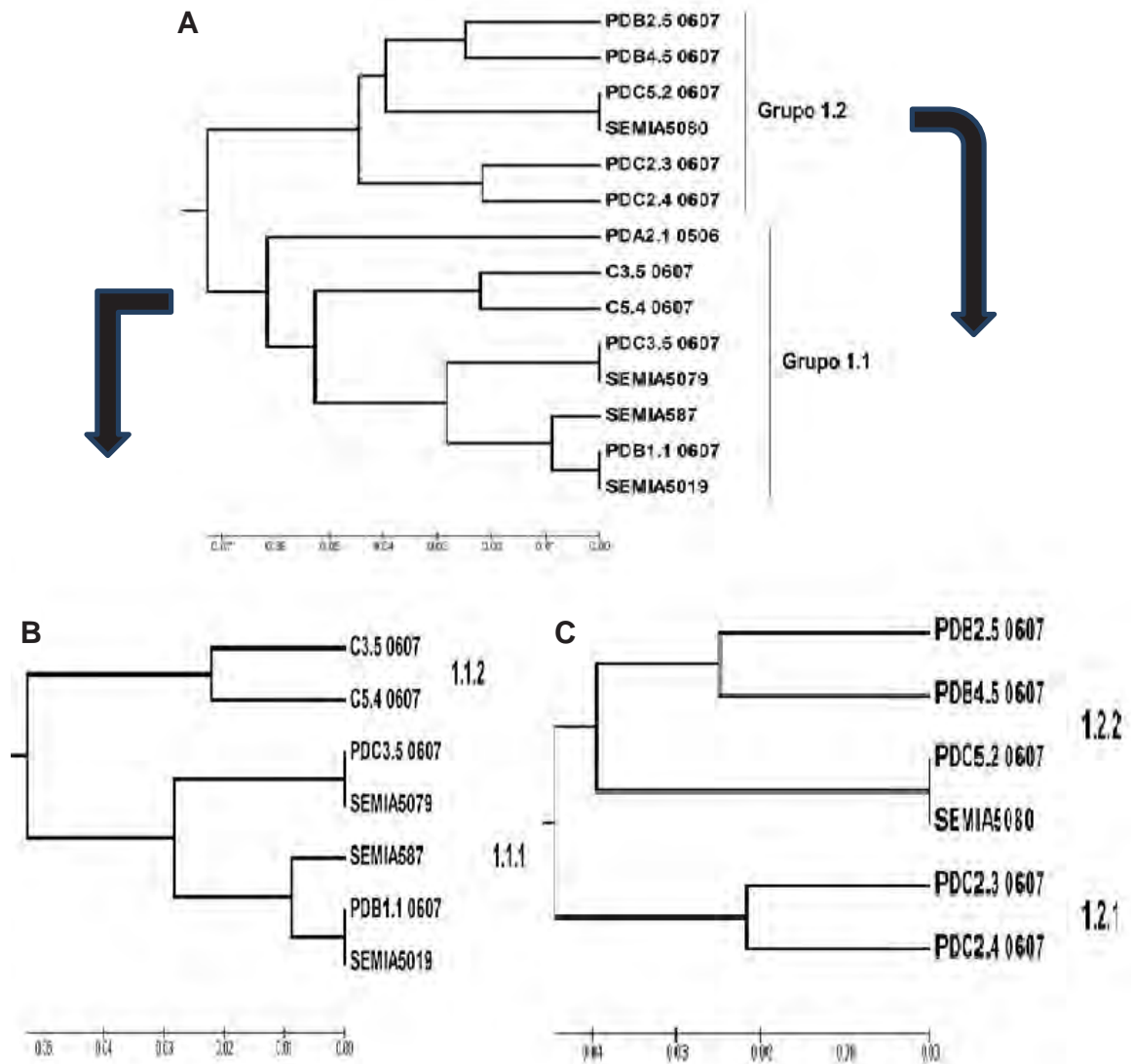


Figura 7_ (A) Grupo 1e suas subdivisões; **(B)** subgrupos 1.1.1 e 1.1.2 e **(C)** subgrupos 1.2.1 e 1.2.2.

Em algumas avaliações realizadas de diversidade genética relacionados aos sistemas de manejo, foi observado que, no caso de rizóbios microssimbiontes da soja e do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), apresentaram maior diversidade de estirpes em solos sob o sistema de Plantio direto (PD), em comparação com o Plantio convencional (PC)

(FERREIRA et al., 2000; HUNGRIA et al., 2006 b; KASCHUK et al., 2006 a, b), observando se também correlação positiva com o rendimento de grãos (KASCHUK et al., 2006b).

A estirpe padrão de *Bradyrhizobium elkanii* (5019) apresentou perfil idêntico com o isolado PDB 2.1 (safra 2006-07). O mesmo ocorreu com as espécies padrões de *Bradyrhizobium japonicum*, com a estirpe 5079 e PDC 3.5 e estirpe 5080 e PDC 5.2 onde também não foi observada distância genética entre os padrões e isolados (Figuras 6 e 7).

BARCELLOS et al., 2007 evidenciaram a transferência horizontal de genes (THG) de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* de inoculantes para *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* e *Bradyrhizobium elkanii* em solos do Cerrado brasileiro. Com a análise do grupo no dendrograma de diversidade genética através do fAFLP, é presumível inferir a ocorrência de transferência de genes nos isolados que não apresentaram distância genética em relação as estirpes padrões. As condições estressantes do solo do Cerrado, como elevadas temperaturas e déficit hídrico, reforçam ainda mais esta hipótese. Além das características do Cerrado, a transferência horizontal de genes é um processo cumulativo o que corrobora com o tempo de implantação dos sistemas de manejos, rotação e sucessão de culturas avaliadas no presente estudo.

Em relação ao grupo 2 (Figuras 6 e 8), observa se uma heterogeneidade elevada entre os isolados de diferentes safras e sistemas de manejo (convencional, plantio direto e sistema integrado lavoura pecuária). Assim nota se a formação de vários subgrupos no segundo cluster.

No segundo grupo, o exemplar 2.4 do sistema integrado lavoura pecuária (faixa A) formou um grupo irmão dos demais isolados. A adição de material orgânico, no sistema integrado, por meio de resíduos animais, raízes e resíduos dos cereais, como a aveia, e da forrageira estimula o desenvolvimento de diferentes espécies de microrganismos do solo, pertencentes a numerosos grupos taxonômicos, que são os maiores agentes reguladores dos processos físicos, químicos e biológicos (LAVELLE e SPAIN.,2001; SILVA et al., 2008). Além disso, stresse ambiental, como altas

temperaturas, podem acelerar o processo de recombinação gênica (THIES et al., 2001; BATISTA et al., 2007).

Assim nota se elevado nível de variabilidade entre os isolados de nódulos de soja do Cerrado (Figuras 6 e 8). A heterogeneidade observada no segundo grupo no qual foi composto por mais de 90% dos isolados avaliados, nota se que nenhum destes obteve uma distância genética nula (0,00) entre eles.

A intensificação da ação antropogênica nos sistemas de cultivos de solo, como o sistema convencional, empregados para o estabelecimento da cultura de soja pode ocasionar perdas e ou alteração da diversidade dos microrganismos e consequentemente influenciarem os processos biológicos importantes para o bom funcionamento do ecossistema.

Por outro lado, a soja quando presente no sistema de rotação de culturas pode aumentar a diversidade genética de *Bradyrhizobium* spp. Em um estudo conduzido por FERREIRA et al.,(2000), com intuito de avaliar os métodos de preparo e rotação de culturas sobre a população e diversidade de *Bradyrhizobium* spp, esses autores observaram uma elevada diversidade dessas bactérias em solos sob o plantio direto caracterizados com a rotação de culturas: soja/trigo/milho. E constataram uma baixa diversidade dos isolados sob o plantio no sistema convencional com a rotação das culturas milho/trigo.

Contudo, a diversidade na população desses microrganismos tem sido atribuída a vários fatores que incluem fatores bióticos como mutação, transferência de genes de estirpes de inoculantes para isolados do solo, recombinação gênica e fatores abióticos como práticas de manejo do solo, alta temperatura e pH do solo. Resultados com elevada diversidade genética entre isolados de *Bradyrhizobium* spp, também foi encontrado por RISAL et al.,(2010) no Nepal, através da análise do gene 16S rRNA, região ITS e sequências parciais dos genes *nifD* e *nodD1*.

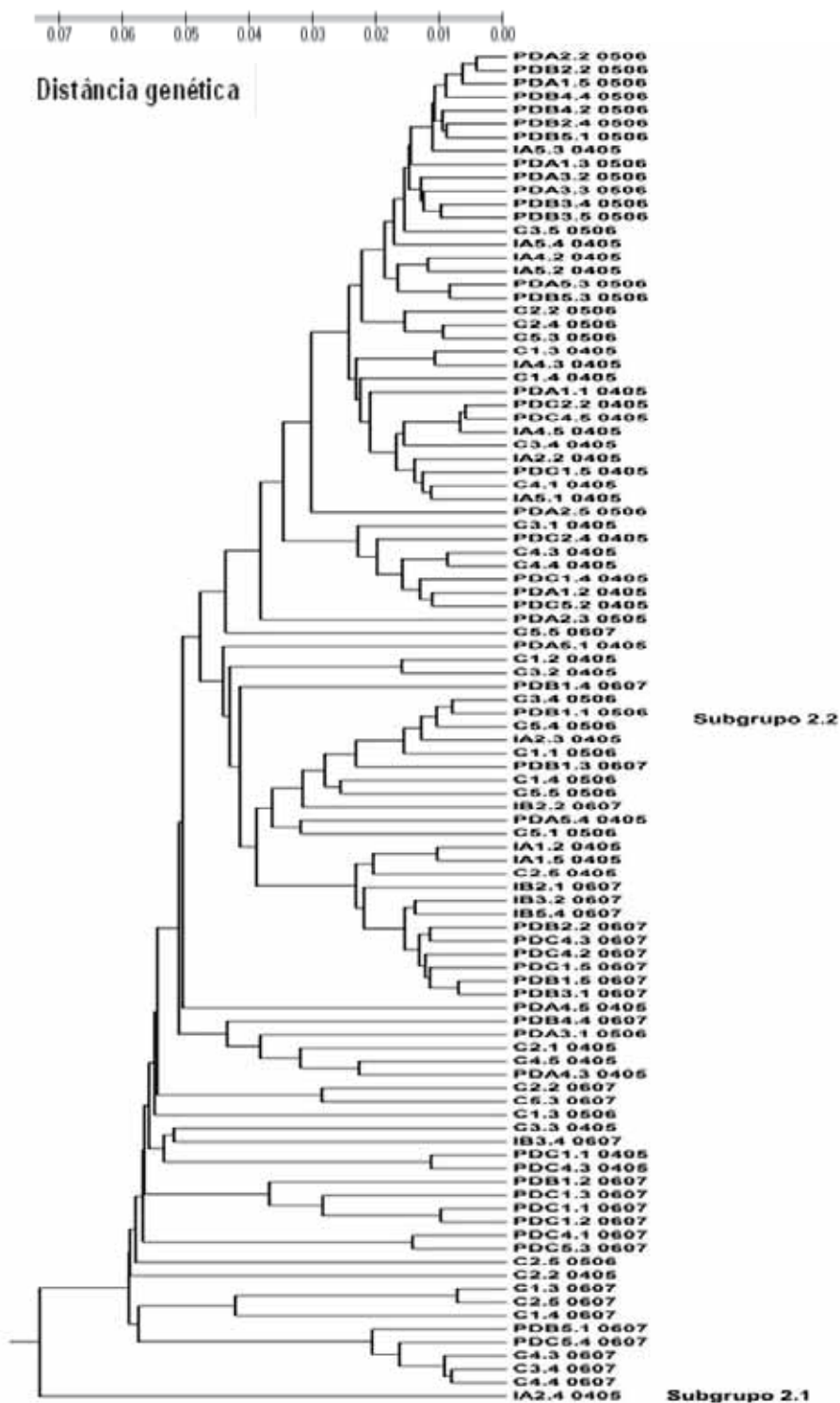


Figura 8_ Grupo 2 da árvore filogenética gerada através dos resultados do fAFLP, demonstrando a formação de dois subgrupos (2.1 e 2.2). Observa-se que o isolado do sistema Integração Lavoura-Pecuária 2.4 safra 2004-05 localiza-se em um subgrupo distante dos demais isolados.

No entanto, um alto nível de diversidade genética pode também desempenhar uma função de tampão biológico em um ambiente a fim de evitar o domínio de uma estirpe mais competitiva (GALLI e TERASAWA et al., 2003). Ou ainda, diferentes populações em uma comunidade sobre determinado habitat podem agir com forças seletivas em processos evolutivos das espécies envolvidas sugerindo então uma coevolução .

Como discutido por PROVOROV & VOROB'EV (2000) a variabilidade observada também poderia ser manifestada devido à intensiva transferência de genes resultantes de um processo chamado de panmixia (característica importante em população de bactérias nos nódulos) que resulta em recombinação gênica entre os isolados.

Com base na análise filogenética, o marcador molecular fAFLP demonstrou como uma técnica de alta precisão para diferenciar estirpes ou espécies intimamente relacionadas, porém não se aplica como uma ferramenta filogenética. É possível aliar a capacidade discriminatória do AFLP a técnicas de análises filogenéticas que permitam distinguir linhagens bacterianas em um estudo de diversidade (regiões conservadas do gene, como o 16S rRNA e região ITS do gene espaço intergênico 16S-23S; e regiões repetitivas ao longo do genoma como: REP-ERIC- BOX PCR, além dos genes ligados a fixação simbiótica *nif* e os genes da nodulação *nod*).

4.2 Diversidade genética de isolados de rizóbios, sob diferentes manejos do solo, através do sequenciamento do gene 16S rDNA.

Através da análise de diversidade, gerada pelo marcador molecular fAFLP, foram escolhidos oitenta isolados a fim de inferir uma classificação filogenética/taxonômica com base na amplificação (onde os produtos de PCR obtidos apresentaram uma única banda com aproximadamente 1500pb) e sequenciamento parcial do gene 16S rDNA. Somente as bases confirmadas com mínimo erro de leitura e com qualidade de

sequências que foram consideradas, sendo, portanto escolhidos quarenta e duas amostras de DNA (figura 6).

Além do estudo da região conservada do gene 16S rDNA, outros métodos vem sendo empregados com sucesso para verificar a posição taxonômica de bactérias, inclusive dos rizóbios. Relações genéticas entre as estirpes tem sido investigadas também por regiões conservadas do 23S rRNA e o espaço intergênico (ITS) entre as regiões do 16S e 23S. Há relatos também de primers específicos que codificam regiões altamente conservadas e repetidas, normalmente no espaço intergênico, do genoma. Exemplos destas técnicas, sequências REP (repetitive extragenic palindromic), ERIC (enterobacterial repetitive intergeneric consensus) e BOX.

Quando as sequências das quarenta e duas estirpes (incluindo as estirpes padrões recomendadas para a fabricação de inoculantes para a soja) foram submetidas ao GenBank (NCBI) para verificar alinhamentos significativos, constatou-se a uma divisão bastante definida de dois filios: Proteobactérias (com as classes alpha, beta e gama) e Firmicutes. Um grupo filogeneticamente relacionado aos Firmicutes foi formado por organismos não cultiváveis (Figura 9).

No grupo formado por firmicutes, foram isolados dos nódulos os seguintes representantes: *Bacillus cereus*, *Bacillus sp*, *Bacillus pumillus*, *Lysinibacillus xylaniliticus*, *Lysinibacillus*, *Bacillus maciliensis*, *Paenibacillus sp*, *Brevibacillus reuszert* e *Brevibacillus sp*. Esse filo é caracterizado por alguns representantes produzirem endósporos. Essas estruturas tornam alguns microrganismos resistentes à dissecação que permitem sobreviver a condições extremas (POLANCZYK & ALVES.,2003).

O gênero *Paenibacillus* são bactérias que caracterizadas por colonizarem a rizosfera das plantas, apresentarem elevada diversidade genética e é constituído por diversas espécies diazotróficas (MA & CHEN, 2008), geralmente são encontrados colonizando a rizosfera de plantas Poaceae (BALDANI et al., 2009).

ROSADO et al., 1998 observaram a espécie de *Paenibacillus azotofixans* na rizosfera de gramíneas como o trigo e cana-de-açúcar, enquanto que o *P. brasilensis* tem sido isolado da rizosfera de milho crescido em solo do Cerrado. A presença de milho e trigo no histórico das sequências de espécies utilizadas nos sistemas de

rotação e sucessão de culturas no presente estudo, provavelmente influenciou na caracterização genética dos isolados classificados no gênero *Paenibacillus*. Uma hipótese da migração e estabelecimento dessas bactérias no solo é a possibilidade de sementes de milho e ou trigo estarem contaminadas e que ao serem cultivadas nesses campos as bactérias se instalaram e permaneceram no solo, fazendo parte assim da comunidade microbiana daquele habitat.

Ao correlacionar com resultados do fAFLP foi observado que representantes dos Firmicutes foram isolados de nódulos de soja pertencentes aos diferentes sistemas de manejo (plantio direto, convencional e sistema integrado lavoura pecuária) caracterizados com diferentes sistemas de rotação e sucessão de culturas. Tais dados corroboram com as características do Cerrado, onde geralmente elevadas temperaturas, estresse hídrico e condições de pH do solo podem provocar alterações na comunidade microbiana.

No entanto, hoje, em termos taxonômicos, as bactérias que nodulam soja e que são recomendadas para o uso na fabricação de inoculantes foram classificadas e divididas em dois grupos distintos: *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* (KUYKENDALL et al.,1992). A introdução de estirpes superiores a FBN nem sempre é bem sucedida quando os solos apresentam população elevada de estirpes indígenas ou introduzidas e estabelecidas devido à competição na nodulação (TRIPLETT., 1990).

Contudo, alguns estudos realizados observaram a possibilidade da interação de rizóbios com outros microrganismos que visam não só de aumentar a competitividade dos rizóbios, mas também de avaliar o efeito da interação de rizóbios com outros microrganismos em solos brasileiros. ARAÚJO e HUNGRIA.,(1999) avaliaram a co inoculação, em sementes de soja, de estirpes de *B. japonicum* e *B. elkanii* e de células de *Bacillus subtilis* ou seus metabólitos brutos e formulados e observaram que essa interação proporciona incrementos na nodulação, na ocupação dos nódulos pelas estirpes de *Bradyrhizobium* e no rendimento da soja.

O mecanismo de ação do *Bacillus subtilis*, segundo KROLOW et al.,(2004) está relacionado a indução da síntese de fito hormônios na planta, como ácido indolacético, ácido abscísico, giberelinas e citocininas que favorecem o crescimento das raízes e

assim o aumento do número dos pelos radiculares. Isso propicia mais sítios de infecção para o rizóbio e o aumento da nodulação.

Maior que o grupo dos Firmicutes foram observados mais três subgrupos que apresentaram homologia de aproximadamente 95% nas sequências analisadas pelo Blastn com o filo das alphaproteobactérias (alpha, beta e gamma). Entre os isolados dos subgrupos Gamma e Beta constatou se uma relação genética de 90% de identidade entre eles.

No grupo das alphaproteobactérias nota se que as sequências dos isolados de nódulos de soja junto as sequências obtidas no Genbank para a formação da árvore filogenética do 16S rDNA, grande parte das estirpes do sistema plantio direto, apresentaram homologia de 100% com sequências de espécies de *Bradyrhizobium elkanii* e *Bradyrhizobium* sp (Figura 9, bootstrap de 96).

O gênero *Bradyrhizobium*, geralmente, apresenta pouca variabilidade genética, dificultando a separação das espécies. Desse modo, alguns métodos moleculares, embora possibilitem a separação de diversas espécies de rizóbio (LAGUERRE et al., 1994), nem sempre são capazes de diferenciar espécies estreitamente relacionadas, como *B. japonicum* de *B. elkanii* e *R. tropici* de *Agrobacterium*. APPUNNU e colaboradores (2008) avaliaram a diversidade molecular de 50 isolados de cinco regiões diferentes da Índia, através do PCR-RFLP da região espaçadora intergênica do 16S e 23S rDNA e observaram a formação de três grupos sendo 2 para o genótipo da linhagem de *Bradyrhizobium liaoningense* e um para *Bradyrhizobium yuanmingense*.

Ainda no subgrupo das alphaproteobactérias do presente estudo, nota se a formação de um grupo irmão (bootstrap 100) aos isolados de *Bradyrhizobium elkanii* e *Bradyrhizobium* sp. Esse grupo irmão foi caracterizado com a sequência de bases de uma estirpe padrão para inoculantes para a soja no qual apresentou homologia com as sequências de bases do Genebank com a espécie de *Bradyrhizobium japonicum*.

Assim com base na figura 9, no grupo das proteobactérias, as sequências das estirpes padrões recomendados para o uso e fabricação de inoculantes foram agrupadas na classe dos alphaproteobactérias e ainda constatou se a formação de dois

grupos distintos, confirmando então a divisão entre *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* proposta por KUYKENDALL et al (1992).

Demais subgrupos foram formados das alphaproteobactérias onde as sequências de bases da região do gene 16S rDNA dos isolados de nódulos de soja apresentaram homologia com sequências do Genebank das espécies de *Agrobacterium* sp, *Rhizobium* sp, *Inquillinus* sp, *Sphingomonas* sp e *Caulobacter leydi*. Essas bactérias são encontradas em diversos ambientes e desempenham funções importantes na ciclagem de nutrientes como o ciclo do carbono, aplicações biotecnológicas entre outros (Figura 9 com valores do bootstrap estão indicados na árvore).

Uma nova espécie fixadora de nitrogênio, pertencente ao gênero *Sphingomonas*, foi descrita em associação com raízes de arroz (XIE & YOKOTA., 2006). Segundo esses autores a espécie descrita é *S. azotofigens* que é constituída por três isolados que permaneceram sem identificação desde o ano de 1988. Assim estudos moleculares estão sendo realizados para definir o posicionamento taxonômico correto desses isolados com *Sphingomonas*. Ainda em 2006, VIDEIRA e colaboradores observaram a presença de diversos isolados com características similares as da espécie *S. azotofigens* durante um estudo conduzido sobre o levantamento da ocorrência de bactérias dos gêneros *Herbaspirillum* e *Burkholderia*, em arroz cultivado em solos brasileiros.

A presença de *Rhizobium* sp em solos com cultivo de soja não é comum devido aos diferentes fatores genéticos encontrados em *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. Tanto que a taxonomia de bactérias, proposta pelo manual BERGEY'S (1984), separa de forma nítida as famílias da ordem Rhizobiales em *Bradyrhizobiaceae* das *Rhizobiaceae*. E ainda supõe que *Bradyrhizobium* seja o ancestral de todos os rizóbios. No entanto, uma hipótese que provavelmente justifica a presença de *Rhizobium* sp em solos com cultivo com soja tem como suporte a questão histórica na agricultura brasileira.

Um estudo conduzido por GRANGE et al.,(2007) relacionado sobre as origens e evolução de rizóbios que nodulam feijoeiro no Brasil, sugeriram que estirpes de *Rhizobium. etli* foram introduzidas no Brasil da América Central através de sementes

de feijão ou como organismos endófitos do milho (GUTIÉRREZ ZAMORA & MARTINEZ-ROMERO ., 2001) em tempos pré coloniais e tem sido presentes desde então. Entretanto, devido a um fato histórico que ocorreu depois de 1942, uma barreira comercial foi estabelecida na América do Sul por domínios da Espanha e Portugal, e o isolamento talvez tenha impedido a propagação de outros genótipos de *R. etli* para o Brasil.

Embora seja consenso que *R. etli* esta estabelecido em solos brasileiros, geralmente não nodula feijão e quando nodula é de forma ineficiente. Contudo, a presença de múltiplas cópias dos genes *nifH* e a diversidade dos genes *nod* no genoma desses microrganismos favorecem a ocorrência de eventos genéticos, como recombinação gênica com outros microrganismos. Como consequência dessa plasticidade genômica, surgem então as biovars como *Rhizobium etli* bv. *phaseoli*. No caso dos *R. tropici* a hipótese seria que embora *R. etli* possuem forma de vida saprofítica nos solos, são menos competidores em relação aos *R. tropici* que por sua vez são caracterizados por serem tolerantes a acidez do solo.()

Em relação ao grupo formado por betaproteobactérias, é visualizado dois subgrupos. Um com relação genética de 100% dos isolados com as espécies de *Burkholderia* e um grupo irmão com uma distância genética praticamente nula com sequência de bases de um isolado de nódulo de soja com a sequência disposta no Genbank confirmada como *Herbaspirillum* sp.

Estudos demonstrados por BALDANI e colaboradores em 2009 que o termo endófito na linha de pesquisa com bactérias fixadoras de nitrogênio associadas às gramíneas forrageiras e cereais foi realizada por DOBEREINER (1992). Desde então diversas pesquisas vem relatando a presença de espécies de *Herbaspirillum* em plantas de milho e sorgo (BALDANI et al.,1986), cana de açúcar (GILLIS et al.,1991: BALDANI et al.,1996), gramíneas forrageiras (OLIVARES et al.,1996: KIRCHHOF et al.,2001).

O grupo das bactérias pertencentes ao gênero *Herbaspirillum* é caracterizado por apresentar diversidade elevada genética intra e interespecíficas (SOARES RAMOS et al.,2003) e por apresentarem baixa sobrevivência no solo (OLIVARES et al.,1996: ARCANJO et al., 2000) o que contribuiu para a inclusão deste gênero no grupo dos

endófitos. Contudo a complexidade genômica dessas bactérias está sendo desvendada através de estudos baseados em métodos moleculares.

O outro grupo das bactérias endofíticas é denominado de Burkholderia e que estão presentes na figura 9 como grupo irmão dos Herbaspirillum. Os isolados de nódulos de soja deste trabalho apresentaram similaridade de 100% nas sequências com as sequências de bases de espécies pertencentes a esse gênero de bactéria e que foram depositadas no banco de dados do Genbank (NCBI). A diazotrofia dessas bactérias foi observada em raízes de plantas de arroz no Japão (GILLIS et al.,1995), cana de açúcar, milho e café cultivados no México (CABALLERO MELLADO et al.,2004) e no Brasil foram isoladas de plantas de cana de açúcar e milho (PERIN et al.,2006) .

Levando se em conta as condições abióticas da região sul matogrossense, práticas de manejo, o mecanismo de ação de algumas bactérias na rizosfera das plantas de soja e a inabilidade de estirpes superiores em ocupar os nódulos em solos com população elevada de estirpes indígenas ou introduzidas e estabelecidas, esses eventos reforçam a hipótese em nosso estudo da presença de rearranjos genéticos envolvidos na aquisição e evolução das funções simbióticas de rizóbios, como os genes ligados a fixação (*nif*), nodulação (*nod*) e até mesmo genes (*hsn*) relacionados aos fatores de reconhecimento entre planta e hospedeiro, chamados de Fatores Nod.

Elevada diversidade genética observada através da análise do sequenciamento da região do gene 16S rDNA pode sugerir uma adaptação dos microrganismos as condições ambientais, incluindo os diferentes manejos do solo, acompanhadas da co evolução entre hospedeiro e simbiote.

O efeito do manejo do solo nas propriedades físicas e químicas pode refletir em mudanças na biologia do solo. Os sistemas de manejo caracterizados com grande aporte de resíduos orgânicos, como o Plantio Direto, representa uma reserva considerável de nutrientes, os quais são continuamente desviados para os ciclos de crescimento dos diferentes organismos que compõem o ecossistema (TOTOLA & CHAER.,2002; MOREIRA & SIQUEIRA., 2002; LOURENTE et al., 2010) que faz então

desses habitats um ambiente favorável para a manutenção e diversidade de microorganismos ali existentes.

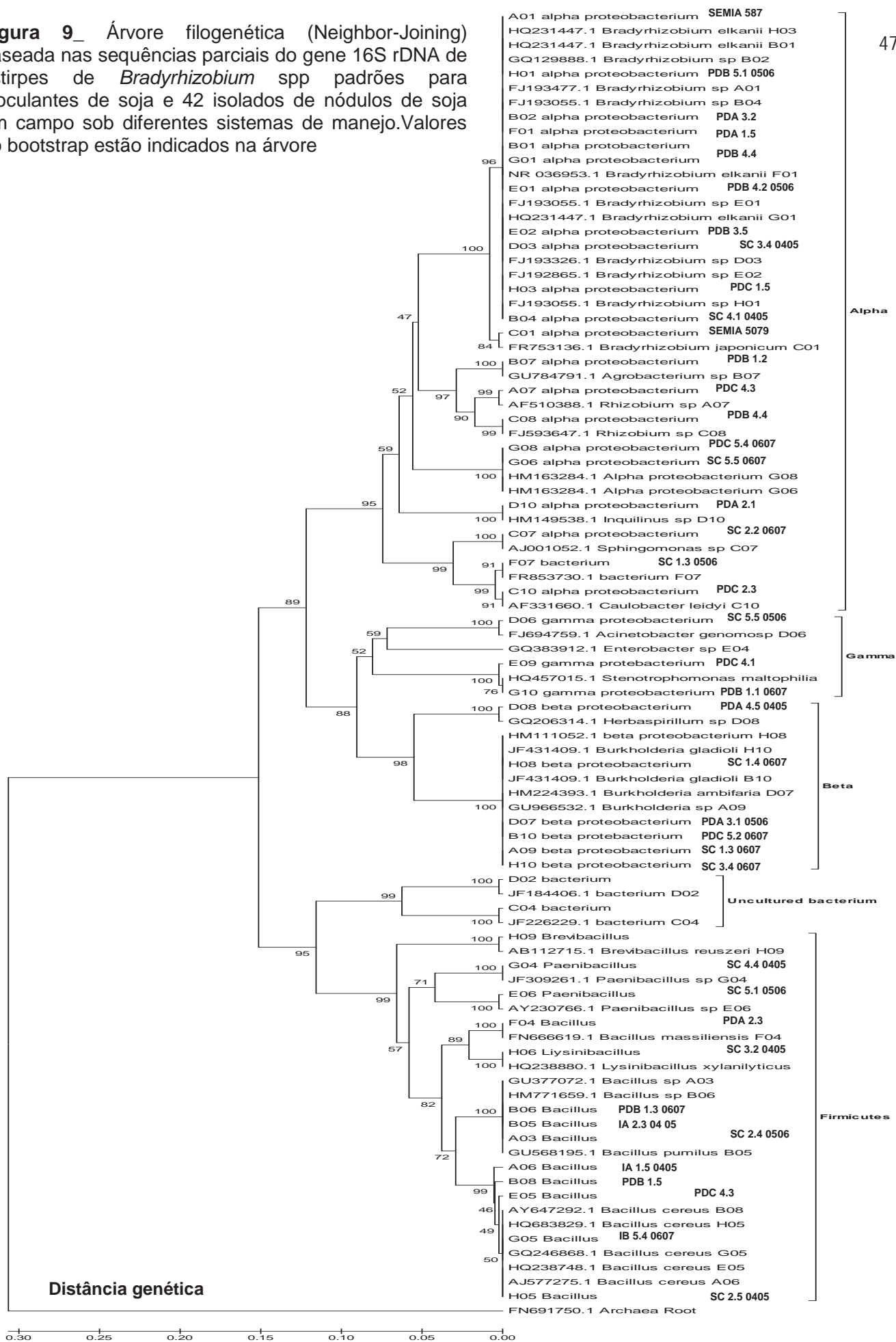
Outro fator que deve ser considerado relevante na diversidade genética é a característica de inverno seco e verão quente e chuvoso da região onde o estudo foi conduzido. A deposição dos resíduos das culturas de inverno associada a precipitações pluviométricas mais frequentes no verão, possivelmente, influenciou um maior crescimento da biomassa microbiana. Durante a estação seca, parte da biomassa microbiana morre e com a retomada das chuvas, a biomassa sobrevivente utiliza as células mortas para o seu crescimento, concorrendo também para uma maior atividade microbiana no verão (período chuvoso), quando comparado ao inverno (PIAO et al., 2000; LOURENTE et al., 2010).

Assim, a diversidade genética observada entre os isolados de nódulos de soja sob diferentes manejos, reflete que em uma estrutura de população o tempo evolutivo pode distinguir do tempo ecológico de modo a alterar os limites genéticos de espécies dentro de pouco tempo mediante a uma condição ambiental (THOMPSON., 1998).

Deve se ressaltar, ainda, que resultados obtidos no presente trabalho, através das análises dos marcadores moleculares fAFLP e sequenciamento parcial da região do gene do 16S rDNA nos permitiu observar elevada promiscuidade de plantas de soja em relação aos seus simbioses.

É de suma importância à realização de estudos posteriores a fim de compreender melhor a relação entre plantas de soja e seus respectivos microsimbioses. E que assim as pesquisas no país possam contribuir com a busca de estirpes mais eficientes e competitivas ao programa de FBN e evitar diminuição no acúmulo de nitrogênio químico em plantas de soja em campo que reflete em perdas na produção e ou produtividade desta cultura no país.

Figura 9_ Árvore filogenética (Neighbor-Joining) baseada nas sequências parciais do gene 16S rDNA de estirpes de *Bradyrhizobium* spp padrões para inoculantes de soja e 42 isolados de nódulos de soja em campo sob diferentes sistemas de manejo. Valores do bootstrap estão indicados na árvore



5. CONCLUSÃO

- 1.O marcador molecular fAFLP demonstrou ser uma técnica sensível para detectar polimorfismos em sequências de DNA de isolados de nódulos de soja de espécies intimamente relacionadas. E o uso do sequenciamento parcial do gene 16S rDNA comprovou ser uma técnica eficiente e de fundamental importância para a classificação taxonômica dos isolados de nódulos de soja.
- 2.Os diferentes manejos do solo aliados aos sistemas de rotação e sucessão de culturas podem influenciar na diversidade genética de isolados de nódulos de soja.
- 3.Entre os sistemas de manejo avaliados, o Plantio direto, foi onde se observou maior a manutenção e diversidade de bactérias pertencentes ao filo Proteobactéria, tais resultados podem sugerir a possibilidade da ocorrência de transferência horizontal de genes entre as espécies presentes nos nódulos das plantas de soja.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APPELBAUM, E. R., D. V. THOMPSON, K. IDLER, AND N. CHARTRAIN. 1988. Bradyrhizobium japonicum USDA 191 has two nodD genes that differ in primary structure and function. **Journal of bacteriology**, v. 170, p.12–20, 1988.

APPUNNU, C; ZOUE,A; LAGUERRE, G. Genetic Diversity of Native Bradyrhizobia Isolated from Soybeans (*Glycine max* L.) in Different Agricultural-Ecological-Climatic Regions of India. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v 74, n.19, p.5991-5996.

ARAÚJO, F. F.; HUNGRIA, M. Nodulação e rendimento de soja co-infectada com *Bacillus subtilis* e *Bradyrhizobium japonicum* / *Bradyrhizobium elkanii*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, p. 1633-1643,1999.

ARCANJO, S. S.; SANTOS, S. T.; TEIXEIRA, K. R. S.; BALDANI, J. I. Occurrence and dissemination of endophytic diazotrophic bacteria in sugarcane fields. In: PEDROSA, F. L.; HUNGRIA, M.; YATES, G.; NEWTON, W. E. Nitrogen fixation: From: molecules to crop productivity. **Current plant sciences and biotechnology in agriculture**, Dordrecht; Kluwer Academic, 2000, v.38, p.605.

ARNOLD, W.; RUMP, A.; KLIPP, W.; PRIEFER, U. B.; PUHLER, A. Nucleotide sequence of a 24,206 base pair fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Molecular Biology**, London, v.203, p.715-738, 1988

AITSCHUL, S. F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 25, p.3.389-3.402, 1997.

BALDANI J. I.; TEIXEIRA, K. R. S.; SCHWAB, S.; OLIVARES, F. L.; HEMERLY, A. S.; URQUIAGA, S.; REIS, M. V.; NOGUEIRA, E. M.; ARAÚJO, J. L. S.; BORGES, L. E.; SOARES, L. H. B.; VINAGRE, F.; BALDANI, V. L. D.; CARVALHO, G. T. L.; ALVES, B. J. R.; JAMES, E. K.; JANTALIA, C. P.; FERREIRA, P. C. G.; VIDAL, M. S.; BODDEY, R. M. Fixação biológica de nitrogênio em plantas da família poaceae (antiga gramineae).

Tópicos em Ciência do Solo, Viçosa MG, v.6, p. 203- 271 2009.

BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DOBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp., a root associated nitrogen fixing bacterium.

International Journal of systematic bacteriology, Amós, v.36, p.86-93, 1986.

BALDANI, J. I.; POT, T. B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HATMANN, A.; GILLIS, M.; DOBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisulbalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF group 1) as *Herbaspirillum* species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Amos, v.46, p.802-810, 1996.

BALOTA, E. L.; KANASHIRO, M.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D. S.; DICK, R. P. Soil enzyme activities under long-term tillage and crop rotation systems in subtropical agro-ecosystems. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.35, p.300-306, 2004.

BARCELLOS, F. G.; MENNA, P.; BATISTA, J. S. S.; HUNGRIA M. Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium* (Ensifer) *fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian Savannah soil. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, p.2635–2643. 2007.

BATISTA, J. S. S.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F. G.; FERREIRA, M. C.; MENDES, I. C. Variability in *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium elkanii* seven years after introduction of both the exotic microsymbiont and the soybean host in a Cerrados soil. **Microbial Ecology**, New York, v.53, p. 270-284, 2007.

BERINGER J.E; BREWIN N; JOHNSTON A.W.B; SCHULMAN H.M; HOPWOOD D.A. The *Rhizobium* legume symbiosis. **Proceedings of the Royal Society**, London Ser B v. 204, p.219-233, 1979.

BREDEMEIER, C.; MUNDSTOCK, C. M. Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.2, p. 365-372, 2000.

BRITISH PETROLEUM, 1996. BP Statistical review of world energy. London: **British Petroleum**, 1996.

BROSIUS, J.; DULL, T. J.; SLEETER, D. D.; NOLLER, H. F. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. **Journal Molecular Biology**, London, v.148, p. 107-127, 1981.

BURK, D.; BURRIS, R. H. Biochemical nitrogen fixation. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v.10, p.587-618, 1941.

CABALLERO-MELLADO, J.; MARTINEZ-AGUILAR, L.; PAREDES-VALDEZ, G.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P. *Burholderia unamae* sp. nov., in N₂ fixing rhizospheric and endophytic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.54, p.1165-1172, 2004.

CARVALHO, F. G; SELBACH, P. A; BIZARRO, M. J. Eficiência e competitividade de variantes espontâneos isolados de estirpes de *Bradyrhizobium* spp recomendadas para a cultura da soja (*Glycine max*). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa MG, v. 29, p. 883-891, 2005.

CHUA, Y.-K., C. E. PANKHURST, P. E. MACDONALD, D. HOPCROFT, B. D. W. JARVIS, AND D. B. SCOTT. Isolation and characterisation of Tn5-induced symbiotic mutants of *Rhizobium loti*. **Journal of Bacteriology**, v.162, p.335–343, 1985.

CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E.; FERREIRA, M. C.; GRANGE, L.; CAMPO, R. J.; MOSTASSO, F. L.; ANDRADE, D. S.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. **Classificação taxonômica, baseada na caracterização molecular, das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro**. Londrina: Embrapa Soja, 2000. 32 p. (Boletim de Pesquisa, 3).

CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E. V.; MOSTASSO, F. L.; CAMPO, R. J.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. Classificação taxonômica das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro baseada no seqüenciamento do gene 16S rRNA. **Revista Brasileira Ciência Solo**, Viçosa MG, v. 27, p.833-840, 2003 .

COLOZZI-FILHO, A.; BALOTA, E.L. Plantio direto: Microrganismos e processos. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.; FAQUIN, V.; FURTINNI, A.E.; CARVALHO, J.G., **Soil fertility, soil biology and plant nutrition interrelationships**. Lavras: SBCS/UFLA/DCS, p.487- 508,1999.

CONAB. *Acompanhamento de safra brasileira*: grãos, safra 2010/2011: quarto levantamento, janeiro 2011. Brasília, DF, 2011. 41 p. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_01_06_08_41_56_boletim_graos_4o_lev_safra_2010_2011..pdf>. Acesso em: 05_02_2011.

DIXON, R. A.; CANNON, F. C.; KONDOROSI, A. Construction of a P plasmid carrying nitrogen fixation genes from *Klebsiella pneumonia*. **Nature**, London, v.260, p.268-271,1976.

DOBEREINER, J. Recent changes in concepts of plant bacteria interactions: Endophytic N₂ fixing bacteria. **Ciência e cultura**, São Paulo, v. 44, p. 310-313, 1992.

ELMERICH, C.; HOUMARD, J.; SIBOLD, L.; MANHEIMER, I.; CHARPIN, N. Genetic and biochemical analysis of mutants induced by bacteriophage Mu DNA integration into *Klebsiella pneumoniae* nitrogen fixation genes. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v.165, p.181-189, 1978.

EPSTEIN, E.; BLOOM, A. J.; *Nutrição mineral de plantas: princípios e perspectivas*. Londrina: Editora Planta, 2006, 403 p.

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

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998, p. 220. (Documento 20)

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

FIETZ, C. R.; FICH, G. F. **O clima da região de Dourados, MS**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 34 p, 2006. (Documentos, 85).

FISHER, K.; NEWTON, W. E. **Nitrogen fixation: a general overview**. Nitrogen fixation at the Millennium, Elsevier, 351p, 2002.

FRANCO, A. A.; SIQUEIRA J.O. **Biotecnologia do solo: fundamentos e perspectivas**. Lavras, 236 p, 1988.

GALIBERT, F.; FINAN, T.M.; LONG, S.R.; PEUHLER, A.; ABOLA, P.; AMPE, F.; BARLOY-HUBLER, F.; BARNETT, M.J.; BECKER, A.; BOISTARD, P.; BOTHE, G.;

BOUTRY, M.; BOWSER, L.; BUHRMESTER, J.; CADIEU, E.; CAPELA, D.; CHAIN, P.; COWIE, A.; DAVIS, R.W.; DREANO, S.; FEDERSPIEL, N.A.; FISHER, R.F.; GLOUX, S.; GODRIE, T.; GOFFEAU, A.; GOLDING, B.; GOUZY, J.; GURJAL, M.; HERNANDEZ-LUCAS, I.; HONG, A.; HUIZAR, L.; HYMAN, R.W.; JONES, T.; KAHN, D.; KAHN, M.L.; KALMAN, S.; KEATING, D.H.; KISS, E.; KOMP, C.; LELAURE, V.; MASUY, D.; PALM, C.; PECK, M.C.; POHL, T.M.; PORTETELLE, D.; PURNELLE, B.; RAMSPERGER, U.; SURZYCKI, R.; THEBAULT, P.; VANDENBOL, M.; VORHOLTER, F.J.; WEIDNER, S.; WELLS, D.H.; WONG, K.; YEH, K.C.; BATUT, J. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. **Science**, Washington, v.293, p.668–672, 2001.

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

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. The road map to the *Manual*. In: BOONE, D. R. & CATENHOLZ, R. W., ED. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. New York, Springer- Verlag, 2001, v.1, p.119-166.

GELAIM, E.; ROSA JUNIOR, E. J.; MERCANTE, F. M.; FORTES, D. G.; SOUZA, F. R.; ROSA, Y. B. C. J. Fixação biológica de nitrogênio e teores foliares de nutrientes na soja em função de doses de molibdênio e gesso agrícola. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.35, p. 259-269, 2011.

GILLIS, M.; DOBEREINER, J.; POT, B.; GOOR, M.; FALSEN, E.; HOSTE, B.; KERSTERS, K. Taxonomic relationships between *Pseudomonas rubrisubalbicans*, some clinical isolates (EF group 1), *Herbaspirillum seropedicae* and (*Aquaspirillum*) autotrophicum. In: POLSINELLI, M.; MATERASSI, R.; VICENZINI, M. **Development in plant and soil sciences**, Dordrecht: Kluwer Academic, 1991, v. 48, p.293-294.

GILLIS, M.; TRAN VAN, T.; BARDIN, R.; GOOR, M.; HERBAR, P.; WILLEMS, A.; SEGERS, P.; KERSTERS, K.; HEULIN, T.; FERNANDEZ, M. P. Polyphasic taxonomy in

the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and preposition of *Burkholderia vietnamiensis* sp. nov. for N₂ fixing isolates from rice in Vietnam. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 45, p. 274-289, 1995.

GOETHALS, K., M. GAO, K. TOMEKPE, M. VAN MONTAGU, AND M. HOLSTERS. Common nodABC genes in nod locus 1 of *Rhizobium caulinodans*: nucleotide sequence and plant-inducible expression. **Molecular Genetic**, v. 219, p.289–298,1989.

GRANGE, L.; HUNGRIA, M.; GRAHAM, P. H.; MARTINEZ-ROMERO, E. New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.39, p.867-876, 2007.

GRANGE, L; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.36, p. 1389-1398.2004.

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

HALL, P. BioEdit –version 5.0.6. Raleigh. North Carolina State University, Department of Microbiology, 2001,191p.

HARPER, J.E. Nitrogen metabolism. In: BOOTE, K.J., BENNETT. J.M., SINCLAIR, T.R., PAULSEN, G. M. **Physiology and determination of crop yield**. Madison, p.285-302, 1994.

HEYTLER, E. G.; REDDY G. S.; HARDY R. W. F. In vivo energetics of symbiotic nitrogen fixation in soybeans. In: LUDDEN, E. W.; BURRIS I. E. **Nitrogen fixation and CO₂ metabolism**. New York: Elsevier science, p. 283-292, 1994.

HUNGRIA, M. Características biológicas em solos manejados sob plantio direto. In: REUNIÓN DE LA RED LATINOAMERICANA DE AGRICULTURA CONSERVACIONISTA, 5,1999, Florianópolis. **Anais**. Florianópolis: EPAGRI, 2000. CD-ROOM.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R. J. Fixação Biológica no Brasil é um exemplo de sucesso. *Visão Agrícola*, Piracicaba, v.5, p. 152, 2006.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J.; MENDES, I.C. **A importância do processo de fixação biológica do nitrogênio para a cultura da soja: componente essencial para a competitividade do produto brasileiro**. Londrina: Embrapa Soja; Embrapa Cerrados, 2007. 80p. (Documentos, 283).

HUNGRIA, M.; FRANCHINI, J.C.; CAMPO, R.J.; CRISPINO, C.C.; MORAES, J.Z.; SIBALDELLI, R.N.R.; MENDES, I.C. & ARIHARA, J. Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: Contributions of biological N₂ fixation and of N fertilizer to grain yield. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.86, p.927-939, 2006b.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brasil. **Fields Crops Research**, Amsterdam, v.65, p.151-164, 2000.

ISLAM, M. S.; KAWASAKI, H.; MURAMATSU, Y.; NAKAGAWA, Y.; SEKI, T. *Bradyrhizobium iriomotense* sp. nov., isolated from a tumor-like root of the legume *Entada koshunensis* from iriomote island in Japan. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, Tokyo, v.72, p.1416-1429, 2008.

JORDAN, D. C. Family III. Rhizobiaceae Conn 1938, In: KNEG, N.R.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore, The Willians & Wilkins, v.1, p.235-244,1984.

JORDAN, D. C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow growing root nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal System Bacteriology**, v.32, p.136-139, 1982.

KANEKO, T., NAKAMURA, Y., SATO, S., MINAMISAWA, K., UCHIUMI, T., SASAMOTO, S., WATANABE, A., IDESAWA, K., IRIGUCHI, M., KAWASHIMA, K., KOHARA, M., MATSUMOTO, M., SHIMPO, S., TSURUOKA, H., WADA, T., YAMADA, M., TABATA, S. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. **DNA Research**, Amsterdam, v. 9, p. 189–197, 2002.

KANEKO, T.; NAKAMURA, Y.; SATO, S.; ASAMIZU, E.; KATO, T.; SASAMOTO, S.; WATANABE, A. IDESAWA, K.; ISHIKAWA, A.; KAWASHIMA, K.; KIMURA, T.; KISHIDA, Y.; KIYOKAWA, C.; KOHARA, M.; MATSUMOTO, M.; MATSUNO, A.; MOCHIZUKI, Y.; NAKAYAMA, S.; NAKAZAKI, N.; SHIMPO, S.; SUGIMOTO, M.; TAKEUCHI, C.; YAMADA, M.; TABATA. S. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. **Pubmed Journal List**, v. 7, p.331–338, 2000.

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; CAMPO, R.J. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. **Applied and Soil Ecology**, Amsterdam, v.32.p.210-220, 2006a.

KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; SANTOS, J.C.P.; BERTON JUNIOR, J.F. Differences in common bean rhizobia populations associated with soil tillage management in southern Brazil. **Soil Tillage Research**, Amsterdam, v.87,p.205-217, 2006b.

KENNEDY, C. Linkage map of nitrogen fixation (*nif*) genes in *Klebsiella pneumoniae*. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v.157, p.199-204, 1977.

KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; HATMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp., nov., new nitrogen fixing bacterial species that occurs in C₄ fiber plants. **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.51, p.157-168, 2001.

KROLOW, R.H.; MISTURA, C.; COELHO, R. W.; SIEWERDT, L.; ZONTA, E. P. Efeito do fósforo e do potássio sobre o desenvolvimento e a nodulação de três leguminosas anuais de estação fria. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa MG, v.33, p.2224-2230, 2004.

KUMAR, S.; TAMURA, I. B.; JAKOBSEN, M. NEI. 2009. MEGA 4: Molecular evolutionary genetics analysis software. Tempe: Arizona State University. Free program distributed by t WARDLE, D. A.; GILLER, K. E. The quest for a contemporary ecological dimension to Soil biology. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 28, n. 12, p. 1.549-1.554, 1996. he authors over the Internet from the website <http://www.megasoftware.net/>.

KUYKENDALL, L. M.; SAXENA, B.; DEVINE, T. E.; UDELL, S. E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. **Journal of Microbiology**, London, v.38, p. 501-503, 1992.

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

LAVELLE, P.; SPAIN, A. V. **Soil ecology**, Dordrecht: Kluwer Academic, 2001.

LEMOS, E.G.M. **Classificação e identificação de bradirrizóbios que nodulam soja por análise de padrões isoenzimáticos, sorologia, morfologia de colônias e atividade da hidrogenase**. 1994. 108p. Jaboticabal, Universidade Estadual de São Paulo, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Tese (Livre-Docência).

LIMA, A.S.; PEREIRA, J.P.A.R.; MOREIRA, F.M.S. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp de solos da Amazônia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, p.1095-1104, 2005.

LOURENTE, E. R. P.; MERCANTE, F. M.; MARCHETTI, M. E.; SOUZA, L. C. F.; SOUZA, C. M. A.; GONÇALVES, M. C.; SILVA, M. A. G. Crop rotation and soil biochemical and microbiological characteristics and corn crop yield. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n.4, p. 829-842, 2010.

LUNGE, V.R.; IKUTA, N.; FONSECA, A.S.K.; HIRIGOYEN, D.; STOLL, M.; BONATTO, S. & OZAKI, L.S. Identification and inter-relationship analysis of *Bradyrhizobium japonicum* strains by restriction fragment length polymorphism (RFLP) and random amplified polymorphic DNA (RAPD). **World Journal of Microbiology. Biotechnology**, Oxford, v.10, p.648-652, 1994.

MA, Y-C.; CHEN, S. F. *Paenibacillus forsythia* sp. Nov., a nitrogen-fixing species isolated from rhizosphere soil of *Forsythia mira*. **Internacional Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, Reading, v.58, p.319-323, 2008.

MACNEIL, T.; MACNEIL, D.; ROBERTS, G. P.; SUPIANO, M. A.; BRILL, J. W. Fine structure mapping and complementation analysis of nif (nitrogen fixation) genes in *Klebsiella pneumonia*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.136, p.253-266,1978.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Homepage**. Disponível em:< <http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: nov.2011

MARMUR, J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. **Journal of Molecular Biology**, London, v.3,p.208-218,1961.

MARSCHNER, H. **Mineral Nutrition of higher plants**. London: Academic Press, 889 p,1995.

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

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

MERCANTE, F.M; STAUT, L.A; OTSUBO A.A; KURIHARA C.H. **Nutrição nitrogenada na cultura da soja em Mato Grosso do Sul**: Reinoculação x adubação nitrogenada. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 6 p. (Comunicado técnico, 66.)

MERRICK, M. J. Organization and regulation of nitrogen fixation genes in *Klebsiella* and *Azotobacter*. In: BOTHE, H.; BRUIJN, F. J.; NEWTON, W. E., (ed) *Nitrogen fixation: hundred years after*. Stuttgart: Gustav Fischer, 1988, p.293-302.

MIFLIN, B.J., LEA, P.J. The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochemistry*, New York, v.15, p.873-885, 1976.

MOREIRA, F.M.S; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002, 626p.

MOULIN, L.; BENA, G.; MASSON-BOIVIN, C.; STEZPKOWSKI, T. Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the *Bradyrhizobium* genus. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v.30,p. 720–732, 2004.

MULLIGAN, J. T; LONG. S. R. A family of activator genes regulates expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. **Genetics**, Stanford, v.122, p7–18,1989.

MYLONA, E.; PAWLOWSKI, K.; BISSELING T. Symbiotic nitrogen fixation. **The Plant cell**, Waterbury, v.7, p. 869-885, 1995.

OLIVARES, F. L.; BALDANI, V. L. D.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; DOBEREINER, J. Occurrence of endophytic diazotroph *Herbaspirillum* spp in roots, stems and leaves preominatly of Gramineae. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.21, p. 197-200, 1996.

OLSEN, G.J.; WOESE, C.R. Ribosomal RNA: a key to phylogeny. The **FASEB Journal**, Bethesda, v.7,p.113-123,1993.

PEREIRA, A. A.; HUNGRIA, M; FRANCHINI, J. C; KASCHUK, G; CHUEIRE, L. M. O; CAMPO, R. J; TORRES, E. Variações qualitativas e quantitativas na microbiota do solo e na fixação biológica do nitrogênio sob diferentes manejos com soja. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, Campinas, 31, p.1397-1412, 2007.

PERIN, L.; MARTINEZ-AGUILAR, L.; PAREDES VALDEZ, G.; BALDANI, J. I.; ESTRADA DE LOS SANTOS, P.; REIS, V. M.; CABALLERO-MELADO, J. *Burkholderia silvatlantica* sp. nov., a diazotrophic bacterium associated with sugarcane and maize. **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Seropédica, v.56, p.1931-1937, 2006.

PERRET, X; STAEHELIN, C; BROUGHTON, W. J. Molecular Basis of Symbiotic Promiscuity, **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Wasghington, v.64, n.1, p.180-201,2000.

PIAO, H. C.; HONG, Y. T.; YUAN, Z. Y. Seasonal changes of microbial biomass carbon related to climatic factors in soils from Karst areas of southwest China. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 30, n. 4, p. 294-297, 2000.

PINTO, F. G. S. P; HUNGRIA, M; MERCANTE, F. M. Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). . **Soil Biology and Biochemistry**, Londrina, v.39, p. 1851-1864.

POLANCZYK, R.; ALVES, S. *Bacillus thuringiensis*: UMA BREVE REVISÃO. **Revista Agrociência**, Lavras, v. 7, p. 1-10, 2003.

POWLSON, D. S.; JENKINSON, D.S. A comparison of organic matter, biomass, adenosine triphosphate and mineralizable nitrogen contents of plowed and direct drilled soils. **Journal of Agricultural Sciences**, Cambridge, v.97, p.713-721,1981.

PROVOROV, N. A.; VOROBÉ'V, N. I. Evolutionary genetics of nodule bacteria: molecular and population aspects. **Journal of Genetics**, Zangalore, v.36, p.1323-1335, 2000.

QUIAN, J.; KWON, S. W.; PARKER, M. A. rRNA and nifD phylogeny of Bradyrhizobium from sites across the Pacific basin. **FEMS Microbiology Letters**, Geneva, v. 219, p 159-165,2003.

RADUTOIU, S; MADSEN, L. H; MADSEN, E. B; FELLE, H, H; UMEHARA, Y; GRONLUND, M; SATO, S; NAKAMURA Y; TABATA, S; SANDAL, N; STOUGAARD, J. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases, Germany, **Nature**, v.425, n. 9, p. 585-592, 2003.

RAMIREZ-BAHENA, M. H.; PEIX, A.; RIVAS, R.; CAMACHO, M; RODRIGUEZ-NAVARRO, D. N.; MATEOS, P. F.; MARTINEZ-MOLINA, E.; WILLEMS, A.; VELÁSQUES, E. *Bradyrhizobium pachyrizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Reading, v.59, p.1929-1934, 2009.

RELARE. Rede de Laboratórios para Recomendação, **padronização e difusão de tecnologias de inoculantes microbianos de interesse agrícola**. Disponível em: <www.relare.org.br>. Acesso em: nov. 2010. Homepage.

RHIJN, V, P; and VANDERLEYDEN, J. **The Rhizobium-Plant Symbiosis. Microbiological Reviews**, Belgium, v. 59, n. 1, p. 124-142, 1995.

RISAL, C. P.; YOKOHAMA, T.; OHTSU-OHKAMA, N.; DJEDIDI, S.; SEKIMOTO, H. Genetic diversity of native soybean bradyrhizobia from different topographical regions along the southern slopes of the Himalayan Mountains in Nepal. **Systematic and Applied Microbiology**, Nepal, v.33, p.416-425, 2010.

RIVAS, R.; WILLEMS, A.; PALOMO, J. L.; GARCIA-BENAVIDES, P.; MATEOS, P. F.; MARTINEZ-MOLINA, E.; GILLIS, M.; VELÁSQUEZ, E. Bradyrhizobium betae sp. nov. isolated from roots of Beta vulgaris affected by tumor-like deformations. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v.54, p.1271-1275, 2004.

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

RUMJANEK, N.G.; DOBERT, R.C.; VAN BERKUM, P. & TRIPLETT, E.W. Common soybean inoculant strains in Brazil are members of Bradyrhizobium elkanii. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.4371-4373, 1993.

SAIKIA, S.P; JAIN, V. Biological nitrogen fixation with non-legumes: An achievable target or a dogma? **Current Science**, Bangalore, v. 92, p.10,2007.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees. **Molecular Biology Evolution**, Chigago, v. 4, p.406-425, 1987.

SALTON, J. C.; FABRÍCIO, A. C.; MACHADO, L. A. Z.; FILHO, G. M.; URCHEI, M. A.; OLIVEIRA, H.; BROCH, D. L.; FREITAS, P. L.; MUSSURY, R. M.; RICHETTI, A. Impacto ambiental de sistemas intensivos de produção de grãos e de carne bovina na

região oeste do Brasil. In: DIAZ ROSELLO, R.(Coord.). **Siembra directa en el Cono Sur**. Montevideo:PROCISUR, 2001. p. 43-53.

SAWADA, H.; KUYKENDALL, L.D.; YOUNG, J. M.; Changing concepts in the Systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. **Journal of Genetic and Applied Microbiology**, v. 49, p. 155-179, 2003.

SILVA, R. F. AQUINO, A. M.; MERCANTE, F. M.; GUIMARÃES, M, F. Macrofauna invertebrada do solo em sistema integrado de produção agropecuária no Cerrado. **Acta Scientia Agronomic**, Maringá, v.30, p. 725-731, 2008.

SILVER, W.S; POSTGATE, J.R. Evolution of asymbiotic nitrogen fixation. **Journal of Theoretical Biology**, London, v. 40, p.1-10,1973.

SOARES RAMOS, J. R. L.; RAMOS, H. J. O.; CRUZ, L. M.; CHUBATSU, L. S. Comparative molecular analyses of Herbaspirillum strains by RAPD, RFLP, and 16S rDNA sequencing. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v.26, p. 537-543, 2003.

STREICHER, S. L.; GURNEY, E. G.; VALENTINE, R. C. The nitrogen fixation genes. **Nature**, London, v.239, p.495-499, 1972.

SULLIVAN, J. T., RONSON, C. W. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-Kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, v. 95, p.5145–5149,1998.

SULLIVAN, J. T., TRZEBIATOWSKI, J. R.; CRUICKSHANK R. W., GOUZY J., BROWN D.S., ELLIOT R. M.; FLEETWOOD, D. J.; MCCALLUM N. G.; ROSSBACH, U.; STUART, G. S. S, J. E.; WEAVER, J. E.; WEBBY, R, J.; DE BRUIJN, F. J.; RONSON, C. W. Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. **Journal of Bacteriology**, Wasghington, v. 184:p. 3086–3095, 2002.

SWOFFORD, D.L.; OLSEN, G.J.; WADDELL, P.J.; HILLIS, D.M. Phylogenetic Inference. In: HILLIS, D. M.; MORITZ, G.; MABLE, B. K. **Molecular systematics**, Sunderland: Sinauer Associates, 1996, p. 407-514.

TEIXEIRA, K. R. S. **Bases moleculares e genética da fixação de nitrogênio**. Seropédica: Embrapa – CNPAB, 1997, 26p. (Documentos, 32).

TEIXEIRA, K. R. S. **O mecanismo de regulação da FBN e sua diversidade**. Seropédica: Embrapa – CNPAB, 1997, 25p. (Documentos, 40).

THIES, J. E.; HOLMES, E. M.; VACHOT, A. Application of molecular techniques to studies in Rhizobium ecology: a review. **Journal of Experimental Agriculture**, Austrália, v.41, p.299-319, 2001.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T. J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.11, n.:22, p.4.673-4.680, 1994.

THOMPSON, J. N. Rapid evolution as an ecological process. **Trends Ecology & Evolution**, Amsterdam, v.13, p.329-332, 1998.

TOLEDO, B. F. B.; MARCONDES, J.; LEMOS, E. G. M. Characterization of rhizobia indicated for inoculant production using 16S rRNA partial sequencing. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 4, 2009

TÓTOLA, M. R.; CHAER, G. M. Microorganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. **Tópicos em Ciências do Solo**, Viçosa, v. 2, n. 2, p. 195-276, 2002.

TRIPLETT, E. W.; ALBRECHT, K. A.; OPLINGER, E. S. Crop rotation effects on populations of *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium meliloti*. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v.27, p.781-784.

TURNER, S.L., YOUNG, J.P.W. The glutamine synthetase of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.17, p.309–319, 2000.

VAZQUEZ, M., A. DAVALOS, A. DE LAS PENAS, F. SANCHEZ, AND C. QUINTO. 1991. Novel organization of the common nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strains. **Journal of Bacteriology**, Washington, v 173, p.1250–1258.

VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.65, p. 151-164, 2000.

VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Fixação biológica do N₂ na cultura da soja. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M.,. **Biologia dos solos de Cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p.297-360.

VIDEIRA, S. S.; SIMOES-ARAUJO, J. L.; BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D. Identificação de Sphingomonas sp. fixadoras de nitrogênio isoladas de arroz (*Oryza sativa* L.). In: REUNIAO BRASILEIRA DE FERTILIDADE DO SOLO E NUTRICAÇÃO DE PLANTAS, 27.; REUNIAO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 11.; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 9.; REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 6.; 2006, BONITO. A busca pelas raízes. **Anais**. Bonito: SBM; Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2006. CD ROM. (Documentos, 82).

VINCENT, J. M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970, p. 3-4, (Handbook 15).

VINUESA, P.; LEÓN-BARRIOS, M.; SILVA, C.; WILLEMS, A.; JARABO-LORENZO, A.; PÉREZ-GALDONA, R.; WERNER, D.; MARTINEZ-ROMERO, E. *Bradyrhizobium canariense* sp. nov. an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteeae) growing in the Canary islands , along with *B. japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies α and *Bradyrhizobium* genospecies β . **International Journal Systematics Evolutionary Microbiology**, v.55, p.569-575, 2005.

VINUESA, P.; SILVA, C.; WERNER, D.; MARTINEZ-ROMERO, E. Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. **International Phylogenetic and Evolution**, v.34, p.29-54, 2005.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; van de LEE, T.; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, London, v.23, n.21, p.4407-4414, 1995.

WASIKE, V. W.; LESUER, D.; WACHIRA, F. N.; MUNGAI, N. W.; MUMERA, L. M.; SANGINGA, N.; MBURU, H. N.; MUGADI, D.; WANGO, P.; VANLAUE, B. Genetic diversity of indigenous *Bradyrhizobium* nodulating promiscuous soybean (*Glycine max* (L) Merr) varieties in Kenya: Impact of phosphorus and lime fertilization in two contrasting sites. **Plant soil**, v.322, p.151-163, 2009.

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

WILSON, K. H.; BLITCHINGTON, R. B.; GREENE, R. C. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, Durham, v.28, p.1942-1946, 1990.

WOESE, C. R. Bacterial Evolution. **Microbiology Reviews**, London, v.51, n.2, p.221-271,1987.

XIE, C. H.; YOKOTA, A. *Sphingomonas azotofigans* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of *Oryza sativa*. **Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, Reading, v.56, p.889-893, 2006.

XU, L. M.; GE, C.; CUI, Z.; LI, J.; FAN, H. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybean. **International Journal Systematics Bacteriology**, v.45, p.706-711, 1995.

YAO, Z. Y.; KAN, F. L.; WANG, E. T.; WEI, G. H.; CHEN, W. X. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, v.52, p.2219-2230, 2002.

ZABEAU, M; VOS, P. **Selective restriction fragment amplification** : a general method for DNA fingerprinting. European Patent Office, publication 0 534 858 A1.

ZAKHIA, F.; DE LAJUDIE, P. Taxonomy of rhizobia. **Journal Agronomy for Sustainable Development**, França, v.21, p. 569-576, 2001.

APÊNDICE

Relação de estirpes isoladas de nódulos de soja sobre manejos do solo e safras diferentes

ISOLADO	MANEJO	SAFRA	SIGLA
1.2	Convencional	2004-05	C
1.3	Convencional	2004-05	C
1.4	Convencional	2004-05	C
2.1	Convencional	2004-05	C
2.2	Convencional	2004-05	C
2.5	Convencional	2004-05	C
3.1	Convencional	2004-05	C
3.2	Convencional	2004-05	C
3.3	Convencional	2004-05	C
3.4	Convencional	2004-05	C
4.1	Convencional	2004-05	C
4.3	Convencional	2004-05	C
4.4	Convencional	2004-05	C
4.5	Convencional	2004-05	C
1.1	Plantio direto (faixa a)	2004-05	PDA
1.2	Plantio direto (faixa a)	2004-05	PDA
4.3	Plantio direto (faixa a)	2004-05	PDA
4.5	Plantio direto (faixa a)	2004-05	PDA
5.1	Plantio direto (faixa a)	2004-05	PDA
5.4	Plantio direto (faixa a)	2004-05	PDA
1.1	Plantio direto (faixa c)	2004-05	PDC
1.4	Plantio direto (faixa c)	2004-05	PDC
1.5	Plantio direto (faixa c)	2004-05	PDC
2.2	Plantio direto (faixa c)	2004-05	PDC
2.4	Plantio direto (faixa c)	2004-05	PDC
4.3	Plantio direto (faixa c)	2004-05	PDC
4.5	Plantio direto (faixa c)	2004-05	PDC
5.2	Plantio direto (faixa c)	2004-05	PDC
1.2	Integração lavoura-pecuária (faixa A)	2004-05	IA
1.5	Integração lavoura-pecuária (faixa A)	2004-05	IA
2.2	Integração lavoura-pecuária (faixa A)	2004-05	IA
2.3	Integração lavoura-pecuária (faixa A)	2004-05	IA
2.4	Integração lavoura-pecuária (faixa A)	2004-05	IA
4.2	Integração lavoura-pecuária (faixa A)	2004-05	IA
4.3	Integração lavoura-pecuária (faixa A)	2004-05	IA
4.5	Integração lavoura-pecuária (faixa A)	2004-05	IA
5.1	Integração lavoura-pecuária (faixa A)	2004-05	IA
5.2	Integração lavoura-pecuária (faixa A)	2004-05	IA

5.3	Integração lavoura-pecuária (faixa A)	2004-05	IA
5.4	Integração lavoura-pecuária (faixa A)	2004-05	IA
1.1	Convencional	2005-06	C
1.3	Convencional	2005-06	C
1.4	Convencional	2005-06	C
2.2	Convencional	2005-06	C
2.4	Convencional	2005-06	C
2.5	Convencional	2005-06	C
3.4	Convencional	2005-06	C
3.5	Convencional	2005-06	C
5.1	Convencional	2005-06	C
5.3	Convencional	2005-06	C
5.4	Convencional	2005-06	C
5.5	Convencional	2005-06	C
1.3	Plantio direto (faixa A)	2005-06	PDA
1.5	Plantio direto (faixa A)	2005-06	PDA
2.1	Plantio direto (faixa A)	2005-06	PDA
2.2	Plantio direto (faixa A)	2005-06	PDA
2.3	Plantio direto (faixa A)	2005-06	PDA
2.5	Plantio direto (faixa A)	2005-06	PDA
3.1	Plantio direto (faixa A)	2005-06	PDA
3.2	Plantio direto (faixa A)	2005-06	PDA
3.3	Plantio direto (faixa A)	2005-06	PDA
5.3	Plantio direto (faixa A)	2005-06	PDA
1.1	Plantio direto (faixa B)	2005-06	PDB
2.2	Plantio direto (faixa B)	2005-06	PDB
2.4	Plantio direto (faixa B)	2005-06	PDB
3.4	Plantio direto (faixa B)	2005-06	PDB
3.5	Plantio direto (faixa B)	2005-06	PDB
4.2	Plantio direto (faixa B)	2005-06	PDB
4.4	Plantio direto (faixa B)	2005-06	PDB
5.1	Plantio direto (faixa B)	2005-06	PDB
5.3	Plantio direto (faixa B)	2005-06	PDB
1.3	Convencional	2006-07	C
1.4	Convencional	2006-07	C
2.2	Convencional	2006-07	C
2.5	Convencional	2006-07	C
3.4	Convencional	2006-07	C
3.5	Convencional	2006-07	C
4.3	Convencional	2006-07	C
4.4	Convencional	2006-07	C

5.3	Convencional	2006-07	C
5.4	Convencional	2006-07	C
5.5	Convencional	2006-07	C
1.1	Plantio direto (faixa B)	2006-07	PDB
1.2	Plantio direto (faixa B)	2006-07	PDB
1.3	Plantio direto (faixa B)	2006-07	PDB
1.4	Plantio direto (faixa B)	2006-07	PDB
1.5	Plantio direto (faixa B)	2006-07	PDB
2.2	Plantio direto (faixa B)	2006-07	PDB
2.5	Plantio direto (faixa B)	2006-07	PDB
3.1	Plantio direto (faixa B)	2006-07	PDB
4.4	Plantio direto (faixa B)	2006-07	PDB
4.5	Plantio direto (faixa B)	2006-07	PDB
5.1	Plantio direto (faixa B)	2006-07	PDB
1.1	Plantio direto (faixa C)	2006-07	PDC
1.2	Plantio direto (faixa C)	2006-07	PDC
1.3	Plantio direto (faixa C)	2006-07	PDC
1.5	Plantio direto (faixa C)	2006-07	PDC
2.3	Plantio direto (faixa C)	2006-07	PDC
2.4	Plantio direto (faixa C)	2006-07	PDC
3.5	Plantio direto (faixa C)	2006-07	PDC
4.1	Plantio direto (faixa C)	2006-07	PDC
4.2	Plantio direto (faixa C)	2006-07	PDC
4.3	Plantio direto (faixa C)	2006-07	PDC
5.2	Plantio direto (faixa C)	2006-07	PDC
5.3	Plantio direto (faixa C)	2006-07	PDC
5.4	Plantio direto (faixa C)	2006-07	PDC
2.1	Integração lavoura-pecuária (faixa B)	2006-07	IB
2.2	Integração lavoura-pecuária (faixa B)	2006-07	IB
3.2	Integração lavoura-pecuária (faixa B)	2006-07	IB
3.4	Integração lavoura-pecuária (faixa B)	2006-07	IB
5.4	Integração lavoura-pecuária (faixa B)	2006-07	IB
SEMIA 587	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>		
SEMIA 5019	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>		
SEMIA 5079	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>		
SEMIA 5080	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>		