

AVALIAÇÃO DA BIODIVERSIDADE DE RIZÓBIOS SIMBIONTES DO FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.) EM SANTA CATARINA⁽¹⁾

Priscila Stocco⁽²⁾, Julio César Pires do Santos⁽³⁾, Vitor Paulo Vargas⁽²⁾ & Mariangela Hungria⁽⁴⁾

RESUMO

Os solos brasileiros, em geral, apresentam uma população abundante de rizóbios capazes de nodular e fixar N₂ em simbiose com o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.); contudo, a diversidade dessas bactérias ainda é pouco conhecida. Este estudo teve por objetivo conhecer a biodiversidade de microssimbiontes do feijoeiro em Santa Catarina e, para isso, foram obtidos 117 isolados de nódulos de plantas coletadas em campo, em 23 áreas do extremo oeste, do meio oeste e do planalto sul catarinense. Com base nos atributos morfofisiológicos, os isolados foram classificados em nove grupos. Pela análise dos perfis de DNA após a amplificação (PCR) com o “primer” BOX, que codifica regiões conservadas e repetidas do genoma, 107 perfis distintos foram agrupados em um nível final de similaridade de apenas 26,9 %. Os perfis obtidos pela amplificação do gene 16S ribossômico – referência na taxonomia atual de procaríotos – seguida pela digestão com três enzimas de restrição (técnica de RFLP-PCR), resultaram em seis agrupamentos principais e cinco bactérias isoladas. As populações consistiram de 17,1 % de *Rhizobium tropici*, 35,9 % de *R. etli*, 32,5 % de *R. leguminosarum*, 1,7 % de *R. giardinii* e 12,8 % com perfis distintos das espécies descritas de rizóbios de feijoeiro. *R. tropici* predominou em solos ácidos do meio oeste e do planalto sul, *R. leguminosarum* não foi detectado no extremo oeste e *R. etli* ocorreu nas três regiões, essas duas últimas espécies em solos menos ácidos. Os resultados enfatizam a diversidade genética elevada de rizóbios, inter e intra-específica, nos solos catarinenses, inclusive com a indicação de novas espécies.

Termos para indexação: biodiversidade, fixação biológica do N₂, *Phaseolus vulgaris*, *Rhizobium etli*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium tropici*.

⁽¹⁾ Recebido para publicação em fevereiro de 2007 e aprovado em dezembro de 2007.

⁽²⁾ Mestrando do Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia, Universidade do Estado de Santa Catarina – CAV/UEDESC. Caixa Postal 281, CEP 88520-000 Lages (SC). Bolsista do CNPq-MCT. E-mail: priscilastocco@hotmail.com

⁽³⁾ Professor do Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia, CAV/UEDESC. Bolsista do CNPq-MCT. E-mail: a2jcps@cav.udesc.br

⁽⁴⁾ Pesquisadora da Embrapa Soja, Caixa Postal 231, CEP 86001-970 Londrina (PR). E-mail: hungria@cnpsa.embrapa.br

SUMMARY: ASSESSMENT OF BIODIVERSITY IN RHIZOBIA SYMBIONTS OF COMMON BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.) IN SANTA CATARINA, BRAZIL

Brazilian soils usually present a great number of populations of rhizobial bacteria capable of nodulating and fixing N_2 in symbiosis with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), but the diversity of these bacteria is still poorly known. This study aimed to assess the biodiversity of micro-symbionts of common bean in the state of Santa Catarina in southern Brazil. One-hundred and seventeen isolates were obtained from field-grown plants in 23 areas of the far west, midwest and southern plateau of Santa Catarina. Based on morpho-physiological properties, the isolates were classified in nine groups. The DNA analysis by BOX-PCR, with the amplification of conserved and repetitive genome regions, detected 107 different profiles joined at a final similarity level of only 26.9 %, i.e., a high level of genetic diversity. The profiles obtained by the amplification of the 16S rRNA gene, followed by the digestion with three restriction enzymes (RFLP-PCR technique) defined six main groups and five isolated bacteria. The population consisted of 17.1 % *Rhizobium tropici*, 35.9 % *R. etli*, 32.5 % *R. leguminosarum*, 1.7 % *R. giardinii* and 12.8 % yet undocumented profiles of the common bean rhizobial species. *R. tropici* predominated in the acid soils of the midwest and southern plateau, *R. leguminosarum* was not detected in the far west and *R. etli* occurred in all three regions, while the last two species predominated in less acid soils. The results demonstrate the high inter- and intra-specific rhizobial diversity in the soils of Santa Catarina, besides indicating new species.

Index terms: biodiversity, biological nitrogen fixation, *Phaseolus vulgaris*, *Rhizobium etli*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium tropici*.

INTRODUÇÃO

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é cultivado em todo o território nacional, particularmente por sua importância nutricional, como fonte de minerais e proteínas para a população brasileira (Vieira & Rava, 2000). O Brasil é o maior produtor e consumidor mundial de feijão comum e 67 % dos grãos provêm de estabelecimentos com base em agricultura familiar (INCRA/FAO, 2000; Vieira & Rava, 2000). Em Santa Catarina, responsável por 4,5 % da produção nacional em 2006, a agricultura familiar representa 90,5 % dos estabelecimentos, que ocupam 60 % da área agrícola e respondem por 71,3 % do valor bruto da produção agropecuária estadual (FETAESC, 2006).

Considera-se que o feijoeiro foi domesticado separadamente em dois centros distintos de diversidade genética, de modo que os alelos estão distribuídos em dois grupos: o mesoamericano, ou grupo do norte (do México à região norte da América do Sul – México, América Central, Colômbia, norte do Peru) e o andino, ou grupo do sul (do sul do Peru ao norte da Argentina – Equador, Bolívia, Peru, Argentina) (Debouck, 1986; Gepts & Debouck, 1991). No Brasil, não são encontrados ancestrais selvagens do feijoeiro (Debouck, 1986), mas essa leguminosa vem sendo cultivada no País desde tempos pré-históricos (Freitas, 2006).

Um atributo importante do feijoeiro é a sua capacidade de se associar simbioticamente com

bactérias denominadas, coletivamente, rizóbios, formando estruturas típicas, os nódulos, onde ocorre o processo de fixação biológica do nitrogênio atmosférico (N_2). Inicialmente, a simbiose com o feijoeiro era considerada bastante restrita, sendo relatado que ocorreria apenas com um grupo de bactérias classificadas, em 1932, como *Rhizobium phaseoli* (Fred et al., 1932) e reclassificadas como *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* em 1984 (Jordan, 1984). Contudo, o avanço nas metodologias de biologia molecular e a coleta de rizóbios em vários locais do mundo indicaram que essa leguminosa pode ser bastante promíscua em suas associações simbióticas (Hernandez-Lucas et al., 1995; Michiels et al., 1998), resultando na descrição de quatro novas espécies: *R. tropici* (Martínez-Romero et al., 1991), *R. etli* bv. *phaseoli* (Segovia et al., 1993), *R. gallicum* (bv. *gallicum* e bv. *phaseoli*) e *R. giardinii* (bv. *giardinii* e bv. *phaseoli*) (Amarger et al., 1997). Além disso, outros gêneros e espécies foram isolados de nódulos de feijoeiro: *Bradyrhizobium* sp. (Hungria et al., 1993), *Rhizobium* sp. OR 191 (Eardly et al., 1985), *R. mongolense* (van Berkum et al., 1998), *Sinorhizobium fredii* (Straliotto et al., 1999; Grange & Hungria, 2004), *Sinorhizobium* sp., *Mesorhizobium plurifarum*, além de outros isolados que podem representar novas espécies (Grange & Hungria, 2004). Finalmente, outras espécies de rizóbios são capazes de nodular o feijoeiro em condições de laboratório, mas ainda não foram isoladas desse hospedeiro em condições de campo (Michiels et al., 1998).

Apesar dos avanços nas metodologias para a avaliação da biodiversidade, ainda pouco se conhece sobre as bactérias simbióticas fixadoras de N₂ nos ecossistemas brasileiros, e um exemplo relevante é o dos microssimbiontes do feijoeiro. Nesse contexto, este trabalho visou determinar a diversidade de rizóbios isolados de plantas de feijoeiro coletadas em campo nas principais regiões produtoras de Santa Catarina.

MATERIAL E MÉTODOS

Estirpes utilizadas como referência

Como referência, foram incluídas as estirpes-tipo das espécies de rizóbios já descritas, capazes de nodular o feijoeiro: *Rhizobium tropici* tipo A CFN 299 (= USDA 9039, = LMG 9517), *R. tropici* tipo B CIAT 899^T (= UMR 1899, = USDA 9030, = TAL 1797, HAMB1 1163, = SEMIA 4077, = ATCC 49672), *R. etli* CFN 42^T (= USDA 9032), recebidas do Centro de Ciências Genômicas, Cuernavaca, México; *R. giardinii* bv. *giardinii* H152^T, *R. gallicum* bv. *gallicum* R602^T, fornecidas pelo INRA, Dijon, France; *R. leguminosarum*

bv. *phaseoli* USDA 2671, proveniente do USDA, Beltsville, EUA; foi incluída, também, a estirpe PRF 81 (= SEMIA 4080) de *R. tropici*, da coleção de bactérias diazotróficas da Embrapa Soja, utilizada em inoculantes comerciais no Brasil.

Isolamento e caracterização morfofisiológica dos isolados

Foram coletadas, ao acaso, amostras de solo (camada de 0–10 cm) e de nódulos de raízes de feijoeiro, em 33 áreas representativas do estado de Santa Catarina, localizadas no extremo oeste, meio oeste e no planalto sul. O número de amostras de solo e de plantas coletadas variou de acordo com o tamanho da propriedade, com, no mínimo, dez subamostras por local para compor uma amostra. Após o isolamento, foram obtidos rizóbios viáveis em 23 das 33 áreas, indicadas na figura 1, totalizando 117 isolados que foram objeto deste estudo. As características de zoneamento climático dessas áreas são apresentadas no quadro 1. Os solos foram classificados conforme o mapa de solos de Santa Catarina (Embrapa, 2006), enquanto as propriedades químicas foram determinadas segundo Tedesco et al. (1995), podendo ser visualizadas no quadro 2.

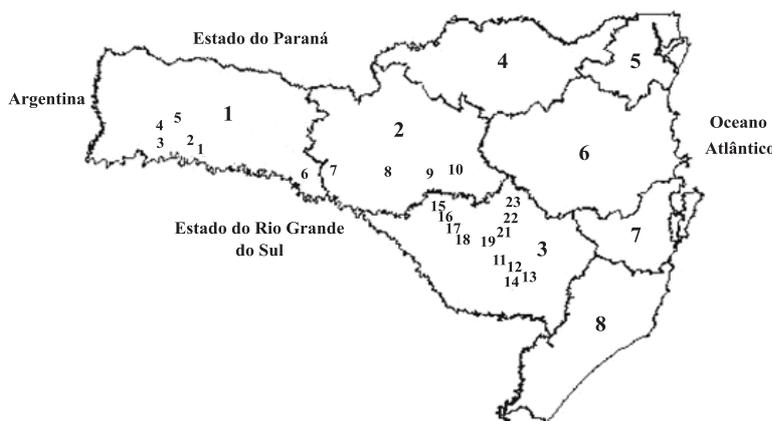


Figura 1. Localização das regiões em que foram obtidos rizóbios viáveis dos nódulos de feijoeiro (1, 2, 3 e 4) no Estado de Santa Catarina: Região 1, Extremo Oeste (Chapecó); Região 2, Extremo Oeste (Concórdia); Região 3, Meio Oeste; Região 4, Planalto Sul; Região 5, Planalto Norte; Região 6, Nordeste; Região 7, Vale do Itajaí; Região 8, Grande Florianópolis; Região 9, Sul.

Quadro 1. Localização e dados climáticos dos locais de coleta dos rizóbios em Santa Catarina⁽¹⁾

Região	Latitude	Longitude	Altitude	Temperatura média		Média da precipitação mensal
				Mínima	Máxima	
				°C		mm
Extremo Oeste: Chapecó ⁽²⁾	27°05'26" S	52°38'02" W	679	8,1	32,0	181,6
Extremo Oeste: Concórdia ⁽³⁾	27°18'47" S	51°59'32" W	585	7,2	32,5	142,8
Meio Oeste: Campos Novos ⁽⁴⁾	27°23'00" S	51°12'56" W	964	5,5	29,3	196,1
Planalto Sul: Lages ^e	27°48'27" S	50°19'44" W	937	5,4	29,6	168,8

⁽¹⁾ Dados fornecidos pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina S.A. ⁽²⁾ Áreas correspondentes: Guatambu, Palmitos, Planaltina e Pinhalzinho. ⁽³⁾ Áreas correspondentes: Peritiba e Ouro. ⁽⁴⁾ Áreas correspondentes: Ouro, Campos Novos, Brunópolis e Curitibanos. ^(e) Áreas correspondentes: Lages, Paineal, Urupema, São Joaquim, São José do Cerrito e Palmeira.

Quadro 2. Classificação e propriedades químicas dos solos do Estado de Santa Catarina de onde foram coletados os rizóbios microssimbiontes do feijoeiro

Localização	Classificação do solo		pH		Ca ⁽¹⁾	Mg ⁽¹⁾	Al ⁽¹⁾	Na ⁽²⁾	K ⁽²⁾	P ⁽²⁾	N ⁽²⁾	% MO
			H ₂ O	KCl								
Extremo Oeste Chapecó												
1. Guatambu	Latossolo	Vermelho	7,02	6,47	14,34	2,81	0,30	18,00	244,00	288,53	8,00	3,51
2. Caxambu do Sul	Nitossolo	Vermelho	5,03	4,36	5,28	0,53	0,50	12,00	335,50	69,86	10,00	3,48
3. Palmitos	Nitossolo	Vermelho	6,53	5,65	15,30	5,57	0,10	21,50	878,50	1.152,52	14,00	5,50
4. Planaltina	Nitossolo	Vermelho	5,29	4,64	10,80	3,05	0,40	18,00	180,00	20,16	16,00	4,40
5. Pinhalzinho	Latossolo	Vermelho	5,25	4,56	6,00	1,78	0,20	16,00	392,50	33,55	10,00	3,22
Concórdia												
6. Peritiba	Nitossolo	Vermelho	5,59	4,70	12,24	2,61	0,35	11,50	603,00	82,86	16,00	3,36
Meio Oeste: Campos Novos												
7. Ouro	Nitossolo	Vermelho	5,89	5,87	8,10	3,26	0,20	24,50	345,50	82,29	12,00	3,16
8. Campos Novos (Plantio direto)	Latossolo	Vermelho	5,83	5,10	9,66	5,04	0,25	15,00	415,50	105,65	15,00	4,62
9. Brunópolis	Latossolo	Bruno	4,41	3,79	3,48	0,89	2,73	9,00	182,00	29,46	11,00	3,32
10. Curitibaanos (sentido Brunópolis)	Latossolo	Bruno	5,49	4,56	3,90	1,07	0,45	4,50	42,00	87,56	8,00	2,83
Planalto Sul: Lages												
11. (Estação de Aquicultura) Lages	Cambissolo	húmico	6,52	5,88	9,54	3,38	0,20	6,00	44,50	656,24	11,00	7,11
12. Painei	Latossolo	Bruno	4,35	3,91	2,64	0,15	1,93	13,00	150,00	88,96	14,00	9,10
13. (Cedro) Urupema	Latossolo	Bruno	5,42	4,98	8,88	4,18	0,40	12,00	220,50	108,16	28,00	11,03
14. Urupema	Latossolo	Bruno	5,56	4,76	14,40	3,59	0,30	26,00	93,50	127,41	20,00	7,54
15. São José do Cerrito	Nitossolo	Vermelho	5,98	5,51	6,48	3,85	0,15	11,00	121,00	24,24	25,00	8,72
16. (Sto Antonio dos Pinhos) São José do Cerrito	Nitossolo	Vermelho	6,06	5,21	12,06	4,74	0,30	17,00	505,50	217,89	14,00	7,49
17. (Toca da Onça) São José do Cerrito	Nitossolo	Vermelho	5,94	5,27	10,80	3,38	0,30	21,50	927,50	332,69	21,00	5,47
18. (Guaibeira) São José do Cerrito	Nitossolo	Vermelho	5,14	4,57	7,38	3,35	0,40	15,00	451,00	25,82	21,00	5,65
19. (Salto Rio Caveiras) Lages	Latossolo	Bruno	5,17	4,50	5,10	2,61	0,45	15,50	310,50	35,56	20,00	5,39
20. (Urupema) 1.600 m altitude	Cambissolo	húmico	5,25	4,53	8,16	3,73	0,99	24,00	290,50	837,46	46,00	6,51
21. (Cadeados) Lages	Cambissolo	húmico	5,40	3,79	4,20	1,16	5,11	11,50	294,50	131,19	20,00	5,31
22. (Bela Vista) Lages	Cambissolo	húmico	6,17	5,44	11,82	6,46	0,20	35,50	162,00	59,78	23,00	5,87
23. (Cerro Alto) Palmeira	Cambissolo	húmico	5,15	4,54	5,16	4,50	0,35	18,00	286,50	439,74	22,00	5,05

⁽¹⁾ Teores de Ca, Mg e Al no solo (cmol_c dm⁻³). ⁽²⁾ Teores de Na, K, P e N no solo (mg dm⁻³).

No laboratório, dez nódulos de pelo menos dez plantas, coletadas em cada local, foram retirados ao acaso, procedendo-se ao isolamento e obtenção de culturas puras de bactérias em meio YMA (Vincent, 1970), modificado para 5 g L⁻¹ de manitol. As estirpes foram caracterizadas quanto à produção de muco, transparência, cor, tamanho, borda, elevação e crescimento, aos três e cinco dias de crescimento (Vincent, 1970). Também foi observada, a partir do quinto dia de crescimento, a acidificação ou alcalinização do meio YMA modificado que continha o indicador de pH azul de bromotimol (Vincent, 1970). Os isolados obtidos foram mantidos em meio YMA modificado inclinado, a 4 °C, e armazenados em YM com 25 % de glicerol, a -80 °C.

Caracterização genética dos isolados

Amplificação do DNA por rep-PCR (BOX)

Inicialmente, o DNA das bactérias foi extraído conforme descrito por Kaschuk et al. (2006), e as amostras foram armazenadas a -20 °C. A seguir, o DNA das bactérias foi submetido à amplificação pela técnica de PCR (“polymerase chain reaction”), utilizando o “primer” BOX A1R (Invitrogen™), que amplifica regiões conservadas e repetitivas do DNA cromossômico, em geral, no espaço intergênico, metodologia conhecida como rep-PCR. As condições de amplificação foram descritas por Kaschuk et al. (2006). Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em géis de agarose de 20 X 25 cm, por 6 h, a 120 V, utilizando como peso molecular o marcador 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen™). Os géis foram corados com brometo de etídeo e fotografados sob radiação UV.

RFLP-PCR da região do 16S RNAr

O DNA das bactérias também foi submetido à amplificação com os “primers” fD1 e rD1, conforme descrito por Menna et al. (2006); esses “primers” amplificam a região do DNA que codifica para o gene ribossomal 16S. A seguir, o produto da amplificação foi submetido à análise de polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição do DNA (RFLP, “restriction fragment length polymorphism”), pela digestão, separadamente, com três enzimas de restrição: *HhaI* (5' - GCG/C - 3'; 3' - C/GC - 5'), *HpaII* (5' - C/CGG - 3'; 3' - GGC/C - 5') e *RsaI* (5' - GT/AC - 3'; 3' - CA/TG - 5') (Invitrogen™). Os produtos obtidos da digestão foram submetidos à eletroforese horizontal em gel com 3 % de agarose, a 120 V, por 4 h, tendo como padrão o peso molecular de 100 pb (Invitrogen™). Os géis obtidos foram corados com brometo de etídeo e fotografados sob radiação UV.

Análise da diversidade genética

As bandas resultantes das análises do DNA por rep-PCR e RFLP-PCR foram analisadas pelo programa Bionumerics (Applied Mathematics, Kortrijk, Bélgica, versão 1.50), utilizando o algoritmo UPGMA (“unweighted pair-group method with arithmetic

mean”) e o coeficiente de Jaccard, conforme descrito anteriormente por Germano et al. (2006). Nas análises por rep-PCR e RFLP-PCR, a tolerância das bandas foi estabelecida em 2 e 3 %, respectivamente, no programa Bionumerics, de acordo com estudos realizados anteriormente pelo grupo de pesquisa (Germano et al., 2006; Grange et al., 2007).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apesar de o Brasil não ser centro de diversidade genética do feijoeiro, algumas evidências arqueológicas indicam que a leguminosa é cultivada no País desde os tempos pré-históricos. Pouco se conhece, porém, sobre o cultivo do feijoeiro no período anterior a 1.500, em razão da quebra nas tradições orais nativas, após a colonização do Brasil pelos europeus (Prous, 1997; FUNAI, 2006). Nesse contexto, informações sobre as estruturas das populações de rizóbios, bem como sobre a co-evolução dos microssimbiontes com as plantas hospedeiras são importantes porque podem contribuir não só para delinear estratégias visando a maximizar o processo de fixação biológica do N₂, como também para obter informações sobre a evolução da simbiose em solos brasileiros (Grange et al., 2007) e, nesse contexto, este estudo teve por objetivo avaliar a biodiversidade dos microssimbiontes no feijoeiro no Estado de Santa Catarina.

Das 33 áreas avaliadas neste estudo, não foram obtidos isolados viáveis em dez delas: três do extremo oeste, três do meio oeste e seis do planalto sul. Os solos dessas áreas apresentavam atributos químicos semelhantes, exceto pelo N: em média, o conteúdo de N dos 23 solos de origem dos isolados foi de 17,61 ± 8,15 mg dm⁻³ de N no solo (Quadro 2), enquanto, nos dez solos onde não foram encontrados nódulos, foi de 331,20 ± 176,23 mg dm⁻³ de N no solo. Além disso, os solos com alto teor de N também recebiam descarte de resíduos de suínos, podendo apresentar problemas com metais pesados.

Para este estudo, foram obtidos 117 isolados das 23 áreas amostradas, representando três regiões do Estado de Santa Catarina (Quadros 2 e 3). Todos os isolados apresentaram crescimento rápido, sendo possível realizar a caracterização morfofisiológica em três dias; 96,6 % dos isolados apresentaram reação ácida em meio YMA (Quadro 4). Praticamente todos os isolados apresentaram colônias com borda lisa e elevação cupular e, aos três dias, as colônias apresentaram de 1,4 a 3,8 mm (dados não mostrados). Além disso, 67,5 % dos isolados apresentaram colônias de cor branca opaca e produção moderada de muco em meio YMA (Quadro 4). As informações sobre cada isolado, individualmente, encontravam-se disponíveis no endereço <http://www.bmrc.lncc.br/> (público a partir de 1/9/2008). Os atributos morfofisiológicos (Quadro 4) não foram relacionados com a distribuição geográfica, com as condições climáticas (Quadro 1), ou com as propriedades químicas do solo (Quadro 2).

Quadro 3. Número de isolados e nível de similaridade genética dentre os rizóbios microssimbiontes do feijoeiro obtidos em cada local de Santa Catarina

Município	Número de isolados	Similaridade genética (%)	
		rep-PCR	RFLP-PCR
Região 1 - Extremo Oeste			
Chapecó			
1. Guatambu	3	39	69
2. Caxambu do Sul	2	40	100
3. Palmitos	1	-	-
4. Planaltina	2	13	69
5. Pinhalzinho	2	94	100
Concórdia			
6. Peritiba	2	60	70
Total	12		
Região 2 - Meio Oeste (Campos Novos)			
7. Ouro	1	-	-
8. Campos Novos (plantio direto)	2	33	71
9. Brunópolis	5	41	100
10. Curitibanos (sentido Brunópolis)	5	39	43
Total	13		
Região 3 - Planalto Sul (Lages)			
11. (Estação de Aquicultura) Lages	6	52	93
12. Painel	11	39	77
13. (Cedro) Urupema	1	-	-
14. Urupema	10	39	93
15. São José do Cerrito	8	39	93
16. (Sto Antonio dos Pinhos) São José do Cerrito	7	36	93
17. (Toca da Onça) São José do Cerrito	9	52	70
18. (Guaiabeira) São José do Cerrito	6	49	80
19. (Salto Rio Caveiras) Lages	7	42	76
20. (Urupema) 1600 m altitude	6	50	76
21. (Cadeados) Lages	5	49	40
22. (Bela Vista) Lages	7	50	76
23. (Cerro Alto) Palmeira	9	48	93
Total	92		
Total Geral	117		

Quadro 4. Morfologia das colônias e reação fisiológica de pH em meio YMA (Vincent, 1970) de rizóbios microssimbiontes de feijoeiro do Estado de Santa Catarina. Caracterização realizada aos três dias de crescimento

Cor	Transparência	Produção de muco	Reação em meio YMA	Número de isolados
Branca	Opaca	Abundante	Ácida	7
		Moderada	Ácida	79
		Pouca	Básica	2
			Ácida	14
	Translúcida	Abundante	Básica	1
			Neutra	1
		Moderada	Ácida	1
			Ácida	9
Rosa	Opaca	Pouca	Ácida	3
Total				117

Quando o DNA dos 117 isolados foi amplificado e analisado por rep-PCR com o “primer” BOX, constatou-se um grau elevado de polimorfismo, de tal forma que foram obtidos 107 perfis distintos (Figura 2). Na análise dos perfis de rep-PCR, utilizando o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard e considerando o nível de similaridade genética de 70 % na análise de agrupamento, estabelecido em estudos anteriores (Grange & Hungria, 2004; Kaschuk et al., 2006), foram formados 24 grupos e 23 % dos isolados não

foram inseridos em nenhum agrupamento (Figura 2). Apenas cinco grupos, IV, V, X, XIV e XIV, uniram bactérias com perfis idênticos e, em cada grupo, houve casos de isolados semelhantes provenientes da mesma área, por exemplo, os isolados 111, 113, 115 e 110, no grupo IV, provenientes de Cerro Alto, Palmeira, ou os isolados 75 e 74, da localidade de Toca da Onça, no grupo XIV. Contudo, perfis idênticos também foram constatados em áreas distintas, por exemplo, no grupo V (os pares de isolados 118 e 96; 95 e 87) e no grupo XVI (isolados 63, 46 e 56) (Figura 2).

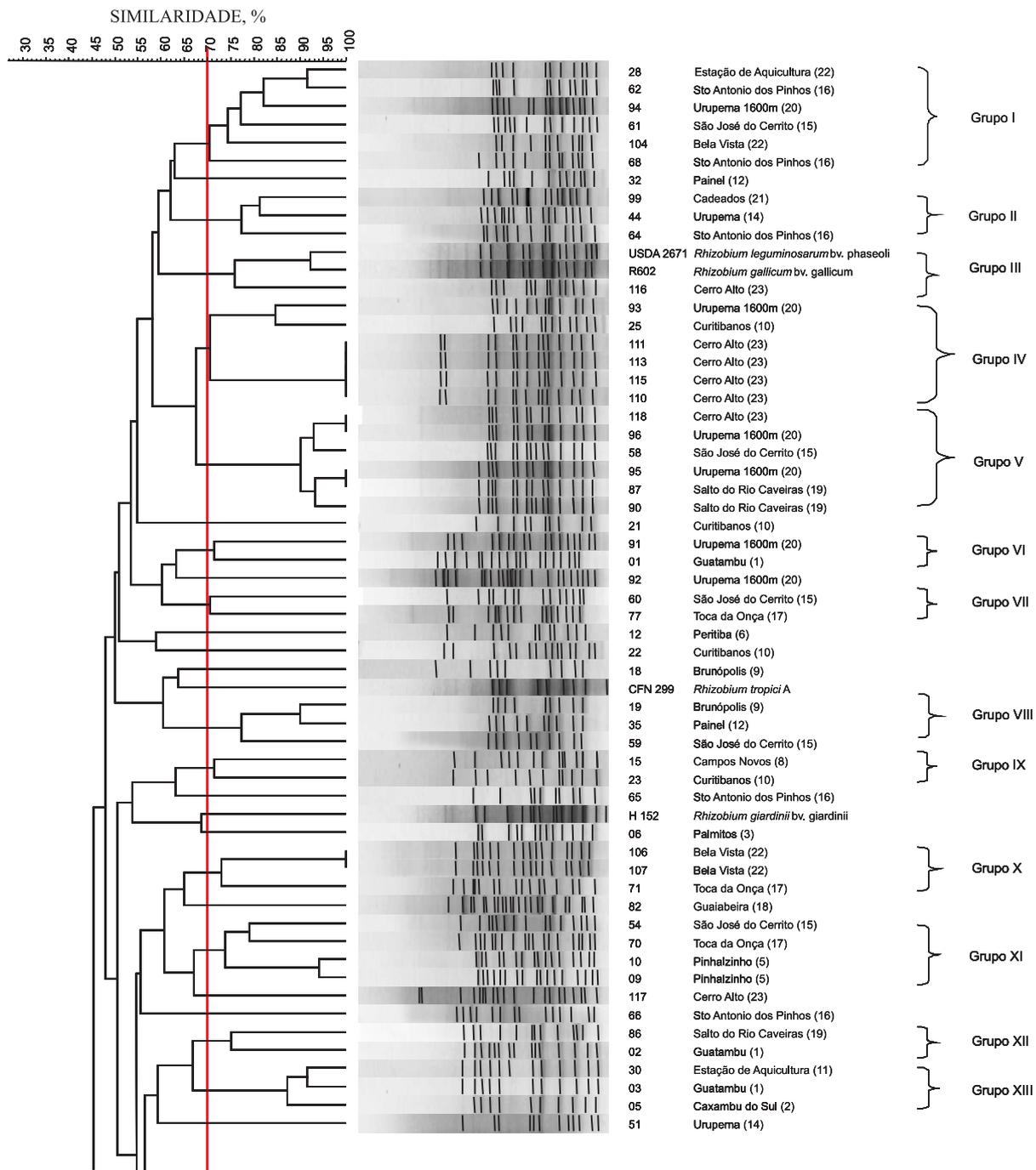


Figura 2. Continua

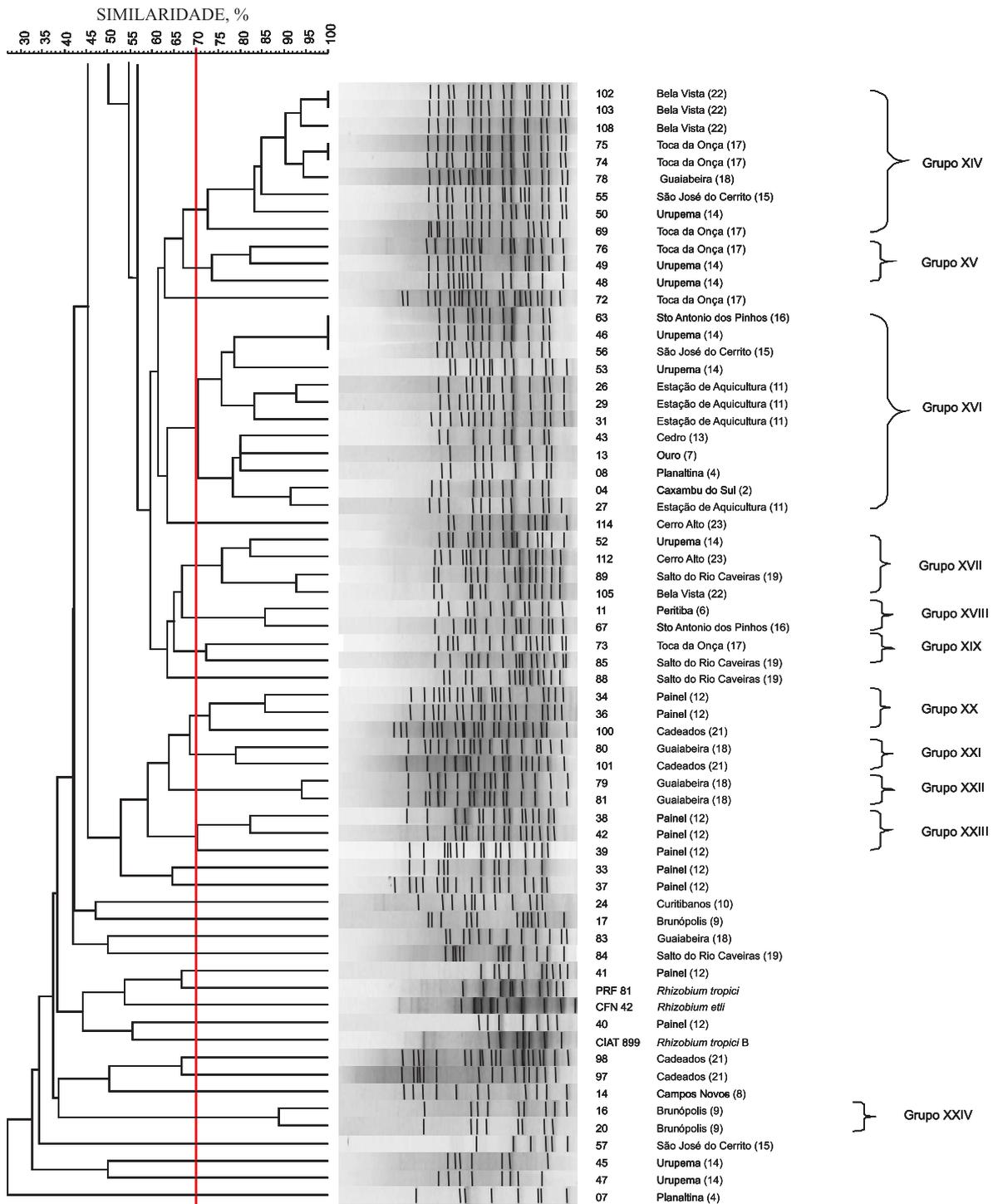


Figura 2. Dendrograma obtido pela análise dos perfis de DNA de 117 simbiontes do feijoeiro em solos de Santa Catarina, após a amplificação por rep-PCR (BOX A1R). Foram utilizados o algoritmo UPGMA, o coeficiente de Jaccard e a tolerância de 2 % no programa Bionumerics.

Catorze agrupamentos reuniram isolados provenientes exclusivamente da região do planalto sul de Santa Catarina: I, II, III, V, VII, X, XIV, XV, XVII, XIX, XX, XXI, XXII e XXIII; além disso, em outros três grupos, os isolados dessa região foram

predominantes: IV, VIII e XVI (Figura 2). Em relação ao meio oeste catarinense, foram observados apenas dois grupos, IX e XXIV, com isolados provenientes exclusivamente dessa região, e somente com dois isolados por grupo. Além disso, seis dos 13 isolados

dessa região 2 foram geneticamente bastante distintos, não sendo posicionados em nenhum grupo. No extremo oeste, somente em um grupo, XIII, os isolados foram do mesmo local; além disso, somente dois isolados (12 e 6) não foram posicionados em nenhum grupo e os demais oito isolados foram dispersos em seis grupos: VI, XI, XII, XIII, XVI e XVIII. Finalmente, as estirpes utilizadas como referência apresentaram perfis distintos dos isolados de Santa Catarina e somente o isolado 116, de Cerro Alto, Palmeira, foi posicionado no mesmo grupo IV com as estirpes USDA 2671 de *R. leguminosarum* bv. phaseoli e R602^T de *R. gallicum* bv. gallicum (Figura 2). Desse modo, não houve agrupamento claro dos isolados de acordo com a região de procedência.

A análise de agrupamento também foi efetuada considerando os perfis de rep-PCR de cada região. Na região 1, extremo oeste, incluindo Chapecó e Concórdia, os 12 isolados formaram agrupamentos em um nível de similaridade baixo, de apenas 24 %. A região 2, meio oeste, agrupou 13 isolados com uma similaridade de 31 % e, finalmente, a região 3, planalto sul, reuniu, com 34 % de similaridade, 92 isolados. Finalmente, a análise de agrupamento dos perfis de rep-PCR também foi realizada em cada município que contasse com mais de dois isolados. A maior variabilidade na similaridade genética foi constatada na região 1, variando de 94 % entre os dois isolados de Pinhalzinho, a 13 %, entre os dois isolados de Planaltina (Quadro 3). Na região 2, a similaridade variou de 33 a 41 % e, na região 3, de 36 a 52 % (Quadro 3). Não foi constatada correlação significativa entre os índices de similaridade genética (Quadro 3) e os atributos químicos do solo (Quadro 2), ou climáticos (Quadro 1).

O polimorfismo de perfis de DNA obtidos por rep-PCR tem mostrado grande aplicabilidade para a identificação de estirpes em várias espécies de bactérias, inclusive nos rizóbios (de Bruijn, 1992; Grange & Hungria, 2004; Grange et al., 2007; Kaschuk et al., 2006). É interessante destacar que a diversidade genética dos isolados de Santa Catarina, detectada por rep-PCR, foi bastante elevada, com o agrupamento dos 117 isolados e as estirpes de referência em um nível de similaridade final bastante baixo, de apenas 26,9 % (Figura 2). Essa diversidade é semelhante à observada em um levantamento no México, centro de diversidade genética do feijoeiro, utilizando eletroforese de multilocos enzimáticos (Caballero-Mellado & Martinez-Romero, 1999).

Os 117 isolados também foram avaliados pela técnica de RFLP-PCR da região do DNA que codifica o gene ribossomal 16S, digerido separadamente com três enzimas de restrição. O dendrograma obtido com os produtos de restrição indicou diversidade genética elevada entre os isolados, com o agrupamento em um nível de similaridade final de 31,2 % (Figura 3). O grupo I incluiu dois isolados com 100 % de similaridade, um de Urupema (planalto sul) e o outro

de Campos Novos (meio oeste), que se uniram com a estirpe tipo de *R. giardinii* bv. giardinii em um nível de similaridade de 94,4 %. O grupo II reuniu 19 isolados, 17 do planalto sul e dois da região meio oeste, com as estirpes de *R. tropici* PRF 81 e CIAT 899^T (tipo B). Já o isolado 12, do extremo oeste, de Peritiba, foi o único que agrupou com a estirpe CFN 299 de *R. tropici* tipo A, com uma similaridade de 93,3 %, formando o grupo III. Quatro isolados foram unidos em um nível final de similaridade de 94,4 %, no grupo IV, com dois subgrupos, o primeiro com dois isolados com semelhança total, 106 e 107, ambos de Bela Vista, Lages, e o segundo, com três isolados de perfis idênticos, dois do extremo oeste e um do planalto sul catarinense (Figura 3). Os grupos V e VI foram os que reuniram maior número de isolados (Figura 3). No grupo V, 38 isolados foram reunidos, com 100 % de similaridade, a *R. leguminosarum* bv. phaseoli USDA 2671 e, também, com *R. gallicum* bv. gallicum R602^T, pois as três enzimas não conseguiram diferenciar essas duas espécies. Esse grupo reuniu isolados das regiões 2 e 3, mas nenhum do extremo oeste. No grupo VI, 42 isolados provenientes das três regiões catarinenses mostraram 100 % de similaridade com a estirpe CFN 42^T de *R. etli* bv. phaseoli. No grupo VII, foram unidos, com 100 % de similaridade, dois isolados de Pinhalzinho e um de Palmitos, ambos na região 1. Os isolados 97 e 98, com perfis idênticos, constituíram o grupo VIII. Finalmente, os isolados 23 e 24, de Curitiba (região 2), e o isolado 99, de Cadeados (região 3), ocuparam posições isoladas (Figura 3).

Considerando as três enzimas de restrição utilizadas, não foi possível diferenciar, isoladamente, as espécies de rizóbios. Constatou-se, também, que, embora *R. tropici* tipo A e tipo B sejam consideradas uma única espécie, a enzima *HhaI* conseguiu diferenciar a estirpe CFN 299 (tipo A) de todas as demais espécies de rizóbios, inclusive da CIAT 899^T (tipo B). A enzima *RsaI* produziu perfis semelhantes com todas as espécies, exceto com *R. etli* CFN 42^T e permitiu a separação de *R. etli* de *R. leguminosarum*. Essas três enzimas somente não conseguiram separar as espécies *R. leguminosarum* de *R. giardinii* (Figura 3).

Quando os perfis de RFLP-PCR foram analisados para cada região catarinense, a similaridade genética entre os isolados das regiões 1, 2 e 3 foi estimada em 78, 44 e 39 %, respectivamente. Os perfis de RFLP-PCR de cada local também foram analisados. Embora os dois isolados de Caxambu do Sul e Pinhalzinho, no extremo oeste, tenham apresentado identidade total de perfis, de modo geral, os isolados do planalto sul apresentaram maior similaridade genética, variando de 70 %, em Toca da Onça, a 93 %, em cinco locais, e a única exceção foi com os isolados de Cadeados (Lages), que apresentaram similaridade de 40 % (Quadro 3). Não houve correlação significativa entre os índices de diversidade genética por RFLP-PCR (Quadro 3) e os atributos químicos do solo (Quadro 2), ou climáticos

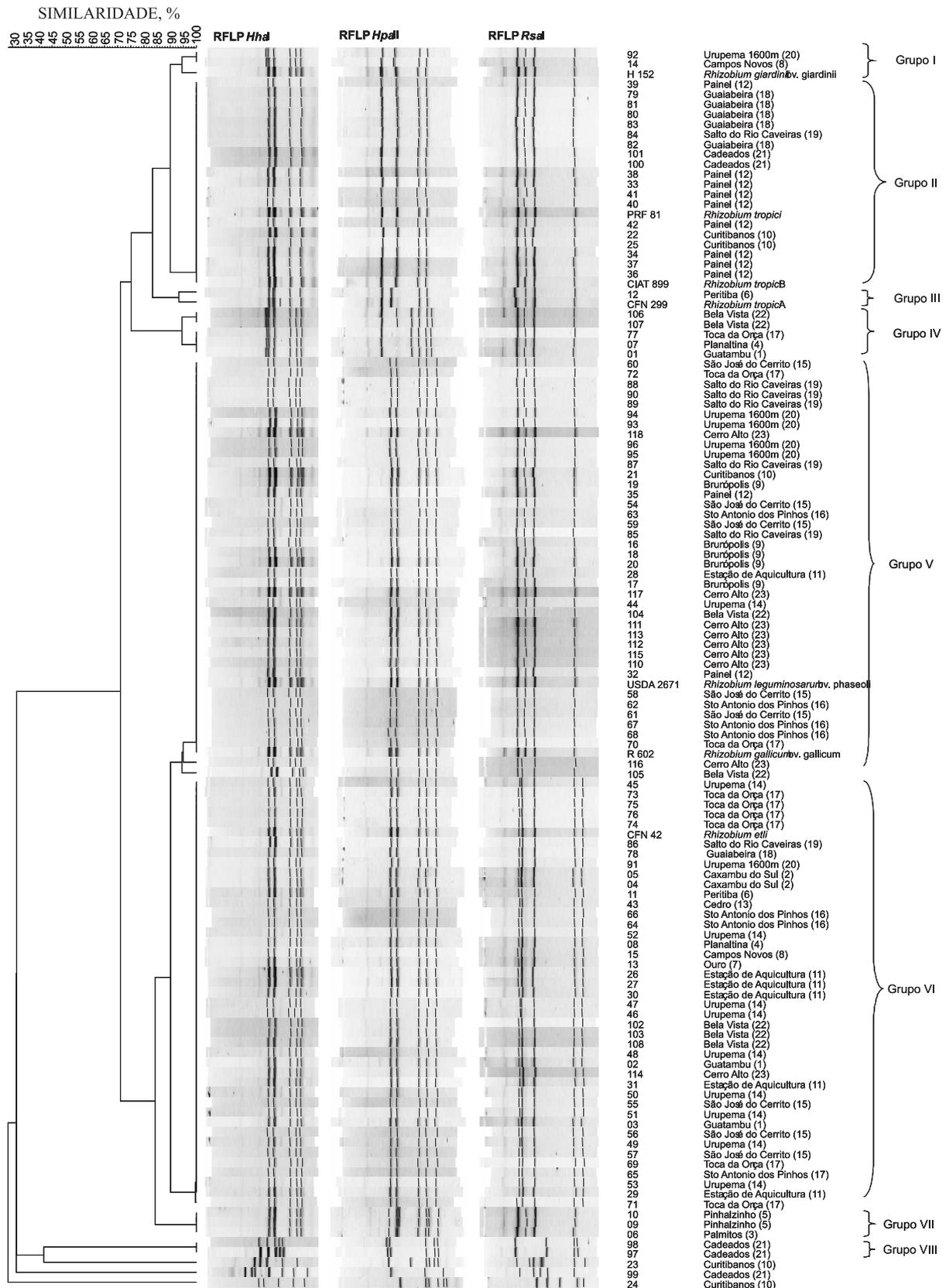


Figura 3. Dendrograma obtido pela análise dos perfis de DNA de 117 simbiontes do feijoeiro em solos de Santa Catarina, obtidos por RFLP-PCR da região 16S rRNA. Foram utilizados o algoritmo UPGMA, o coeficiente de Jaccard e a tolerância de 2 % no programa Bionumerics.

(Quadro 1). Contudo, em relação às espécies, houve predominância de *R. tropici* em solos com pH inferior ao das demais regiões (valor médio de pH de 4,9 ± 0,5), enquanto *R. etli* e *R. leguminosarum* predominaram em pH de 5,9 ± 0,5 e de 5,4 ± 0,6, respectivamente (Figura 3 e Quadro 2).

Até o presente momento, foram feitos poucos levantamentos sobre as espécies de rizóbios microssimbiontes do feijoeiro em solos brasileiros. Além disso, os levantamentos foram realizados em condições variáveis e sabe-se que a diversidade genética pode variar de acordo com a amostragem (Alberton et al., 2006), metodologia de avaliação (Kaschuk et al., 2006), condições ambientais (Straliotto et al., 1999) e planta utilizada como isca (Mercante et al., 1998; Straliotto et al., 1999), dentre outros. No caso do método de amostragem, Alberton et al. (2006) constataram diferenças entre a população de rizóbios capturada utilizando feijoeiro em condições de campo – menor diversidade, mas estirpes mais competitivas – e aquela obtida a partir de plantas inoculadas com diluições de solo – maior diversidade, mas estirpes menos competitivas. Os resultados também variam com a planta utilizada como isca para os rizóbios, por exemplo, em um mesmo solo foi constatada maior diversidade de rizóbios com a utilização de feijoeiro, do que com a leucena como planta-isca (Mercante et al., 1998; Straliotto et al., 1999).

A evolução na metodologia também teve reflexos profundos na identificação das espécies de rizóbios. Como exemplo, estudos pioneiros consideravam as propriedades fisiológicas e simbióticas dos isolados, tais como a capacidade de nodular *Leucaena* spp e o crescimento em meio LB, que ocorreriam exclusivamente com as estirpes de *R. tropici* tipo A (Martinez-Romero et al., 1991; Hungria et al., 2000); contudo, essas propriedades não foram confirmadas posteriormente (Hernandez-Lucas et al., 1995; Amarger et al., 1997). Outras metodologias empregadas, por exemplo, a determinação do perfil protéico (Soares et al., 2006), não são aceitas nos critérios atuais de classificação de espécies procarióticas (Boone et al., 2001). Já a análise do 16S ribossômico, por seqüenciamento ou por RFLP-PCR, apresenta alta correlação com a hibridização DNA-DNA, podendo ser utilizada para a identificação das espécies (Boone et al., 2001; Coenye et al., 2005), razão pela qual foi escolhida para a análise dos isolados catarinense.

Com base no RFLP-PCR do 16S RNA, a população nos solos das três regiões produtoras de Santa Catarina, capturada utilizando o feijoeiro como planta-isca, consistiu de 17,1 % de *R. tropici*, 35,9 % de *R. etli*, 32,5 % de *R. leguminosarum* e 1,7 % de *R. giardinii*; 12,8 % dos isolados não foram classificados em nenhuma das cinco espécies descritas como simbiotes do feijoeiro.

Em relação à espécie *R. etli*, sabe-se que é o microssimbiote dominante em ambos os centros de

diversidade genética do feijoeiro, o mesoamericano e o andino (Segovia et al., 1993; Souza et al., 1994; Bernal & Graham, 2001; Aguilar et al., 2004). Além disso, essa espécie também já foi amplamente detectada em solos brasileiros (Straliotto et al., 1999; Hungria et al., 2000; Andrade et al., 2002; Mostasso et al., 2002; Soares et al., 2006; Giongo et al., 2007) e, em um estudo com *R. etli* de solos dos Estados de Pernambuco e do Paraná, o 16S rRNA apresentou maior semelhança com a estirpe mexicana CFN 42^T (Grange et al., 2007). Existem evidências de que o feijoeiro é cultivado há milhares de anos no Brasil, e feijões de origem mesoamericana foram encontrados em sítios arqueológicos, com indicações de que houve um intercâmbio entre as populações indígenas do México e do Brasil (Freitas, 2006). Desse modo, a introdução de *R. etli* no Brasil pode ter sido via sementes do México, que são capazes de carregar células viáveis de rizóbios (Pérez-Ramirez et al., 1998). Contudo, também no noroeste da Argentina, feijões selvagens são predominantemente nodulados por *R. etli* (Aguilar et al., 2004) e Santa Catarina é uma antiga e conhecida rota de tropeiros da Argentina para o Brasil; desse modo, essa seria outra rota provável de introdução de *R. etli* em Santa Catarina.

Nos solos catarinenses, *R. leguminosarum* representou a segunda maior população, com 32,5 % dos isolados. Na descrição de *R. etli*, Segovia et al (1993) levantaram a hipótese de que, com a colonização da América, sementes de feijão carregando *R. etli* foram introduzidas na Europa, onde provavelmente ocorreu a transferência do plasmídeo simbiótico, primeiro para *R. leguminosarum* (Segovia et al., 1993) e, posteriormente, deste para *R. gallicum* bv. phaseoli e *R. giardinii* bv. phaseoli (Amarger et al., 1997). A espécie *R. leguminosarum*, porém, já foi amplamente detectada em vários ecossistemas brasileiros (Straliotto et al., 1999; Andrade et al., 2002; Mostasso et al., 2002; Giongo et al., 2007; Pinto et al., 2007). É interessante observar, ainda, que *R. leguminosarum* também foi detectada na Colômbia (Eardly et al., 1995), país sugerido como um terceiro centro de diversificação genética do feijoeiro (Gepts & Debuck, 1991), portanto essa espécie de rizóbio poderia também ser nativa da América do Sul. Neste estudo, as três enzimas de restrição utilizadas na análise de RFLP-PCR não conseguiram diferenciar as espécies *R. leguminosarum* e *R. gallicum*, contudo, os isolados catarinenses devem pertencer à espécie *R. leguminosarum*, visto que, até o presente momento, *R. gallicum* bv. gallicum ainda não foi encontrada nos solos brasileiros (Mostasso et al., 2002).

A terceira espécie mais abundante (17,1 %) encontrada em Santa Catarina foi *R. tropici*, que, originalmente, foi isolada de nódulos de feijoeiro na Colômbia e tem sido abundantemente encontrada no Brasil, em estudos utilizando como planta-isca tanto o feijoeiro, como *Leucaena* spp. (Martínez-Romero et al., 1991; Mercante et al., 1998; Hungria et al., 2000; Pinto et al., 2007). Uma primeira hipótese foi a de

que a espécie seria nativa da América do Sul (Martinez-Romero et al., 1991), e é possível que tenha sido introduzida no País vinda da Colômbia, ou de algum país vizinho, pois existiam vários caminhos indígenas ligando os Andes ao Oceano Atlântico (Beltrão, 2005). Este pode ter sido o caminho de introdução e dispersão de feijões e de *R. tropici* no Brasil, onde a espécie teria encontrado condições ideais de adaptação, uma vez que apresenta maior tolerância à acidez e a temperaturas elevadas (Martinez-Romero et al., 1991; Hungria et al., 1993, 2000; Mercante et al., 1998). A origem da espécie *R. tropici*, porém, ainda é incerta, uma vez que também foi isolada de nódulos do feijoeiro ou de outras leguminosas em outros continentes, por exemplo, na África (Anyango et al., 1995), embora *R. tropici* também possa ter sido introduzido nesses continentes via sementes de feijão comercializadas, provenientes da América do Sul ou da Europa. Finalmente, a espécie também poderia ser um microssimbionte de outras leguminosas e possíveis candidatos no Brasil seriam os gêneros *Mimosa* e *Gliricidia*, que estabelecem simbioses bastante efetivas com *R. tropici* (Acosta-Durán & Martínez-Romero, 2002; Germano et al., 2006; Menna et al., 2006).

Duas estirpes catarinenses foram classificadas como *Rhizobium giardinii*, uma espécie capaz de nodular o feijoeiro, mas caracterizada pela baixa capacidade de fixação de N₂ (Amarger et al., 1997). Finalmente, 15 isolados (12,8 %) não formaram agrupamento com nenhuma das cinco espécies já descritas de rizóbios microssimbiontes do feijoeiro, podendo representar novas espécies de rizóbios.

Houve predominância de *R. tropici* nos solos mais ácidos, em média, 4,9, enquanto *R. leguminosarum* e, principalmente, *R. etli* predominaram em pH mais elevado, em média 5,4 e 5,9, respectivamente. Essa distribuição deve estar relacionada com a tolerância elevada de *R. tropici* à acidez (Martinez-Romero et al., 1991; Anyango et al., 1995; Mercante et al., 1998; Hungria et al., 2000; Pinto et al., 2007). Finalmente, cabe salientar que a diversidade elevada de rizóbio, detectada em pequenas propriedades em Santa Catarina, pode indicar que as técnicas e insumos utilizados na agricultura familiar favorecem a biodiversidade; contudo, é importante ressaltar que, em dez propriedades com descarte contínuo de resíduos de suínos, não foi observado nenhum nódulo.

Este estudo é pioneiro na caracterização da diversidade genética de comunidades de rizóbios em áreas produtoras de feijão do Estado de Santa Catarina. A análise do DNA de 117 isolados por rep-PCR e por RFLP-PCR do 16S rRNA indicaram diversidade genética intra- e interespecífica elevada, inclusive com a indicação de novas espécies de rizóbios. Essa diversidade genética pode representar uma fonte importante de genes com potencial biotecnológico para a agricultura e para o meio ambiente, bem como de estirpes com maior capacidade de fixação biológica do N₂ com a cultura do feijoeiro. A funcionalidade dessas

comunidades precisa ser determinada, visando a delinear estratégias que permitam incrementar a contribuição da fixação biológica do N₂.

CONCLUSÕES

1. A diversidade genética intra-específica de rizóbios microssimbiontes do feijoeiro em Santa Catarina mostrou-se elevada, com 91 % dos isolados deste estudo apresentando perfis únicos de DNA analisados por rep-PCR.

2. A composição de espécies de rizóbios microssimbiontes de feijoeiro em Santa Catarina consistiu de 17,1 % de *Rhizobium tropici*, 35,9 % de *R. etli*, 32,5 % de *R. leguminosarum*, 1,7 % de *R. giardinii* e 12,8 % de perfis distintos, podendo representar novas espécies.

3. *R. tropici* ocorreu preferencialmente em solos mais ácidos, enquanto *R. leguminosarum* e *R. etli* apresentaram maior ocorrência em solos com pH mais elevado.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (MCT/CNPq), pelo auxílio financeiro (processo 471773/2004-2 e 552393/2005-3). P. Stocco é bolsista de mestrado e V.P. Vargas de iniciação científica do CNPq. Os autores agradecem a Fernando G. Barcellos, Pâmela Menna, Alan A. Pereira e Lígia Maria O. Chueire (Embrapa Soja), pelo auxílio em várias etapas deste estudo.

LITERATURA CITADA

- ACOSTA-DURÁN, C. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. Diversity of rhizobia from nodules of the leguminous tree *Gliricidia sepium*, a natural host of *Rhizobium tropici*. Arch. Microbiol., 178:161-164, 2002.
- AGUILAR, O.M.; RIVA, O. & PELTZER, E. Analysis of *Rhizobium etli* and its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 101:13548-13553, 2004.
- ALBERTON, O.; KASCHUK, G. & HUNGRIA, M. Sampling effects on the assessment of genetic diversity of rhizobia associated with soybean and common bean. Soil Biol. Biochem., 38:1298-1307, 2006.
- AMARGER, N.; MACHERET, V. & LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov. from *Phaseolus vulgaris* nodules. Intr. J. Syst. Bacteriol., 47:996-1006, 1997.

- ANDRADE, D.S.; MURPHY, P.J. & GILLER, K.E. The diversity of *Phaseolus*-nodulating rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:4025-4034, 2002.
- ANYANGO, B.; WILSON, K.J.; BEYNON, J.L. & GILLER, K.E. Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pHs. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:4015-4021, 1995.
- BELTRÃO, M. Os caminhos de ouro – o caminho novo e a fazenda do governo. *Brasilis*, 22:65-78, 2005.
- BERNAL, G. & GRAHAM, P.H. Diversity in the rhizobia associated with *Phaseolus vulgaris* L. in Ecuador, and comparisons with Mexican bean rhizobia. *Can. J. Microbiol.*, 47:526-534, 2001.
- BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W. & GARRITY, G.M., eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York, Springer-Verlag, 2001. p.27-31.
- CABALLERO-MELLADO, J. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. Soil fertilization limits the genetic diversity of *Rhizobium* in bean nodules. *Symbiosis*, 26:111-121, 1999.
- COENYE, T.; GEVERS, D.; PEER, Y.V.; VANDAMME, P. & SWINGS, J. Towards a prokaryotic genomic taxonomy. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29:147-167, 2006.
- de BRUIJN, F.J. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58:2180-2187, 1992.
- DEBOUCK, D.G. Primary diversification of *Phaseolus* in the Americas: Three centers? *Plant Genetic Res. Newsletter*, 67:2-8, 1986.
- EARDLY, B.D.; HANNAWAY, D.B. & BOTTOMLEY, P.J. Characterization of rhizobia from ineffective alfalfa nodules: ability to nodulate bean plants [*Phaseolus vulgaris* (L.)]. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50:1422-1427, 1985.
- EARDLY, B.D.; WANG, F.S.; WHITTAM, T.S. & SELANDER, R.K. Species limits in *Rhizobium* populations that nodulate the common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:507-512, 1995.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Mapa de solos do Estado de Santa Catarina. Disponível em: http://mapserver.cnps.embrapa.br/website/pub/Santa_Catarina/viewer.htm. Acesso em: 25 abr. de 2006.
- FEDERAÇÃO DOS TRABALHADORES NA AGRICULTURA DO ESTADO DE SANTA CATARINA - FETAESC. Plano de reordenação sustentável da agricultura familiar em Santa Catarina. Disponível em: <http://www.fetaesc.org.br/gtb/2006/plano.pdf>. Acesso em: 8 de set. de 2006.
- FRED, E.B.; BALDWIN, I.L. & McCOY, E. *Root nodule bacteria of leguminous plants*. Madison, The University of Wisconsin Press, 1932. 343p.
- FREITAS, F.O. Evidências genético-arqueológicas sobre a origem do feijão comum no Brasil. *Pesq. Agropec. Bras.*, 41:1199-1203, 2006.
- FUNDAÇÃO NACIONAL DO ÍNDIO – FUNAI. Povos indígenas. Disponível em: <http://www.funai.gov.br>. Acesso em: 14 de abr. de 2006.
- GEPTS, P. & DEBOUCK, D. Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: van SCHOONHOVEN, A. & VOYSEST, O., eds. *Common beans: Research for crop improvement*. Wallingford, CAB, 1991. p.7-53.
- GERMANO, M.G.; MENNA, P.; MOSTASSO, F.L. & HUNGRIA, M. RFLP analysis of the RNA operon of a Brazilian collection of bradyrhizobial strains from thirty-three legume species. *Inter. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 56:217-229, 2006.
- GIONGO, A.; PASSAGLIA, L.M.P.; FREIRE, J.R.J. & SÁ, E.L.S. Genetic diversity and symbiotic efficiency of population of rhizobia of *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. *Biol. Fert. Soils*, 43:593-598, 2007.
- GRANGE, L. & HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia in two Brazilian ecosystem. *Soil Biol. Biochem.*, 36:1389-1398, 2004.
- GRANGE, L.; HUNGRIA, M.; GRAHAM, P.H. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil. *Soil Biol. Biochem.*, 39:867-876, 2007.
- HERNANDEZ-LUCAS, I.; SEGOVIA, L.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. & PUEPPKE, S.G. Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulates *Phaseolus vulgaris* L. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:2775-2779, 1995.
- HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; CHUEIRE, L.M.O.; PROBENZA, A.; GUTTIERREZ-MANERO, J. & MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia strains. *Soil Biol. Biochem.*, 32:1515-1528, 2000.
- HUNGRIA, M.; FRANCO, A.A. & SPRENT, J.I. New sources of high-temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Soil*, 149:103-109, 1993.
- INCRA/FAO. Novo retrato da agricultura familiar: o Brasil redescoberto. Brasília, Ministério do Desenvolvimento Agrário, 2000. 74p.
- JORDAN, D.C. *Rhizobiaceae* Conn 1938. In: KRIEG, N.R. & HOLT, J.G., eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore/London, Williams & Wilkins, 1984. p.235-244.
- KASCHUK, G.; HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S. & CAMPO, R.J. Genetic diversity of rhizobia associated with common bean grown under the no-tillage and conventional systems in South Brazil. *Appl. Soil Ecol.*, 32:210-220, 2006.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, E.; MERCANTE, F.M.; FRANCO, A.A.; GRAHAM, P.H. & PARDO, M.A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Inter. J. Syst. Bacteriol.*, 41:417-426, 1991.

- MENNA, P.; HUNGRIA, M.; BARCELLOS, F.G.; BANGEL, E.V.; HESS, P.N. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Syst. Appl. Microbiol.*, 29:315-332, 2006.
- MERCANTE, F.M.; CUNHA, C.O.; STRALIOTTO, R.; RIBEIRO-JUNIOR, W.; VANDERLEYDEN, J. & FRANCO A.A. *Leucaena leucocephala* as a trap-host for *Rhizobium tropici* strains from the Brazilian "cerrado" region. *Rev. Microbiol.*, 29:49-58, 1998.
- MICHIELS, J.; DOMBRECHT, B.; VERMEIREN, N.; XI, C.; LUYTEN, E. & VANDERLEYDEN, J. *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 26:193-205, 1998.
- MOSTASSO, L.; MOSTASSO, F.L.; DIAS, B.G.; VARGAS, M.A.T. & HUNGRIA, M. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. *Field Crops Res.*, 73:121-132, 2002.
- PÉREZ-RAMÍREZ, N.O.; ROGEL, M.A.; WANG, E.; CASTELLANOS, J.Z. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. Seeds of *Phaseolus vulgaris* bean carry *Rhizobium etli*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 26:289-296, 1998.
- PINTO, F.G.S.; HUNGRIA, M. & MERCANTE, F.M. Polyphasic characterization of Brazilian *Rhizobium tropici* strains effective in fixing N₂ with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Soil Biol. Biochem.*, 39:1851-1864, 2007.
- PROUS, A. O povoamento da América visto do Brasil: uma perspectiva crítica. Dossiê surgimento do homem na América. *R. USP*, 34:8-21, 1997.
- SEGOVIA, L.; YOUNG, J.P.W. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Inter. J. Syst. Bacteriol.*, 43:374-377, 1993.
- SOARES, A.L.L.; FERREIRA, P.A.A.; PEREIRA, J.P.A.R.; VALE, H.M.M.; LIMA, A.S.; ANDRADE, M.J.B. & MOREIRA, F.M.S. Eficiência agrônômica de rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões (MG). II – Feijoeiro. *R. Bras. Ci. Solo*, 30:803-811, 2006.
- SOUZA, V.; EGUIARTE, L.; AVILA, G.; CAPPELO, R.; GALLARDO, C.; MONTOYA, J. & PIÑERO, D. Genetic structure of *Rhizobium etli* biovar *phaseoli* associated with wild and cultivated bean plants (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*) in Morelos, Mexico. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60:1260-1268, 1994.
- STRALIOTTO, R.; CUNHA, C.O.; MERCANTE, F.M.; FRANCO, A.A. & RUMJANEK, N.G. Diversity of rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) isolated from Brazilian tropical soils. *An. Acad. Bras. Ci.*, 71:531-543, 1999.
- TEDESCO, J.M.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.A. & VOLKWEISS, S.J. Análise de solo, plantas e outros materiais. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p.
- van BERKUM, P.; BEYENE, D.; BAO, G.; CAMPBELL, T.A. & EARDLY, B.D. *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica*. *Inter. J. Syst. Bacteriol.*, 48:13-22, 1998.
- VIEIRA, E.H.N. & RAVA, C.A., eds. Sementes de feijão: produção e tecnologia. Santo Antônio de Goiás, Embrapa Arroz e Feijão, 2000. 270p.
- VINCENT, J.M. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Oxford, Blackwell Scientific, 1970. 164p. (International Biological Programme Handbook, 15).