

Carolina E. R. S. Santos<sup>1</sup>

Newton P. Stamford<sup>1</sup>

Wardsson L. Borges<sup>2</sup>

Maria C. P. Neves<sup>2</sup>

Norma G. Runjanek<sup>2</sup>

Luciana R. Nascimento<sup>1</sup>

Ana D. S. Freitas<sup>1</sup>

Iraci M. M. B. Vieira<sup>1</sup>

Rosemberg V. Bezerra<sup>1</sup>

# Faixa hospedeira de rizóbios isolados das espécies *Arachis hypogaea*, *Stylosanthes guyanensis* e *Aeschynomene americana*

## RESUMO

Os gêneros *Arachis*, *Stylosanthes* e *Aeschynomene*, pertencentes, à tribo Aeschynomeneae, são nodulados por vários tipos diferentes de rizóbios. Essas bactérias formam um grupo de inoculação altamente heterogêneo, normalmente conhecido como rizóbio tropical. Dois experimentos foram conduzidos em casa de vegetação utilizando-se vasos de Leonard sob condições estéreis, para avaliação da faixa de especificidade hospedeira de rizóbio isolado de nódulos das raízes de plantas da tribo Aeschynomene, e da sua eficiência simbiótica. Testaram-se vinte estirpes de rizóbios isoladas de *Arachis hypogaea* (cv. BR1), *Stylosanthes guyanensis* e *Aeschynomene americana* cultivadas em amostras de solos da região nordeste do Brasil. Os isolados usados como inoculantes provieram de plantas de caupi (*Vigna unguiculata*), siratro (*Macropitilium atropurpureum*) e amendoim (*Arachis hypogaea*). No segundo experimento vinte estirpes também foram testadas nas seguintes espécies: *A. hypogaea*, *S. guyanensis*, *A. americana*, *V. unguiculata* e *M. atropurpureum*. *Macropitilium atropurpureum* foi capaz de nodular com todos os isolados testados, mas mostrou diferença na eficiência simbiótica. De outro lado, apenas oito isolados foram capazes de nodular o caupi. Esses resultados sugerem que isolados de rizóbios da tribo Aeschynomene apresentam diferenças quanto à faixa hospedeira, indicando também a ocorrência de diferentes grupos de inoculação.

**Palavras-chave:** FBN, caupi, eficiência simbiótica, Phaseoleae, amendoim

## Cross-inoculation groups of rhizobia strains from *Arachis hypogaea*, *Stylosanthes guyanensis* e *Aeschynomene americana* species

## ABSTRACT

The genus *Arachis*, *Stylosanthes* and *Aeschynomene* which belong to the Aeschynomeneae tribe are nodulated by several different types of rhizobia. These bacteria form a highly heterogeneous inoculation group which is commonly known as tropical rhizobia. Two experiments were performed in greenhouse with Leonard jars under sterile conditions to evaluate the specificity host range of rhizobia isolated from root nodules of the Aeschynomeneae tribe, as well as its symbiotic efficiency. Twenty rhizobia strains isolated from *Arachis hypogaea* (cv. BR1), *Stylosanthes guyanensis* and *Aeschynomene americana* cultivated in soil samples from the north-east region of Brazil were tested. The isolates were used as inoculant for cowpea (*Vigna unguiculata*), *Macropitilium atropurpureum* and peanut (*Arachis hypogaea*). In a second experiment twenty rhizobia strains were tested in *A. hypogaea*, *S. guyanensis*, *A. americana*, *V. unguiculata* e *M. atropurpureum* species. Peanut and *Macropitilium atropurpureum* were capable of nodulating with all isolates tested but differences were found regarding symbiotic efficiency. On the other hand, only 8 of the isolates were capable of nodulating cowpea. These results suggest that rhizobial isolates from the Aeschynomene tribe display differences in the host range and should form different inoculation groups.

**Key words:** BNF, cowpea, symbiotic effectiveness, Phaseoleae, peanut

<sup>1</sup> Departamento de Agronomia/Área de Solo/UFRPE

<sup>2</sup> Centro de Agrobiologia/Laboratório de Ecologia/Molecular Microbiana/Embrapa

## INTRODUÇÃO

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) pertence ao gênero *Arachis* (família Fabaceae, subfamília Papilionaceae) que engloba mais de 70 espécies (Krapovickas & Gregory, 1994). Trata-se de uma planta originária da América do Sul (Gregory et al., 1980). Acredita-se que o centro de origem dessa leguminosa seja o Brasil, embora bastante cultivada na Ásia, África e América do Norte (Allen & Allen, 1991).

Os rizóbios que nodulam o amendoim pertencem ao grupo *Bradyrhizobium* spp., classificado como grupo miscelânea caupi ou, ainda, como grupo de rizóbio tropical (Martins et al., 1997). Alta diversidade e heterogeneidade genética têm sido observadas nas estirpes de *Bradyrhizobium* que nodulam o amendoim (Saleena et al., 2001; Chen et al., 2003; Yang et al., 2005; Taurian et al., 2006). Ao contrário do que se acreditava, tem-se constatado certo grau de especificidade das espécies de leguminosas tropicais e dos rizóbios do grupo tropical. A nodulação de diferentes espécies de leguminosas em solos tropicais é mais influenciada pelo hospedeiro que pelos rizóbios existentes nesses solos (Burton 1986; Thies et al., 1991a; Rumjanek et al., 2005 e Xavier et al. 2006).

O gênero *Stylosanthes* é bastante complexo taxonomicamente, e se compõe de 50 espécies herbáceas, nativas da Ásia tropical, África e América, podendo ser usado como forragem ou adubo verde. Este gênero foi classificado inicialmente como promiscuo por Norris (1964). Rizóbios isolados de *S. guyanensis* também possuem ampla faixa hospedeira. A facilidade de nodular com o grupo *Bradyrhizobium* spp. explica a alta incidência de nodulação nessa espécie, com rizóbios nativos em solos tropicais.

Chandapillai (1972) testou 7 espécies de leguminosa do gênero *Stylosanthes* com 25 estirpes isoladas de *Stylosanthes*, *Arachis*, *Zornia* e *Dolichos* e observou comportamento diferenciado, de acordo com a espécie de *Stylosanthes*; por exemplo, *S. erecta* nodulou eficientemente com 90% das estirpes utilizadas, enquanto a *S. hamantia* só nodulou com seis estirpes e nenhuma das associações foi eficiente, indicando maior especificidade em relação ao rizóbio.

Por outro lado, Sá et al. (1983) encontraram rizóbios isolados de *Stylosanthes* com alto grau de eficiência, das quais 30% classificados como muito eficientes. Vargas et al. (1994) demonstraram que vários ecótipos de *S. guyanensis* e *S. scabra* apresentam, quando em associação com rizóbio, alto grau de fixação biológica de N<sub>2</sub>.

Espécies do gênero *Aeschynomene* são utilizadas como forragem e adubo verde e a ocorrência de nódulos radiculares e caulinares é um fenômeno característico desse gênero. Existe alguma evidência de que os rizóbios que nodulam este gênero pertencem ao grupo *Bradyrhizobium* spp. Martins et al. (2000) ao estudarem rizóbios isolados da espécie *A. fluminensis*, verificaram que todas foram capazes de formar nódulos radiculares e caulinares, e constataram elevada diversidade morfológica entre os isolados. Rodrigues et al. (2000) encontraram grande diversidade de características morfológicas, fisiológicas e genéticas em rizóbios isolados de nódulos de caule de *Aeschynomene fluminensis*, coletados no Pantanal Mato-Grossense.

Sanginga et al. (1996) estudaram a nodulação de várias leguminosas, entre elas as mucuna (*Mucuna pruriens*), *Crotalaria juncea*, feijão guandu (*Cajanus cajan*), *Stylosanthes* e *Aeschynomene*, em cinco sítios do Oeste da África, constatando que a mucuna não nodulou em 40% dos sítios, crotalaria não nodulou em nenhum dos sítios estudados, *Stylosanthes* nodulou em quatro, *Aeschynomene histrix* nodulou em dois e o guandu nodulou em três sítios, o que indica diferentes níveis de especificidade inerentes a essas espécies.

A introdução de leguminosas, como amendoim, *Stylosanthes* e *Aeschynomene*, em cultivos consorciados com gramíneas, representa uma forma de elevar a fertilidade do solo pela incorporação de N (Sanginga, 1996; Moretzsohn et al., 2005).

A otimização da FBN nas condições de clima tropical, exige um conhecimento maior da dinâmica das populações estabelecidas nas regiões tropicais do nível de especificidade da associação leguminosa x rizóbio; portanto, é necessário avaliar e selecionar combinações estirpes-hospedeiros específicas para uso agrônomo, onde seja enfatizada a alta produtividade através de otimização da FBN. O presente trabalho objetivou o estudo da faixa de hospedeiros e a eficiência de rizóbios isolados de amendoim (*Arachis hypogaea*), *Stylosanthes guyanensis* e *Aeschynomene americana*, em plantas da tribo Aeschynomeneae e Phaseoleae.

## MATERIAL E MÉTODOS

Com o objetivo de estudar a faixa hospedeira de rizóbios tropicais inoculados em leguminosas da tribo Aeschynomeneae e Phaseoleae, dois experimentos foram conduzidos em casa de vegetação em que no primeiro se avaliaram 12 isolados de rizóbio (10, 11, 19, 40, 72-C, 75, 105, 115, 135 e 296) obtidos a partir de nódulos de raízes de plantas de amendoim (*A. hypogaea*), *S. guyanensis* e *A. americana* em 3 leguminosas da tribo Aeschynomeneae: *A. hypogaea*, *S. guyanensis* e *A. americana*, e 5 leguminosas da tribo Phaseoleae: caupi (*Vigna unguiculata*) siratro (*Macropitilium artropurpureum*) crotalaria (*Crotalaria juncea*), calopogônio (*Calopogonium mucunoides*) e cunhã (*Clitoria ternateae*); já no segundo experimento foram avaliados 20 isolados de rizóbio (13, 27, 50, 65, 66, 95, 104, 234, 240, 275, 289, 100c, 22c, 23c, 26c, 39c, 48c, 74c, 92c e 98c) obtidos a partir de nódulos de raízes de plantas de amendoim (*A. hypogaea*), *S. guyanensis* e *A. americana*, cultivadas em solos da Zona da Mata e da região semi-árida do estado de Pernambuco, em 3 leguminosas da tribo Aeschynomeneae: amendoim (*Arachis hypogaea*), *S. guyanensis*, *A. americana*, e em duas leguminosas da tribo Phaseoleae: caupi (*Vigna unguiculata*) e siratro (*Macropitilium artropurpureum*).

Em ambos os experimentos, foram incluídos dois tratamentos controle, sendo um com a adição de fertilizante nitrogenado, na forma de nitrato de amônio (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>), na proporção de 100 mg de N kg<sup>-1</sup> de areia, e um outro sem adição de fertilizante nitrogenado nem de inoculante, de forma que o primeiro experimento foi conduzido em casa de vegetação em delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 14 x 8 (12 isolados e 2 testemunhas nitrogenadas x 8

leguminosas) com 3 repetições, enquanto o segundo experimento foi conduzido em DIC, em esquema fatorial 24 x 5 (20 isolados e 2 testemunhas nitrogenadas, sendo uma com N e outra sem N em 5 leguminosas com 3 repetições). Os isolados foram multiplicados em meio de cultura contendo extrato de levedura e manitol (YM) (Vicent, 1970), sob agitação orbital constante a 28 °C até atingirem  $10^8$  células mL<sup>-1</sup> e as sementes esterilizadas com hipoclorito de sódio (2%), pré-germinadas em bandejas e, posteriormente, transplantadas para os vasos de Leonard, contendo 200 g de areia lavada estéril; três dias após o transplante, as plantas foram inoculadas com 1 mL do meio YM contendo  $10^8$  células mL<sup>-1</sup>.

Avaliou-se o acúmulo de massa seca da parte aérea e se calculou a eficiência relativa das plantas inoculadas com os diferentes isolados, para cada espécie vegetal, em relação ao controle com N fertilizante, levando-se em consideração o acúmulo de matéria seca, de acordo com a fórmula sugerida por (Date et al., 1993):

$$Efc = 100 * MSPI / MSCN$$

em que:

Efc - Eficiência (%)

MSPI - acúmulo da matéria seca das plantas inoculadas

MSCN - acúmulo de matéria seca do controle com N- fertilizante

Consideram-se como ineficientes os isolados que apresentaram menos de 35% de produção de matéria seca quando comparados ao tratamento com adição de N fertilizante, pouco eficientes os que indicaram de 35 a 50%, eficientes aqueles de 50 a 80% e muito eficientes os superiores a 80%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de nodulação do primeiro experimento revelaram que as plantas de amendoim e siratro nodularam com todos os isolados testados; já as plantas de caupi falharam em nodular com quatro dos 12 isolados, um era proveniente de nódulo de amendoim, 2 de nódulos de *Stylosanthes* e um originário de nódulo de *Aeschynomene*. As plantas de *Stylosanthes* só foram capazes de nodular com os isolados de *Stylosanthes*, e as plantas de *Aeschynomene* só formaram nódulos com o isolado de *Aeschynomene*. Nenhuma estirpe testada no primeiro experimento foi capaz de nodular crotalária, cunhã, feijão guandu ou calopogônio.

Observou-se, no segundo experimento, menor taxa de nodulação para todas as espécies testadas. As plantas de amendoim foram as que nodularam com a maior parte dos isolados; entretanto, falharam em nodular com quatro dos 22 isolados testados, dos quais três provieram de nódulos de *Stylosanthes* e dois de nódulos de *Aeschynomene*; já as plantas de siratro só nodularam com cinco isolados e as de caupi apenas com dois isolados. As plantas de *Stylosanthes* nodularam com os 4 isolados originados de *Stylosanthes* e as de *Aeschynomene* só nodularam com os isolados que vieram de *Aeschynomene*. O comportamento de *S. guyanensis* e de *A. americana* foi idêntico nos dois experimentos.

Os isolados estudados apresentaram resultados diferenciados para cada uma das espécies de leguminosas estudadas nos dois experimentos. Os resultados obtidos no experimento I mostraram que os rizóbios de espécies da tribo Aeschynomeneae não foram incapazes de nodular calopogônio, feijão guandu e crotalária. As plantas de cunhã formaram nódulos muito pequenos e ineficientes, razão por que os isolados utilizados no experimento II não foram testados como inoculantes, para essas quatro espécies. Os resultados de nodulação dos dois experimentos estão resumidos na Tabela 1, na qual se acham, também, isolados testados e a planta de sua origem.

No gênero *Arachis*, inclusive no amendoim, há ocorrência de linhagens muito variadas, algumas das quais não nodulantes (Dutta & Reddy, 1988; Nigan et al., 1991). O rizóbio que nodula o amendoim pertence ao grupo *Bradyrhizobium* spp. Este grupo apresenta grande diversidade fenotípica e genotípica, podendo nodular ampla variedade de espécies de leguminosas (Dadarwal et al., 1974; Ligon et al., 1982; Xavier et al., 2005; Xavier et al., 2006).

O grupo *Bradyrhizobium* spp. não tem nome de espécie definida e atualmente qualquer isolado de leguminosas tropicais, que apresentem crescimento lento, são classificados dentro desse grupo (Young & Haukka, 1995; Young et al., 2005); entretanto, também há ocorrência de rizóbio de crescimento rápido dentro desse mesmo grupo (Taurian et al., 2006)

Para comparar o acúmulo de matéria seca das plantas inoculadas com os diferentes isolados testados, calculou-se a taxa de eficiência dos isolados em relação ao controle com N, como sugerido por Date et al. (1979). Apesar dos isolados testados terem sido capazes de nodular o amendoim, a Figura 1 mostra que apenas 20% foram eficientes; por outro lado, 40% dos isolados foram eficientes com siratro; já com relação às plantas de caupi, mais de 20% dos isolados foram eficientes. Os isolados oriundos de *Stylosanthes* e de *Aeschynomene*, foram eficientes com as plantas de origem não nodulando, no entanto, as demais espécies estudadas.

Os resultados obtidos revelam que as populações de rizóbios nativos de regiões tropicais se mostram diretamente ligadas ao hospedeiro de interesse, confirmando a existência de grupos de inoculação diferenciados quanto à faixa hospedeira, dentro do grupo *Bradyrhizobium* spp ou miscelânea caupi, como sugerido por Burton (1986), Thies et al. (1991) e Xavier et al. (2006).

Wong & Patchamuthu (1988) estudando 27 estirpes de rizóbios de crescimento rápido e lento, capazes de nodular caupi, constataram que duas estirpes de crescimento lento formaram nódulos eficientes em amendoim, enquanto apenas uma de crescimento rápido foi capaz de formar nódulos eficientes, 19 formaram nódulos ineficientes e o restante não formou nódulos nesta leguminosa.

A partir dos resultados de nodulação, os isolados foram agrupados de acordo com a faixa hospedeira, gerando 7 grupos de especificidade, em que no grupo 1 se encontram os isolados mais específicos, os quais só foram capazes de formar nódulos nas plantas de origem; no grupo 2 encontram-se os isolados de *Stylosanthes* ou *Aeschynomene*; este grupo foi capaz de nodular as plantas de origem e de amendoim,

**Tabela 1.** Isolados de nódulos de raízes testados nos dois experimentos, planta de origem, resultado da nodulação nos diferentes hospedeiros analisados e grupo de especificidade dos isolados**Table 1.** Isolates of root nodules tested in two experiments, plant of origin, result of nodulation in different hosts and specific group of isolates

Isolados	Experimento	Planta original	Nodulação <sup>#</sup>					Grupo especificidade
			Amendoim	Siratro	Caupi	Stylosanthes	Aeschynomene	
22-c	EX 2	Aeschynomene	N	N	N	N	S	1
26-c	EX 2	Aeschynomene	N	N	N	N	S	1
186	EX 2	Stylosanthes	N	N	N	S	N	1
275	EX 2	Stylosanthes	N	N	N	S	N	1
50	EX 2	Stylosanthes	N	N	N	S	N	1
27	EX 2	Stylosanthes	N	N	N	S	N	1
66	EX 2	Amendoim	S	N	N	N	N	1
95	EX 2	Amendoim	S	N	N	N	N	1
147	EX 2	Amendoim	S	N	N	N	N	1
234	EX 2	Amendoim	S	N	N	N	N	1
240	EX 2	Amendoim	S	N	N	N	N	1
65	EX 2	Amendoim	S	N	N	N	N	1
100-c	EX 2	Amendoim	S	N	N	N	N	1
92-c	EX 2	Amendoim	S	N	N	N	N	1
98-c	EX 2	Amendoim	S	N	N	N	N	1
39-c	EX 2	Amendoim	S	N	N	N	N	1
55	EX 2	Amendoim	S	N	N	N	N	1
104	EX 2	Amendoim	S	N	N	N	N	1
23-c	EX 2	Aeschynomene	S	N	N	N	S	2
10	EX 1	Stylosanthes	S	N	N	S	N	2
289	EX 2	Stylosanthes	S	N	N	S	N	2
11	EX 1	Stylosanthes	S	S	N	S	N	3
19	EX 1	Aeschynomene	S	S	N	N	S	3
13	EX 2	Amendoim	S	S	N	N	N	4
43-c	EX 2	Amendoim	S	S	N	N	N	4
48-c	EX 2	Amendoim	S	S	N	N	N	4
74-c	EX 2	Amendoim	S	S	S	n	N	5
40	EX 1	Amendoim	S	S	S	n	N	5
296	EX 1	Amendoim	S	S	S	n	N	5
72-c	EX 1	Amendoim	S	S	S	n	N	5
75	EX 1	Amendoim	S	S	S	n	N	5
115	EX 1	Amendoim	S	S	S	n	N	5
135	EX 1	Amendoim	S	S	S	n	N	5
140	EX 1	Amendoim	S	S	S	n	S	6
105	EX 1	Amendoim	S	S	S	n	S	6
24	EX 1	Stylosanthes	S	S	S	s	N	7

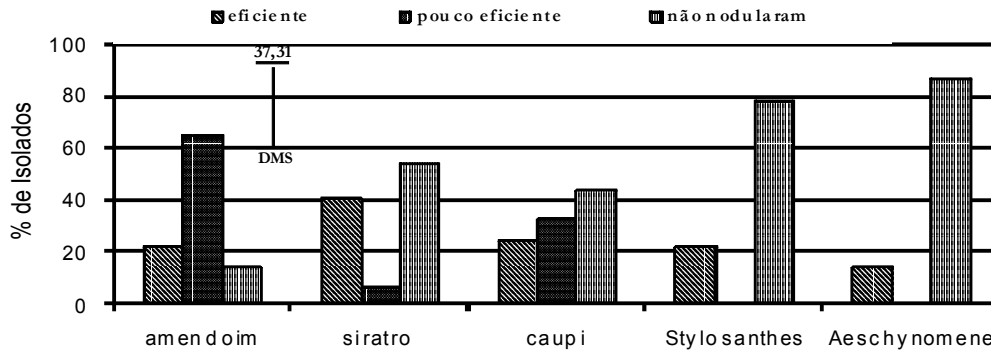
<sup>#</sup> S - positivo para a nodulação; N - negativo para a nodulação; EX 1 - primeiro experimento; EX 2 - segundo experimento

enquanto o grupo 3, também formado por isolados de *Stylosanthes* e *Aeschynomene*, foi capaz de nodular além das plantas de origem, o amendoim e o siratro; por outro lado, o grupo 4, formado por isolados de amendoim, além de nodular a planta de origem nodulou também o siratro; o grupo 5, que também se compõe de isolados de amendoim, foi capaz de nodular a planta de origem, siratro e caupi, mas não o foi em relação às plantas de *Stylosanthes* e *Aeschynomene*; entretanto, o grupo 6, composto de rizóbios de amendoim, foi um dos grupos que apresentaram a maior faixa hospedeira sendo portanto, um dos menos específicos, não nodulando apenas

as plantas de *Stylosanthes*; finalmente, o grupo 7, formado por rizóbios de *Stylosanthes*, também foi outro grupo que apresentou ampla faixa hospedeira não nodulando apenas as plantas de *Aeschynomene*.

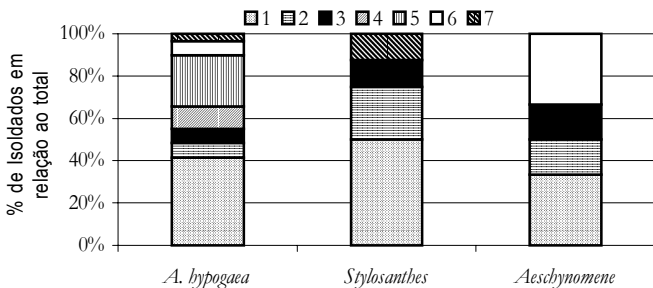
Nenhum isolado foi capaz de nodular, ao mesmo tempo, *Aeschynomene* e *Stylosanthes*, o que sugere a presença de sinais moleculares diferenciados entre esses gêneros.

A Figura 2 mostra a distribuição percentual dos isolados provenientes de nódulos de raízes de *A. hypogaea*, *Stylosanthes* e *Aeschynomene* em grupos de especificidade. Os isolados de plantas de *A. hypogaea* apresentaram um comporta-



**Figura 1.** Percentual de isolados com comportamento da associação classificada como Muito eficientes (associações com 80% ou mais de matéria seca), Eficientes (associações com rendimento entre 50 e 80%), Pouco eficientes (associações com rendimento entre 35 e 50%) e ineficientes (associações com rendimento abaixo de 35%) por espécie vegetal estudada

**Figure 1.** Percentage of isolates with behavior of association classified as very efficient (association with dry matter between 50 and 80%), little efficient (association with dry matter between 35 and 50%) and inefficient (association with dry matter below 35%) for vegetable species studied



**Figura 2.** Distribuição dos isolados provenientes de plantas de *A. hypogaea*, *Stylosanthes* e *Aeschynomene* de acordo com a faixa hospedeira

**Figure 2.** Distribution of isolates of *A. hypogaea*, *Stylosanthes* and *Aeschynomene* plants according to host range

mento mais diferenciado agrupados em 5 grupos de inoculação (1, 4, 5, 6 e 7), o que sugere a ocorrência de sinais moleculares variados.

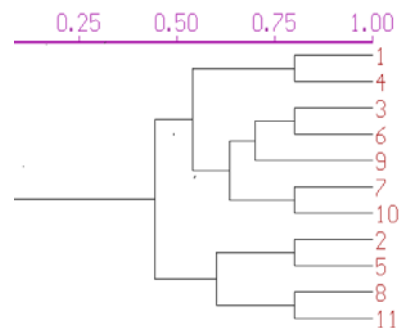
Cinquenta por cento dos isolados provenientes de *A. hypogaea* foram capazes de nodular siratro (grupos 4, 5 e 6); dentre eles, 60% foram capazes de nodular o caupi. O caupi foi nodulado, preferencialmente, por isolados provenientes de *A. hypogaea*, indicando alguma semelhança na sinalização molecular que leva à nodulação. *S. guyanensis* só foi nodulado por rizóbios isolados de nódulos de *S. guyanensis*; quatro dos oito isolados de *S. guyanensis* estudados só nodularam com *S. guyanensis*; os outros foram capazes de nodular *A. hypogaea* e dois deles nodularam também o siratro. *A. americana* foi nodulada por rizóbios isolados de *Aeschynomene* e *A. hypogaea*. Semelhante aos rizóbios de *S. guyanensis*, dois dos quatro isolados de *Aeschynomene* estudados, só formaram nódulos com *A. americana*; os outros dois foram capazes de nodular não só a *A. hypogaea*, mas também siratro.

Neste grupo de espécies estudadas a mais facilmente nodulada foi *A. hypogaea*, sendo que uma parcela dos isolados capazes de nodular *A. hypogaea* foi também capaz de nodular o siratro e, uma parcela dos que são capazes de nodular o siratro, é capaz de nodular também a *A. hypogaea* e o caupi.

A capacidade de nodular caupi desses isolados, está sempre associada à de nodular siratro e *A. hypogaea*, enquanto a capacidade de nodular siratro está sempre associada à capacidade de também nodular *A. hypogaea*. Em todos os casos parece existir uma seqüência de aquisição de genes que tornam possível a nodulação com essas leguminosas.

De acordo com a especificidade hospedeira, os grupos foram subdivididos em 11 subgrupos (Tabela 2). A similaridade entre esses subgrupos foi calculada de acordo com o índice de similaridade Simple Matching, considerando-se os isolados positivos para a nodulação como (1) e os negativos, (0); posteriormente, os isolados foram agrupados em um dendrograma utilizando-se o algoritmo UPGMA (Figura 3), no programa Ntsys (Rohlf, 1994).

O dendrograma mostra a formação de dois grupos principais, um formado por rizóbios provenientes de nódulos de *Arachis hypogaea* e de espécies de *Aeschynomene* e um segundo grupo composto apenas por rizóbios provenientes de *Stylosanthes*. A presença de genes que garantem a nodulação em *Arachis hypogaea* (subgrupos de 3 a 11) é bastante dispersa em todo o dendrograma, o que sugere que nos



**Figura 3.** Dendrograma mostrando o agrupamento entre os subgrupos de especificidade hospedeira elaborado a partir da matriz binária com o índice de similaridade SM com o algoritmo UPGMA Jaccard

**Figure 3.** Dendrogram showing grouping of subgroups of specific host elaborated from the binary matrix with índice de similarity SM with alogratim UPGMA Jaccard

**Tabela 2.** Faixa hospedeira de rizóbios isolados de nódulos de raízes de plantas de amendoim, *Stylosanthes* e *Aeschynomene* cultivadas em solos da região nordeste do Brasil, inoculados em plantas de amendoim, siratro, caupi, *Stylosanthes* e *Aeschynomene***Table 2.** Host range of isolates of root nodules of peanut plants, *Stylosanthes* and *Aeschynomene* cultivated in soils of northeast region of Brazil, inoculated in plants "siratro", cowpea, *Stylosanthes* and *Aeschynomene*

Grupos de especificidade	Planta original	Nodulação <sup>#</sup>					Subgrupos
		Amendoim	Siratro	Caupi	<i>Stylosanthes</i>	<i>Aeschynomene</i>	
1	<i>Aeschynomene</i>	N	N	N	N	S	1
1	<i>Stylosanthes</i>	N	N	N	S	N	2
1	Amendoim	S	N	N	N	N	3
2	<i>Aeschynomene</i>	S	N	N	N	S	4
2	<i>Stylosanthes</i>	S	N	N	S	N	5
4	Amendoim	S	S	N	N	N	6
3	<i>Aeschynomene</i>	S	S	N	N	S	7
3	<i>Stylosanthes</i>	S	S	N	S	N	8
5	Amendoim	S	S	S	N	N	9
6	Amendoim	S	S	S	N	S	10
7	<i>Stylosanthes</i>	S	S	S	S	N	11

<sup>#</sup> S - positivo para a nodulação; N - negativo para a nodulação

subgrupos 1 e 2 a ausência de nodulação com esta leguminosa decorre da perda do caráter genético.

A aquisição dos genes que permitem a nodulação com *Stylosanthes* parece ser uma característica diferenciada observada somente em isolados provenientes de *Stylosanthes*; o mesmo não acontece com a capacidade que permite a nodulação com *Aeschynomene* que, inclusive, foi encontrada um isolado de amendoim.

O agrupamento pelo dendrograma sugere que a presença de genes de nodulação em caupi é dependente da presença de genes de nodulação de siratro. A faixa de nodulação dos rizóbios isolados de espécies da tribo Aeschynomeneae abrange nodulação em caupi e siratro, que pertencem à tribo Phaseoleae e apresentam composição de flavonóides distintas da tribo Aeschynomeneae (Gottlieb, 1994), cujos dados revelaram que, normalmente, o caupi é considerado planta capaz de nodular ampla faixa de rizóbio do grupo tropical ou miscelânea caupi, mostra resposta limitada aos rizóbios estudados; referidos dados concordam com Rumjanek et al. (2005) que também encontraram resultados os quais sugerem que esta espécie mostra algum nível de restrição de nodulação por alguns grupos de rizóbio.

A taxonomia das espécies de rizóbio até a década de 80 foi baseada em grupos de acordo com a capacidade de nodular as diferentes espécies de leguminosas hospedeiras, tendo sido o *Rhizobium* o primeiro gênero descrito, com várias espécies reconhecidas, associadas principalmente a leguminosas de clima temperado. Após a revisão de Jordan (1982), além do gênero *Rhizobium*, passou a ser reconhecido também o gênero *Bradyrhizobium* que compreende estirpes de crescimento lento. A espécie de *B. japonicum* foi descrita como sendo capaz de nodular a soja, e um conjunto de estirpes capazes de nodular caupi e várias outras leguminosas tropicais, foram classificadas como "*Bradyrhizobium* spp" (Jordan, 1982).

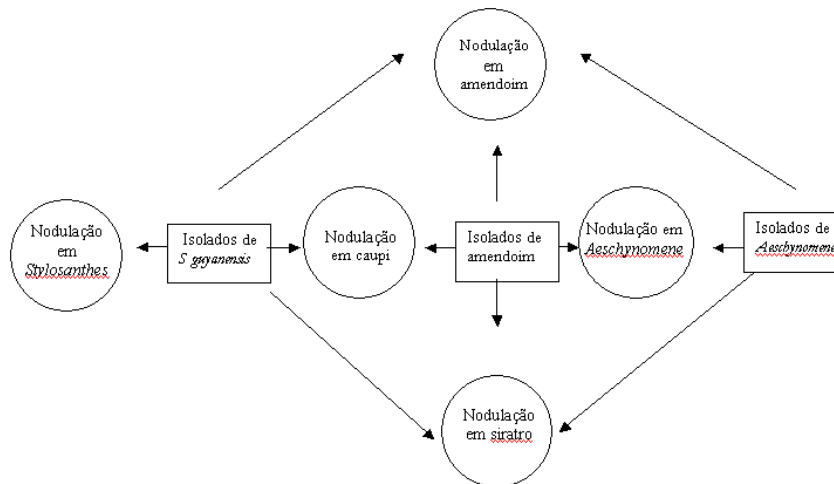
Esta classificação criou um falso conceito a respeito da

ampla dispersão dos rizóbios do grupo tropical e da faixa hospedeira ou promiscuidade das espécies de leguminosas tropicais, tais como o caupi, em relação ao microsimbionte. A medida que mais estudos são realizados, esta nomenclatura fica cada vez mais inadequada e atualmente é reconhecido que nem todas as estirpes de rizóbio do grupo tropical são capazes de nodular o caupi (Rumjanek et al., 2001).

Com os avanços das técnicas de biologia molecular, mesmo entre espécies de leguminosas originadas de clima temperado, têm sido identificadas diferenças acentuadas quanto à especificidade da associação. A partir da década de 80, foram identificadas diferenças acentuadas e, em consequência, a taxonomia dos rizóbios sofreu uma profunda revisão (Young et al., 1996). Atualmente são reconhecidos 6 gêneros: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium* e *Allorhizobium* distribuídos em 4 famílias. A perspectiva é de que alterações na taxonomia do grupo, ainda devam ocorrer, principalmente nos rizóbios que nodulam as leguminosas tropicais (Young et al., 2001; Young et al., 2005).

Os resultados encontrados nesse trabalho sugerem a existência genes de especificidade em rizóbio de caupi. A hierarquia nestes resultados para a nodulação de siratro e caupi pode auxiliar na compreensão dos grupos de especificidade. É importante que se estabeleçam estudos moleculares, dos genes da nodulação de rizóbios tropicais.

Os resultados obtidos foram esquematizados na Figura 4, na qual pode-se observar que os isolados obtidos de nódulos de raízes de amendoim (*Arachis hypogaea*) foram capazes de nodular amendoim cultivar BR-1, siratro, caupi e *Aeschynomene americana* cv. Nova Odessa. Enquanto os isolados de *Stylosanthes* foram capazes de nodular *Stylosanthes guyanensis*, amendoim, siratro e caupi. Já os isolados de *Aeschynomene* foram capazes de nodular *Aeschynomene ame-*



**Figura 4.** Esquema mostrando a capacidade de nodulação por estirpes isoladas de *Arachis hypogaea*, *Stylosanthes* e *Aeschynomene* em 5 hospedeiros

**Figure 4.** Scheme showing capacity of nodulation strains isolated from *Arachis hypogaea*, *Stylosanthes* and *Aeschynomene* in 5 hosts

*ricana*, amendoim e siratro, sendo o grupo de isolados mais restrito com relação à faixa de leguminosas hospedeiras.

## CONCLUSÕES

Os resultados revelaram a existência de 7 grupos de inoculação cruzada entre os rizóbios isolados de *A. hypogaea*, *Stylosanthes* e *Aeschynomene*;

Os isolados testados não nodularam crotalária, feijão guandu, calopogônio e nodularam de forma ineficiente a cunha, enquanto as plantas de caupi só nodularam com isolados provenientes de amendoim;

As plantas de amendoim só formaram nódulos efetivos com isolados de amendoim e os isolados provenientes de nódulos de amendoim foram capazes de formar nódulos na maioria das plantas testadas e,

Apesar da maioria dos isolados ter nodulado de forma ineficiente com amendoim e ter falhado em siratro e caupi os resultados indicaram a ocorrência de estirpes nativas com alta capacidade de fixação de  $N_2$ .

## LITERATURA CITADA

- Allen, O.N. ; Allen, E.K. The leguminosae; a source book of characteristics, uses, and nodulation. Madison: The University of Wisconsin Press, 1991. 812 p.
- Burton, J.C.(1979) Rhizobium species, Academic Press. p.29-58.SINGLETON, P.W. & Tavares, J.M. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.51, 1986. p.1013-1018.
- Chandapillai.M. M. Studies on nodulation of *Stylosanthes guyanensis* Aubi. I. Effect of added organic matter in four types of Malaysian soil. Tropical Agriculture, Trinidad, v. 49.n 3, p 205-213, 1972.

Chen,Q.; Zhang, X.; Terefework, Z.; Kaijalainen, S. LI, D.; Linstrom, K. Diversity and compatibility of peanut (*Arachis hypogaea* L.) bradyrhizobia and their host plants. Pant and Soil. 255: 605-617, 2003.

Dadarwal, K.R.; Singh, C.S. & Subba, R.A.O. Nodulation and serological studies of rhizobia form six species of *Arachis*. Plant Soil. n.40, p535-544,1974.

Date, R. A . And Norris, D.O. Rhizobium screening of *Stylosanthes* species for effectiveness in nitrogen fixation. Australian Journal Agriculture. Res. 1979.30: 85-104.

Dutta, M.; Reddy, L.J. Further studies on genetics of nonnodulation in peanut. Crop Science. Madison, Wis. Cropping Science Society of America, v.28, n.1, 1988. p60-62.

Gottlieb, O. R. Micromolecular Evolution, Systematic and Ecology. Springer Verlag, Berlim, 1994.

Holbrook CC & Stalker ht. Peanut breeding and genetic resources. Plant Breed Rev 22:297-356. 2003

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 of Systematic Bacteriology, v.32, p.136-139,1982.

Ligon, J.M.; Scholla, M.H. & Elkan, G.H. A spectrophotometric DNA-DNA hybridization technique for studying the genetic taxonomy of the Cowpea rhizobia. In: Proceedings of the 8<sup>th</sup> North American Rhizobium Conference. Edited. University of Manitoba Press, Winnipeg, Canada, p481-499, 1982.

Martins, C.M. ; Costa, Jr. J.S. Lourero, M.F.; Rumjanek, N.G. Diversidade de rizóbios de nódulos de caule e raiz das espécies forrageiras, *Diclobium* spp. e *Aeschynomene fluminensis* presentes no Pantanal Matogrossense. In: VII Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental, Anais..., Recife: 1997, p 99.

- Moretzsohn, M.C.; Leoi, L.; Proite, K.; Guimarães, P.M.; Leal-Bertioli, S.C.M.; Gimenes, M.A.; Martins, W.S.; Valls, J.F.M.; Grattapaglia, D.; Bertioli, D.J. A microsatellite-based, gene-rich linkage map for the AA genome of *Arachis* (Fabaceae). *Theoretical and Applied Genetics*, V111, pp 1060-1071, 2005.
- Nigam, S.N.; Dwivedy, S.L.; Nambiar, P.T.C.; Gibbons, R.W. Registration of jive nonnodulating peanut germ plasma lines. *Crop Science*, Madison, Wisconsin., Crop Science Society of America, v.31, n.3, p.855-856, 1991.
- Norris, D.O.T. & Mannetje, L. The symbiotic specialization of African *Trifolium* spp. in relation to their taxonomy and their agronomic use. *East African Agricultural and Forest Journal*, Nairobi, v.29, 1964. p214-235.
- Rodrigues, V. C. ; Loreiro, M. F. & Hungria, M. Caracterização fonotípica e genética de rizóbios isolados de nódulos e caules de *Aeschynomene* sp. In: XXIV Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas. VIII Reunião Brasileira Sobre Micorrizas. VI Simpósio Brasileiro de microbiologia do solo. III Reunião Brasileira de Biologia do solo. Biodinâmica do solo fertbio 2000. Resumo... Santa Maria RG, 22 a 26 de novembro de 2000.
- Rohlf, F.J. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 1.80. New York: Exeter Software, 1994.
- Rumjanek, N.G.; Martins, L.M.V.; Xavier, G.R.; Neves, M.C.P. Fixação biológica de nitrogênio. In: Freire Filho, F.R.; Lima, J.A.A.; Ribeiro, V.Q. (Eds). *Feijão-caupi: avanços tecnológicos*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p.279-335, 2005
- Sá, N.M.; Scotti, M.R. M.R.; Vargas, M.; e Dobereine, J. Resistência Natural à estreptomicina e Eficiência de estirpes de *Rhizobium* nativas nos Cerrados associadas a *Stylosanthes*. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília 1983.
- Saleena, L. M.; Loganathan, P.; Rangaran, S.; Nair, S. Genetic diversity of Bradyrhizobium strains isolate from *Arachis hypogaea*. *Canadian Journal of Microbiology*. 47:118-122, 2001
- Sanginga, N.; Wirkom, L.E.; Okogum, A.; Akobundu, I.O.; Carsky, G. Tian, G. Nodulation and estimation of symbiotic nitrogen fixation by herbaceous and shrub legumes in Guinea savana in Nigeria *Biology and Fertility of Soils*. 23:442-448, 1996.
- Taurian, T. Ibañez, F. Fabra, A. & Aguilar, O. M. Genetic diversity of rhizobia nodulating *Arachis hypogaea* L. in Central Argentinean Soils. *Plant and Soil*, 282:41-52, 2006
- Thies, J.E.; Bohlool, B.B.; Singleton, P.W. Subgroups of de Cowpea miscellany: symbiotic specificity within Bradyrhizobium spp. for *Vigna unguiculata*, *Phaseolus lunatus*, *Arachis hypogaea* and *Macroptilum atropurpureum*. *Applied Environmental Microbiology*. 57:1540-1545, 1991.
- Vargas, M. A.T.; Suhel, A.R.; Mendes, I de C.; Pres, J.R.R. Fixação Biológica de Nitrogênio em solos de Cerrados. EMBRAPA- CNAC-SP 1- 83p, 1994.
- Vincent, J.M. A Manual for the Pratical Study of Root Nodule Bacteria. Scientific Publications Oxford: Blacwell Scientific, 1970, 164p.
- Wong, C.H.; Patchamuthu, R. Rhizobia in Tropical legumes: Ineffective nodulation of *Arachis hypogaea* L. by Fast-Growing stains. *Soil Biology Biochemistry*, v.20, n.5, p677-688, 1988.
- Xavier, G. R.; Martins, L. M. V. ; Rumjanek, N. G. ; Freire Filho, F. R. . Variabilidade genética de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) através da técnica de RAPD. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 40, n. 4, p. 353-359, 2005
- Xavier G.R.; Martins, L.M.V.; Ribeiro, J.R.A.; Gouvêa, N.G., Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. *Caatinga*, v.19, n.1, p.25-33, 2006.
- Yang, J.K.; Xie, F.L.; Z, J.; Zhou, Q. Zhou, J.C. Polyphasic characteristics of bradyrhizobia isolated from nodules of peanut (*Arachis hypogaea* L.) in China. *Soil Biology & Biochemistry*. 37: 141-153, 2005.