

# CARACTERIZAÇÃO DE RIZÓBIOS ISOLADOS DE JACATUPÉ CULTIVADO EM SOLO SALINO DO ESTADO DE PERNAMBUCO, BRASIL <sup>(1)</sup>

ANA DOLORES SANTIAGO DE FREITAS <sup>(2)</sup>; CAROLINA LUCENA VIEIRA <sup>(2)</sup>;  
CAROLINA ETIENE DE ROSÁLIA E SILVA SANTOS <sup>(2)</sup>; NEWTON PEREIRA STAMFORD <sup>(2)</sup>;  
MARIA DO CARMO CATANHO PEREIRA DE LYRA <sup>(3)</sup>

## RESUMO

Pesquisas sobre a biodiversidade microbiológica de solos salinos envolvem a busca por genótipos tolerantes a esse tipo de estresse ambiental. Dados genotípicos correlacionados às características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas de bactérias fornecem informações importantes para sua identificação e agrupamento. Este trabalho objetivou caracterizar rizóbios provenientes de solos salinos, do Agreste e Sertão de Pernambuco, utilizando jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) como planta-isca. Os testes foram efetuados em meio YMA e as características culturais observadas em 24 isolados foram as seguintes: mudança de pH, tempo de crescimento, transparência, forma, borda, produção de exopolissacarídeo das colônias e resistência à salinidade. Os testes moleculares utilizando análise por PCR (reação em cadeia da polimerase) por meio de seqüências repetitivas de DNA amplificadas com o primer BOX envolveram 13 isolados. Os resultados revelaram alta diversidade fenotípica e genotípica entre os isolados nativos. As características culturais e genéticas desses isolados foram comparados com 19 estirpes de referência. Os isolados NFB746 e NFB747 tiveram alta semelhança entre si e também com as estirpes *Rhizobium* sp. NGR234 (BR2406) e *Mesorhizobium ciceri* USDA3383 (BR521). O isolado NFB742, possivelmente, era da mesma espécie de *M. ciceri* (BR521). Com relação ao isolado NFB741, a semelhança com as bactérias *Rhizobium tropici* IIA CFN299<sup>T</sup> (BR10016) e *Sinorhizobium terangue* USDA4894 (BR527) foi de 87%. Os demais isolados, praticamente, formaram grupos independentes quando comparados com as estirpes de referência. Os resultados foram de grande relevância para diagnosticar novas espécies de rizóbios nativos altamente tolerantes a estresses ambientais.

**Palavras-chave:** fixação biológica do N<sub>2</sub>, marcador genético, características culturais e genéticas.

## ABSTRACT

### CHARACTERIZATION OF ISOLATED RHIZOBIA OF *PACHYRHYZUS EROSUS* CULTIVATED IN SALINE SOIL OF THE STATE OF PERNAMBUCO, BRAZIL

Investigation on microbiological biodiversity in the saline soils involves searching for tolerant genotypes to this type of environmental stress. Genotypic data associated to morphologic, physiological and biochemical characteristics of bacteria provide important information regarding its identification and clusters. The objective of this work was to characterize indigenous rhizobial strains of saline soils in the Wasteland and Hinterland of Pernambuco State, using yam bean (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) as plant-tramp. Assays had been performed in YMA media and the observed cultivation characteristics of twenty-four isolates had been: change of pH, time of growth, transparency, form, edge, production of exopolysaccharides of the colonies and resistance to salinity. DNA amplification by the PCR technique of the repetitive sequence BOX indicated a high level of genetic and fenotypic diversity between the thirteen indigenous isolates. Comparing cultivation and genetic characteristics of these isolates with

---

<sup>(1)</sup> Recebido para publicação em 9 de outubro de 2006 e aceito em 21 de março de 2007.

<sup>(2)</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Departamento de Agronomia, Laboratório de Microbiologia do Solo, Rua Dom Manoel de Medeiros s/n.º, Dois Irmãos, 52171-900 Recife (PE), Brasil. E-mail: ana.freitas@depa.ufrpe.br (\*) Autora correspondente.

<sup>(3)</sup> Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária - Laboratório de Genoma - IPA, Av. General San Martin, 1371, Bonji, 50761-000 Recife (PE). E-mail: mccatano@ipa.br

nineteen reference strains, indicated that isolates NFB746 and NFB747 had presented high similarity between them and also with the *Rhizobium* sp. NGR234 (BR2406) and *Mesorhizobium ciceri* USDA3383 (BR521). The isolated NFB742 possibly belongs to of the same species of the *M. ciceri* BR521. In relation to the isolated NFB741, the similarity with the *Rhizobium tropici* IIA CFN299<sup>T</sup> (BR10016) and *Sinorhizobium terangue* USDA4894 (BR527) was of 87%. All others isolates had clustered in comparative independent groups when compared to reference lineages. These results are important for diagnosis of new species of native rhizobia in areas where the use of FBN can improve and rehabilitate saline soil using the rizobia-leguminous interaction.

**Key words:** biological nitrogen fixation, genetic markers, genetics and cultivation characteristics.

## 1. INTRODUÇÃO

A simbiose entre leguminosas e bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> atmosférico é amplamente aceita como alternativa à fertilização química. Bactérias do grupo dos rizóbios têm a capacidade de formar nódulos em raízes e caules de leguminosas e possui papel importante na agricultura sustentável. Devido à importância ecológica e econômica dos rizóbios, a diversidade dessas bactérias tem sido investigada extensivamente e a taxonomia rizobiana vem sofrendo mudanças significativas nas últimas três décadas (LIU et al., 2005). Apesar da inoculação com rizóbios representar alternativa viável, o potencial econômico ainda não foi totalmente estabelecido devido a problemas com o inoculante, que envolvem, entre outras coisas, a sensibilidade das estirpes inoculadas aos estresses bióticos e abióticos (STREETER, 1994).

Em regiões semi-áridas, o acúmulo de sais é um problema que leva à degradação do solo. Solos salinos, em geral, contêm valores muito baixos de nitrogênio, não adequados para o cultivo da maioria das plantas. Uma solução apropriada para a situação é o cultivo de plantas capazes de fixar nitrogênio através da simbiose rizóbio-leguminosa. Entretanto, a maioria das plantas e dos rizóbios é sensível à salinidade (SINGLETON et al., 1986). O Jacatupé (*Pachyrhizus erosus* L. Urban), ou *yam bean*, é uma leguminosa herbácea de raízes tuberosas, com grande potencial de utilização na nutrição humana, na obtenção do amido industrial, na produção da massa protéica, como forrageira e adubo verde (SORENSEN, 1996). Nessa cultura tem-se observado certo grau de tolerância para cultivo em situações adversas, como salinidade do solo (STAMFORD et al., 2003), em que se pode tornar uma cultura com excelentes possibilidades para exploração econômica no futuro. Embora existam trabalhos demonstrando a viabilidade da inoculação dessa leguminosa com estirpes selecionadas (CRUZ et al., 1997; STAMFORD et al., 1999), pouco ainda se sabe sobre as características morfofisiológicas e genéticas de seu microssimbionte.

O isolamento e a seleção de rizóbios com características de tolerância ao estresse salino vêm revelando alto grau de diversidade nas populações

deste microrganismo nos solos, principalmente em regiões tropicais (NEVES e RUMJANECK, 1998). O estudo da biodiversidade de rizóbio busca entender suas relações ecológicas e evolutivas, visando encontrar genótipos tolerantes aos distintos estresses ambientais que vão limitar a simbiose, levando a um manejo mais eficiente dessa interação (STRALIOTTO e RUMJANECK, 1999). Os métodos fenotípicos clássicos são usados nos protocolos de identificação, por compreenderem dados morfológicos, fisiológicos e bioquímicos do maior número possível de isolados e pela adaptabilidade ecológica às condições ambientais. Portanto, estudos sobre a tolerância em condições de salinidade (STAMFORD et al., 1988), pH (MARTINS et al., 1997), temperatura e antibióticos (PEREIRA et al., 1999) são frequentemente realizados para estabelecer correlações entre os dados de diversidade metabólica e eficiência simbiótica das estirpes. Pelas técnicas moleculares, usando métodos simples e rápidos de caracterização de populações microbianas, estimula-se o estudo de microrganismos que vivem em ambientes inexplorados ou adversos, para buscar a descrição de novos gêneros e espécies de bactérias associadas a leguminosas tropicais (YOUNG e HAUKA, 1996; De LAJUDIE et al., 1998; NICK et al., 1999; VELÁSQUEZ et al., 2001) e demonstrar sua diversidade (AGUILAR et al., 2001; CHEN et al., 2000; GAO et al., 2001; ODEE et al., 2002). Em estudos realizados por FERNANDES et al (2003), foi demonstrado que a técnica de BOX-PCR pode indicar grau elevado de diversidade genética entre rizóbios, sendo um método eficiente para diferenciar estirpes. O objetivo deste trabalho foi caracterizar fenotípica e genotipicamente rizóbios nativos de solos salinos do semi-árido de Pernambuco capazes de nodular o jacatupé, bem como estimar sua diversidade genética.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Foi obtida uma coleção de isolados de rizóbios de nódulos de raízes de jacatupé cultivado por 35 dias em solos salinos, com condutividade elétrica do extrato da pasta saturada variando entre 4,12 e 7,15 dS/m (EMBRAPA, 1997), provenientes do Agreste e do Sertão de Pernambuco (municípios de Custódia,

São Bento do Una e Pesqueira). O isolamento do rizóbio foi feito segundo método de HUNGRIA (1994) em meio YMA, com adição do corante Azul de Bromotimol. Para obtenção de isolados puros, as colônias foram cultivadas por três vezes consecutivas em placas de Petri contendo meio YMA (VINCENT, 1970) corado com vermelho congo, e mantidas a 28 °C por 72 horas. Após a purificação, os isolados foram repicados para placas de Petri contendo meio YMA com Azul de Bromotimol, para observação do tempo de crescimento das colônias, habilidade de alterar o pH do meio, forma, tipo de borda e produção de exopolissacarídeos. As características observadas para cada isolado foram transformadas em dados binários, utilizando-se o Programa NTSYS-pc versão 2.10, para construção de uma matriz, e o algoritmo UPGMA - Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean, (SNEATH e SOKAL, 1973) e Coeficiente de Jaccard (J) para geração de um dendrograma de similaridade fenotípica.

O ensaio de tolerância à salinidade foi realizado adicionando-se 4, 8, 12, 16 e 20 g de NaCl por litro de meio YM, ajustando-se o pH para as faixas de 6,8 e 8,0. Dos isolados obtidos dos nódulos das raízes de jacatupé, treze foram autenticados, ou seja, reinoculados após purificação no jacatupé até obtenção de nódulos na planta-isca e usados para os estudos de caracterização molecular, juntamente com dezenove estirpes de referência cedidas pelo sistema de Coleção de Microrganismos - SICOM da EMBRAPA-Agrobiologia. São elas: *Bradyrhizobium elkanii* SEMIA5019 (BR29), *Bradyrhizobium japonicum* ATCC10324 (BR111), *Sinorhizobium terangue* USDA4893 (BR527), *Rhizobium tropici* IIA CFN299<sup>T</sup> (BR10016), *Sinorhizobium medicae* ATCC9930 (BR525), *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* LGM6119 (BR7605), *Mesorhizobium loti* ATCC33669 (BR7801), *Sinorhizobium fredii* ATCC10324 (BR29), *Sinorhizobium meliloti* ATCC9930 (BR7411), *Rhizobium tropici* IIB CIAT899 (BR322), *Rhizobium* sp. NGR234 (BR2406), *Mesorhizobium ciceri* USDA3383 (BR521), *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* ATCC14482 (BR10052), *Rhizobium galegae* HAMB1540 (BR10055), *Mesorhizobium medicae* USDA1037<sup>T</sup> (BR522), *Sinorhizobium saheli* USDA4893 (BR526), *Rhizobium etli* CFN42 (BR10026), *Mesorhizobium huakuii* USDA4779 (BR524), *Azorhizobium caulinodans* ORS571 (BR5410).

As bactérias cresceram em meio TY (BERINGER, 1974) por 72 horas sob 250 rpm a 28 °C. A partir do cultivo de células, adotou-se o método de DHAESE (1979) para extração de DNA genômico. A quantificação do DNA foi realizada em gel de agarose (0,8%) e o tampão de corrida com azul de bromofenol, adicionado às amostras na proporção de 5:1. A eletroforese foi realizada em tampão TAE (45mM Tris-Acetato, 1mM de EDTA, pH 8,3) a 100 V durante 45 minutos. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio,

visualizado através de luz ultravioleta (UV) e fotografado. O DNA das bactérias foi amplificado pela técnica de PCR com o oligonucleotídeo (*primer*) BOX - BOXA1R 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3', que amplia regiões conservadas e repetitivas do DNA cromossômico (VERSALOVIC et al., 1994). A reação de amplificação ocorreu em um volume final de 25 µl contendo: 50ng de DNA molde, 20 µl de água ultra-pura estéril; 0,3 mM de dNTPs; 10% do volume final de reação do tampão 10X; 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 2 iM do *primer* (50 pmol) , 1 U da Taq DNA polimerase. O ciclo de amplificação foi: um ciclo de desnaturação inicial (3 minutos a 94 °C); 35 ciclos de desnaturação (45 segundos a 94 °C), pareamento (30 segundos a 55 °C); extensão (2 minutos a 72 °C); um ciclo de extensão final (10 minutos a 72 °C); 4 °C final.

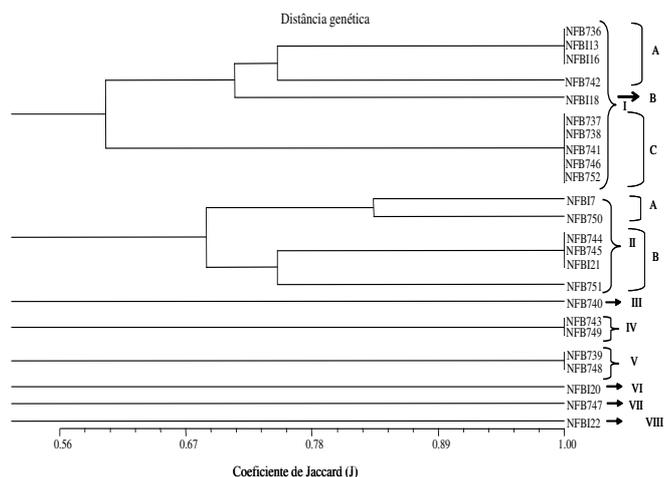
Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese usando tampão TAE 1X em gel de agarose a 1,5% e corado com brometo de etídio. A matriz gerada pelo programa NTSYS-pc versão 2.1, considerando apenas as bandas polimórficas para a construção da matriz de valor binário, representando a presença e ausência das bandas por 1 e 0 respectivamente. A estimativa da similaridade genética foi obtida usando os coeficientes de similaridade gerado pelo SIMQUAL - *Similarity for qualitative data* - com os coeficientes SM: Simple Matching e J: Jaccard. Os dendrogramas foram produzidos de acordo com o método *unweighted pair-group mean arithmetic method* (UPGMA).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características fenotípicas das colônias bacterianas dos vinte e quatro isolados, de forma geral, foram: colônias circulares, com diâmetro de 1-4 mm, bordas inteiras, homogêneas, com elevação, coloração branca e produção variável de exopolissacarídeos. Apenas três isolados alcalinizaram o meio: NFB17, NFB121 e NFB750, e os dois últimos produziram grande quantidade de exopolissacarídeos e colônias translúcidas. Os resultados das análises fenotípicas foram convertidos em matriz binária e gerados dendrogramas pelo Algoritmo UPGMA (Figura 1) usando o coeficiente de Jaccard (J). Esses isolados foram agrupados no mesmo grupo II, tendo os isolados NFB17 e NFB750 agrupados no mesmo subgrupo IIA. Analisando o dendrograma gerado pelos dados fenotípicos das colônias, observou-se que a distância entre isolados variou de 56% a 100%, obtendo-se 8 grupos, e os grupos I e II com 3 e 2 subgrupos respectivamente. Pelas características apresentadas, os isolados NFB736, NFB113 e NFB116 são idênticos diferenciando apenas o NFB742 e, com uma distância ainda maior, o isolado NFB118.

Com características culturais ainda mais distantes observam-se os isolados do grupo IC. Do grupo IIA, os isolados se assemelham, enquanto no grupo IIB, notam-se as mesmas características: NFB744, NFB745, NFB121.

Nos testes de resistência à salinidade, observou-se que todos os isolados cresceram rapidamente até o nível de 12 g L<sup>-1</sup> de sal nos meios ajustados para pH 6,8 e 8,0. A sensibilidade ao sal foi verificada a partir da adição de 16 g L<sup>-1</sup> onde os isolados NFB747, NFB120, NFB122 não cresceram. Por esse motivo, formaram um grupo monofilético muito distante dos demais. A partir do grupo II, os demais isolados ficaram abaixo da distância genética aceitável neste trabalho podendo ser isolados distintos admitindo a hipótese de serem isolados novos, específicos da interação planta-microrganismos diante das condições impostas no experimento.



**Figura 1.** Dendrograma de similaridade com base em características fenotípicas dos isolados de bactérias que nodulam Jacatupé oriundos de três solos salinos das Regiões do Agreste e do Semi-árido de Pernambuco.

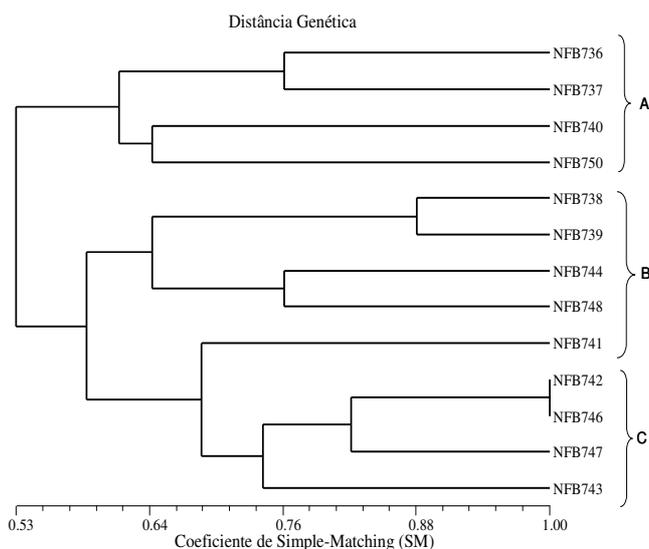
Todos os 24 isolados procedentes dos solos salinos formaram colônias em menos de 24 horas e que caracteriza estirpes de crescimento rápido conforme VICENTE (1970). Para STAMFORD et al. (1988, 1996), que isolaram rizóbios de caupi, soja e jacatupé em amostras de solos da Zona da Mata e da região Semi-árida de Pernambuco, a ocorrência de rizóbio de crescimento lento ou rápido parece estar relacionada com aspectos ambientais, pois observaram que 90% dos isolados da região semi-árida tiveram crescimento rápido e 100% dos isolados da zona da mata crescimento lento. O possível agrupamento obtido na figura 1, a partir do grupo II pode ser o motivo para a formação de tantos grupos monofiléticos com a distância genética tão alta.

Resultados semelhantes foram observados por SPRENT (1994), TAN e BROUGHTON (1981), BARNET (1991), MARTINS (1997) em que os rizóbios de crescimento rápido são mais comuns em regiões semi-áridas, constituindo essa característica como estratégia de sobrevivência, já que são mais tolerantes à seca que os de crescimento lento. A característica de alta produção de exopolissacarídeos vem sendo descrita por vários autores como um mecanismo envolvido no processo de adaptação e sobrevivência dos rizóbios em distintas condições edafoclimáticas, como por exemplo: solos salinos (XAVIER et al., 1998), condições de temperatura elevada (OSA-AFIANA e ALEXANDER, 1982) e em presença de actinomicetos produtores de antibióticos (COUTINHO et al., 1999). A grande capacidade de produção de exopolissacarídeos observada nos isolados testados pode estar relacionada à tolerância a estresse ambiental, possibilitando a sobrevivência em nos solos salino de onde foram isolados.

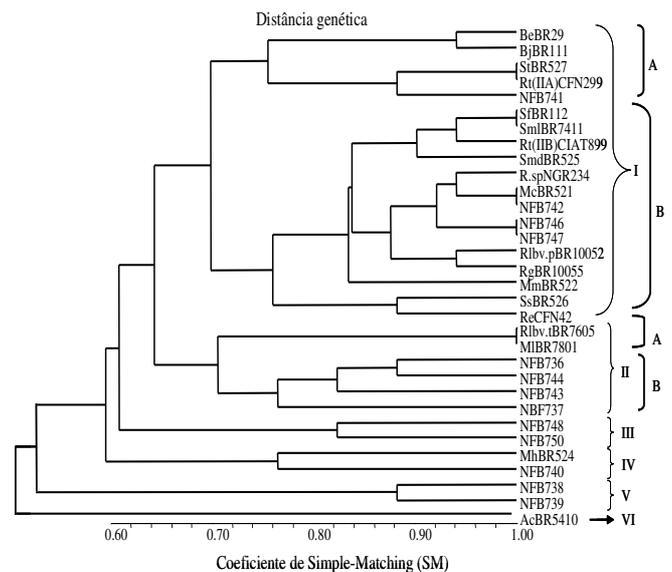
A falta de descrição de estirpes que produzem um excesso de exopolissacarídeos na literatura causou certa omissão sobre esse grupo de bactérias por bastante tempo, por acreditar tratar-se de contaminantes. Entretanto, nos estudos de SINCLAIR e EAGLESHAM (1984), as estirpes que formaram exopolissacarídeos foram mais eficientes em fixar nitrogênio atmosférico que aquelas que produziam colônias secas sob condições salinas, uma vez que essa alta produção da mucosidade pode representar uma forma de proteção da bactéria aos estresses ocorridos. MARTINS et al. (1997) também correlacionaram maior produção de exopolissacarídeos com maior tolerância às condições de salinidade do solo e resistência intrínseca aos antibióticos em rizóbios isolados de caupi cultivados em solos do Nordeste do Brasil.

Para as análises moleculares, foram escolhidos representantes dos grupos IA, IC, IIA, IIB, III, IV, V e VII. Pela análise por BOX-PCR, observou-se que na maioria dos treze isolados havia perfis únicos de DNA, considerando a distância genética para o agrupamento variando entre 56% e 100% (Figura 2). Pelo resultado desse dendrograma mostrado nos perfis em eletroforese, observa-se número elevado de bandas, o que é importante, já que o uso desse oligonucleotídeo específico permite a detecção de um polimorfismo suficientemente elevado para análise genética de bactérias (CHUEIRE et al., 2000). No dendrograma (Figura 2), formaram-se três grupos com maior semelhança (100%), sendo apresentada no grupo C com os isolados NFB742 e NFB746. Dados similares foram obtidos no grupo B com os isolados NFB738 e NFB739, porém com maior distância genética (aproximadamente 88%). Como houve menor

grau de polimorfismo entre estes isolados, pode-se considerá-los variantes de uma mesma bactéria (Figura 3). Dados similares foram obtidos por FERNANDES et al. (2003), estudando rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros usando como plantas-iscas o guandu e o caupi e o marcador BOX-PCR. Ao analisar conjuntamente as características genotípicas e fenotípicas dos isolados oriundos do jacatupé e as estirpes de referência (Figura 3), observou-se um comportamento completamente diferente. A maioria das estirpes-tipo agrupou-se no grupo I, onde praticamente cada espécie foi formando grupos monofiléticos como o de *Bradyrhizobium* e *Sinorhizobium* com alta semelhança. Dentro desse agrupamento, em apenas quatro isolados de jacatupé verificou-se alto grau de semelhança, sendo considerados isolados idênticos (NFB746 e NFB747). Analisando apenas as características fenotípicas desses isolados, ocorreu grande distância genética. Esses isolados foram semelhantes às estirpes de referência *R.spNGR234-Rhizobium* sp e *McBR521-Mesorhizobium ciceri*. O isolado NFB742, provavelmente, pertence à espécie *Mesorhizobium ciceri* devido ao alto grau de similaridade observado. Com relação ao isolado NFB741, a semelhança de 87% se deu com as bactérias: *Rt(IIA)CFN299-Rhizobium tropici* IIA e *StBR527-Sinorhizobium terangue*. Os demais isolados praticamente formaram grupos distintos como o IIB, III, IV e V, onde apenas a estirpe de referência *MhBR524-Mesorhizobium huakuii* foi 74% semelhante ao isolado NFB740.



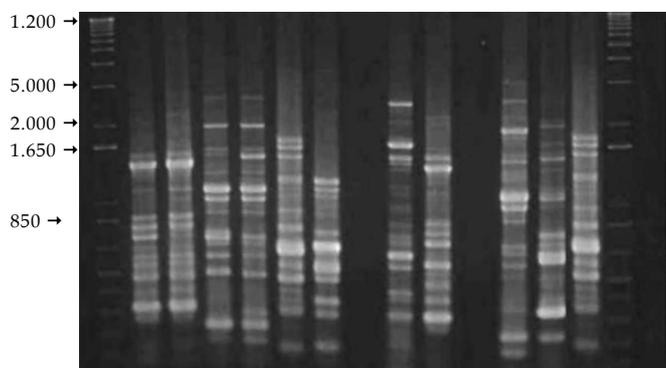
**Figura 2:** Dendrograma de similaridade com base em características genotípicas (BOX-PCR) dos isolados de bactérias que nodulam Jacatupé oriundos de três solos salinos das Regiões do Agreste e do Semi-árido de Pernambuco.



**Figura 3:** Dendrograma de similaridade com base em características fenotípicas dos 13 isolados de bactérias que nodulam Jacatupé e das estirpes de referência cedidas pelo sistema de Coleção de Microrganismos - SICom da EMBRAPA-Agrobiologia. **Legenda:** **BeSEMIA5019-** *Bradyrhizobium elkanii*, **BJATCC10324-** *Bradyrhizobium japonicum*, **StBR527-** *Sinorhizobium terangue*, **Rt(IIA)CFN299-** *Rhizobium tropici* IIA, **SmdATCC9930-** *Sinorhizobium medicae*, **Ribv.tBR7605-** *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*, **MIBR7801-** *Mesorhizobium loti*, **SfATCC103242-** *Sinorhizobium fredii*, **SmlATCC9930-** *Sinorhizobium meliloti*, **Rt(IIB)CIAT899-** *Rhizobium tropici* IIB, **R.spNGR234-** *Rhizobium* sp, **McBR521-** *Mesorhizobium ciceri*, **Ribv.pBR10052-** *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, **RgBR10055-** *Rhizobium galegae*, **MmBR522-** *Mesorhizobium medicae*, **SsBR526-** *Sinorhizobium saheli*, **ReCFN42-** *Rhizobium etli*, **MhBR524-** *Mesorhizobium huakuii*, **AcBR5410-** *Azorhizobium caulinodans* oriundos de três solos salinos da Região do Semi-árido de Pernambuco. A linha vertical pontilhada indica o nível de similaridade entre os principais grupos formados a 67%.

No estudo da filogenia de bactérias, faz-se necessário buscar maior número de marcadores genotípicos juntamente com estudos das características fenotípicas, pois os resultados deste trabalho demonstram de forma clara a diferença entre os dendrogramas formados isoladamente das características fenotípicas e genotípicas, quando os dados compilados mostrados no dendrograma da figura 3 geraram resultados bastante distintos. Para a obtenção de um diagnóstico mais preciso da diversidade genética de microrganismo, faz-se necessário aumentar o número de marcadores moleculares e o número de características bioquímicas, morfológicas e fenotípicas estudadas.

Na figura 4 verifica-se o perfil de bandejamento gerado pelo marcador com os isolados, em que se nota um alto grau de polimorfismo. Esses resultados levam a concluir que o marcador BOX-PCR é importante para avaliar a diversidade de populações bacterianas, mas pouco viável para diferenciar espécies.



**Figura 4:** Amplificação dos 13 isolados de rizóbio oriundo da planta-isca Jacatupé (*P. erosus* L.) com o marcador BOX-PCR. Legenda: 1. Marcador 1 Kb Plus, 2. NFB736, 3. NFB737, 4. NFB738, 5. NFB739, 6. NFB740, 7. NFB741, 8. NFB742, 9. NFB743, 10. NFB744, 11. NFB746, 12. NFB747, 13. NFB748, 14. NFB750, 15. Marcador 1 Kb Plus, 16. Control negativo.

Os resultados deste trabalho corroboraram os obtidos por VANDAMME et al. (1996), que colocam que o conhecimento polifásico deve ser aplicado à taxonomia e diversidade bacteriana já que um consenso de resultados combinados resultará em análises bem mais consistentes. BALA et al. (2003), estudando 414 isolados rizobianos de três leguminosas arbóreas tropicais, identificaram 23 espécies e também observaram a importância de uma análise polifásica. Foi constatado que o método BOX-PCR foi hábil para separar isolados fenotípica e genotipicamente próximos, mas a utilização de apenas uma técnica limita bastante sua capacidade de detectar uma vasta heterogeneidade genética dos rizóbios estudados.

#### 4. CONCLUSÃO

1. As estirpes de rizóbio nativas de solos salinos isoladas de nódulos de jacatupé mostraram uma diversidade bastante elevada e baixa similaridade com as estirpes de referência testadas neste estudo, podendo se tratar de espécies novas ainda não descritas.

2. Estudos usando marcadores da região ribossomal 16S ou 23S, ou da região espaçadora intergênica (ITS), poderiam ser úteis para discriminar de forma concreta as hipóteses levantadas neste trabalho.

#### REFERÊNCIAS

AGUILAR, O.M.; LÓPEZ, M.V.; RICCILLO, P.M. The diversity of rhizobia nodulating beans in Northwest Argentina as a source of more efficient inoculant strains. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.91, p.181-188, 2001.

BALA, A, MURPHY., GILLER, K.E. Distribution and diversity of rhizobia nodulating agroforestry legumes in soils from three continents in the tropics. **Molecular Ecology**, v.12, p. 917-930. 2003.

BARNET, Y.M.; CATT, P.C. Distribution and characteristics of root-nodule bacteria isolated from Australian *Accacia* spp. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.135, p.109-120, 1991.

BERINGER, J.E.R. Factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of General Microbiology**, London, v.84, p.188-198, 1974.

CHEN, W.M.; LEE, T.M.; LAN, C.C.; CHENG, C.P. Characterization of halotolerant rhizobia isolated from root nodules of *Canavalia rosea* from seaside areas. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.34, p.9-16, 2000.

CHUEIRE, L. M. O.; NISHI, C. Y. M.; LOUREIRO, M. F.; HUNGRIA, M. Identificação das estirpes de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* utilizadas em inoculantes comerciais para as culturas da soja e do feijoeiro pela técnica de PCR com "primers" aleatórios ou específicos. **Agricultura Tropical**, Cuiabá, v. 4, p. 80-95, 2000.

COUTINHO, H.L.C; KAY, H.E.; MANFIO, G.P.; NEVES, M.C.P.; RIBEIRO, J.R. DE A.; RUMJANEK, N.G. ; BERINGER, J. Molecular evidence for shifts in polysaccharide composition associated with adaptation of soybean *Bradyrhizobium* strains to the Brazilian Cerrado soil. **Environmental Microbiology**, London, v.1, n.5, p 401-408, 1999.

CRUZ, G.N.; STAMFORD, N.P.; SILVA, J.A.A.; CHAMBER-PEREZ, C Effects of inoculation with *Bradyrhizobium* and urea application on N<sub>2</sub> fixation and growth of yam bean. **Tropical Grassland**, Brisbane, v.33, p.23-27, 1997.

De LAJUDIE, P.; WILLWMS, A.; NICK, G.; MOREIRA, F.; MOLOUBA, F.; HOSTE, B.; TORCK, U.; NEYRA, M.; COLLINS, M.D.; LINDSTRÖM, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp.nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p.369-382, 1998.

DHAESE, P.; DE GROE, H.; DECRAEMER, H.; SCHELL, J.; VAN MONTAGU, M. Rapid Mapping of Transposon Insertion and Letion in the Large Ti Plasmides of *Agrobacterium tumefaciens*. **Nucleic Acids Research**, Eynsham, v.7, p.1837-1849, 1979.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de Métodos de Análises de Solos**. 2.ed. Rio de Janeiro, 1997, p.212.

FERNANDES, M.F.; FERNANDES, R.P.M., HUNGRIA, M. Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes em culturas do guandu e caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.38, n.8, p. 911-920, 2003.

- GAO, J.; TEREFWORK, Z.; CHEN, W.; LINDSTROM, K. Genetic diversity of rhizobia isolated from *Astragalus adsurgens* growing in different geographical regions of China. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 91, p. 155-168, 2001.
- HUNGRIA, M. Coleta de Nódulos e Isolamento de Rizóbios. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R.S.(Ed.). **Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola**. EMBRAPA: Brasília, 1994. p.157-170.
- LIU, J; WANG, E.T.; CHEN, W.X. Diverse rhizobia associated with woody legumes *Wisteria sinensis*, *Cercis racemosa* and *Amorpha fruticosa* grown in the temperate zone of the China. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.28, n.5, p.465-77, 2005.
- MARTINS, L.M.V. NEVES, M.C.P., RUMJANEK, N.G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the northeast of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, n.5-6; p.1005-1010, 1997.
- NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Ecologia das Bactérias Diazotróficas nos Solos Tropicais. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Ecologia Microbiana**. EMBRAPA: Jaguariúna, 1998. 140 p.
- NICK, G.; JUSSILA, M.; HOSTE, B.; NIEMI, M.R.; KAIJALAINEN, S.; De LAJUDIE, P.; GILLIS, M.; DE BRUIJN, J.F.; LINDSTROM, K. Rhizobia isolated from root nodules of tropical leguminous trees characterized using DNA-DNA dot-blot hybridization and rep-PCR genomic fingerprinting. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v.22, n.2, p.287-299, 1999.
- ODEE, D.W.; HAUKKA, K.; MCINROY, S.G.; SPRENT, J.I.; SUTHERLAND, J.M.; YOUNG, J.P.W. Genetic and symbiotic characterization of rhizobia isolated from tree and herbaceous legumes grown in soils from ecologically diverse sites in Kenya. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.34, p. 801-811, 2002.
- OSA-AFIANA, L.O.; ALEXANDER, M. Clays and the survival of *Rhizobium* during desiccation. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.46, p.285-288, 1982.
- PEREIRA, J.C.; NEVES, M.C.P.; DROZDOWICZ, A. Influência da Antibiose Exercida por Actinomicetos às Estirpes de *Bradyrhizobium* spp., na Nodulação da Soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.1, p.99-108, 1999.
- SINCLAIR, N.; EAGLESHAM, A.R.J. Intrinsic antibiotic resistance in relation to colony morphology in three populations of west African cowpea rhizobia. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 16, p.247-251, 1984.
- SINGLETON, P.W.; EL-SWAIFY, S.A.; BOHLOOL, B.B. Effect of salinity on *Rhizobium* growth and survival. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 44, p.884-890, 1986.
- SNEATH, P.H.A, SOKAL, R.R. **Numerical Taxonomy: The Principles and Practices of numerical classification**. San Francisco: W.A Freeman, 1973.
- SORENSEN, M. **Yam Bean: Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops**. Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. 141p.
- SPRENT, J.I. Evolution and diversity in the legume-rhizobium symbiosis: chaos theory? **Plant and Soil**, Dordrecht, v.161, p.1-10, 1994.
- STAMFORD, N.P.; FREITAS, A.D.S.; FERRAZ, D S.; MONTENEGRO, A.; SANTOS, C.E.R.S. Nitrogen fixation and growth of cowpea (*Vigna unguiculata*) and yam bean (*Pachyrhizus erosus*) in a sodic soil as affected by gypsum and sulphur inoculated with *Thiobacillus* and rhizobial inoculation. **Tropical Grasslands**, Brisbane, v.37, n.2, p.1-9, 2003
- STAMFORD, N.P.; SANTOS C.E.R.S.S.; MEDEIROS, R.; FREITAS A.D.S. Efeito da Fertilização com Fósforo, Potássio e Magnésio em Jacatupé Infectado com Rizóbio em um Latossolo Álico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, p.1831-1838, 1999
- STAMFORD, N.P.; SANTOS; C.E.R.S.; MEDEIROS, R.; FIGUEIREDO, M. V. B. Efeito de diferentes relações potássio magnésio no Jacatupé com inoculação com rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.20, 49-54, 1996.
- STAMFORD, N.P.; VASCONCELOS, I.; ALMEIDA, R.T Fixação Biológica de Nitrogênio em Caupi na Região Nordeste Brasileira En: Araújo, J.P. **O Caupi do Brasil**. Brasília: IITA/ EMBRAPA, 1988. p.477-504.
- STOWERS, M.D.; ELKAN, G.H. Growth and nutritional characteristics of cowpea rhizobia. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.80, p.191-200,1984.
- STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N.G. **Aplicação e evolução dos métodos moleculares para o estudo da biodiversidade do rizóbio**. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1999. 70p. (Documentos 93)
- STREETER, J.G. Failure of inoculated rhizobia to overcome the dominance of indigenous strains for nodule formation. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 40, p.513-512. 1994.
- SY, A; GIRAND, E.; JOURAND, P., GARCIA, N.Y., WILLEMS, A., DE LAJUDIE, P, PRIN, Y., NEYRA, N., GILLIS, M., BOVIN-MASSON, C., DREYFUS, B. Methylo-trophic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. **Journal of Bacteriology**, v.183 p.214-220. 2001.
- TAN, I.K.P; BROUGHTON, W.J. **Rhizobia in tropical legumes**. XIII Biochemical basis of acid and alkali reactions. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.13, p.389-393, 1981.
- VAN BERKUM, P., EARDLY, B.D. The aquatic budding bacterium *Blastobacter denitrificans* is a nitrogen-fixing symbiotic of *Aeschynomene indica*. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v.68, p.1132-1136. 2002
- VANDAMME, P., POT, B., GILLIS, M., DE VOS, P. KERSTERS, K., SWINGS, J. Polyphasic taxonomic, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, v. 60, p.407-438. 1996.
- VELÁZQUEZ, E.; IGUAL, J.M.; WILLWMS, A.; FERNÁNDEZ, M.P.; MUÑOZ, E.; MATEOS, P.F.; ABRIL, A.; TORO, N.; NORMAND, P.; CERVANTES, E.; GILLIS, M.; MARTÍNEZ-MOLINA, E. Mesorhizobium chacoense sp. nov., a novel species that nodulates Prosopis alba in the Chaco Arido Region (Argentina). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.1011-1021. 2001.

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

VINCENT, J. M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 164 p. (International Biological Programme Handbook, 15)

XAVIER, G.R.; MARTINS, L.M.V.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea, rhizobia population. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.27, p.386-392. 1998

YOUNG, J.P.W.; HAUKKA, K.E. Diversity and phylogeny of rhizobia. **New Phytologist**, Oxford, v.133, p.87-94, 1996.