

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

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

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

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

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

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

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

# Diversidade de rizóbios capazes de nodular leguminosas tropicais<sup>1</sup>

## RESUMO

Em geral, leguminosas tropicais são capazes de formar nódulos com uma ampla faixa de rizóbios, o que contribui significativamente para o aumento da atividade da fixação biológica de nitrogênio. Objetivou-se no presente trabalho, estudar a faixa hospedeira do grupo conhecido genericamente como *Rhizobium*, rizóbio tropical ou grupo miscelânea caupi, como estratégia para a obtenção de um inoculante eficiente para a cultura do amendoim. Sete espécies de leguminosas pertencentes à tribo Aeschynomeneae foram usadas como planta isca de rizóbio, em amostras de solos do estado de Pernambuco, no Nordeste do Brasil. Rizóbios foram isolados de nódulos de *Arachis hipoeaea*, *A. villosulicarpa*, *Stylosanthes guyanensis*, *S. scabra*, *Aeschynomene americana*, *A. paniculata* e *A. hystrix*. Fez-se a caracterização fenotípica dos isolados, quanto ao tempo de crescimento, reação de pH em meio de cultura, morfologia, tamanho, cor, elevação e transparência das colônias, características, quantidade e tipo de muco produzido. Esta caracterização fenotípica identificou 44 grupos de rizóbios; esses dados foram usados para estimar a diversidade da população de rizóbio presente nas amostras de solos coletadas sob diferentes coberturas vegetais e sob diferentes manejos, com uso dos índices de diversidade Shanon e Weaver e riqueza de Margalef. Os resultados revelaram que o solo sob vegetação nativa (caatinga) mostrou maior diversidade de rizóbio que o solo sob cultivo.

**Palavras-chave:** tribo Aeschynomene, características fenotípicas de rizóbio, fixação biológica do nitrogênio

## Diversity of rhizobiuns capable of forming nodules tropical legumes

## ABSTRACT

Tropical legume species are generally capable of forming nodules with a broad rhizobium range, which contributes significantly to biological nitrogen fixation activity. This work had the objective of studying the host range of *Rhizobium* group generally referred as tropical rhizobia or miscellanea cowpea group and design strategies for obtaining an efficient inoculant for peanut. Seven species within the Aeschynomeneae tribe were used as host plant for rhizobia present in soil samples from Pernambuco State located in the North-east region of Brazil. Rhizobia were isolated from nodules of *Arachis hipoeaea*, *A. villosulicarpa*, *Stylosanthes guyanensis*, *S. scabra*, *Aeschynomene americana*, *A. paniculata* and *A. hystrix* and characterized regarding growth ratio, pH change of culture medium and colony morphology parameters: size, appearance, color, elevation, transparency, form and mucous type and quantity. The phenotypical characterization resulted in the identification of 44 groups. These data were used for estimating diversity indices related to the *Rhizobium* population present in soil samples under different vegetation and/or management. Shanon and Weaver diversity index and Margalef index indicated that soil covered by native vegetation (caatinga) showed a more diverse rhizobia population than the soil under peanut cultivation.

**Key words:** Aeschynomene tribe, phenotypic rhizobium characteristics, biological nitrogen fixation

<sup>1</sup> Departamento de Agronomia - Área de Solos

<sup>2</sup> Embrapa Centro d Agrobiologia- Laboratório de ecologia molecular microbiana

## INTRODUÇÃO

A biodiversidade do solo é responsável pela estabilidade e resiliência do ecossistema, haja vista estar ligada, direta ou indiretamente, a processos de formação do solo, ciclagem e armazenamento de nutrientes. A melhor compreensão da diversidade da microbiota do solo pode propiciar desenvolvimento de estratégias que permitam a otimização dos processos biológicos que, por sua vez, visem aumentar a sustentabilidade dos agrossistemas (Odum, 1988). O conceito de diversidade de espécies pode ser avaliado por meio de dois componentes: (1) riqueza das espécies, baseada no número total de espécies presentes, e (2) uniformidade, baseada na abundância relativa de espécies e no grau de dominância (Odum, 1988). Vários índices de diversidade têm sido propostos buscando-se entender como determinada comunidade de microrganismos se comporta frente a impactos ou estresses ambientais causados por fenômenos naturais ou pela interferência do homem. Entre os mais usados atualmente se encontram os índices de: Simpson (1949), Margalef (1958) e Shannon & Weaver (1949). A aplicação desses índices revela o grau de diversidade ecológica de diferentes sistemas visto que, quanto maior for a diversidade de um ecossistema, maior também será sua estabilidade (Kennedy, 1999).

Por outro lado, o estudo da diversidade das bactérias baseado em características culturais, envolve a avaliação de parâmetros, como o tempo que as bactérias levam para formar colônias individuais em meio de cultura, o diâmetro das colônias, a forma, a cor, a produção de ácido e álcali e a produção de muco, dentre outros. Esses métodos fenotípicos de análise de características culturais de microrganismos possuem a vantagem de serem rápidos, permitindo uma análise prévia da diversidade e oferecendo vantagens em relação aos métodos genotípicos, na obtenção de microrganismos isolados que poderão ser armazenados e usados posteriormente.

No presente estudo teve-se como objetivo o isolamento e a avaliação da diversidade cultural de rizóbios isolados de nódulos de espécies de *Arachis*, *Stylosanthes* e *Aeschynomene* pertencentes à tribo Aeschynomeneae, cultivadas em amostras de solo coletadas no Estado de Pernambuco.

## MATERIAL E MÉTODOS

Coletaram-se amostras de solo da Zona da Mata (Goiana), Agreste (Caruaru) e Sertão (Serra Talhada) do estado de Pernambuco, com diferentes coberturas vegetais, cujas características estão descritas nas Tabelas 1 e 2, e se utilizaram, como plantas-isca, *Arachis hypogaea* (cultivares BRS 151 L-7, BR-1, cultivar Engenho Umbu, IAC-886; IAC- 8112; IAC- 5; IAC Jumbo; IAC Caiapó e IAC Tatu), *Arachis villosulcarpa* (espécie silvestre), *Stylosanthes guyanensis* (cultivar Bandeirantes), *Stylosanthes scabra* (cultivar Seca), *Aeschynomene americana* (cultivar Nova Odessa, *Aeschynomene paniculata* (cultivar IZ-No-SP), *Aeschynomene histrix* (cultivar CIAT-8225).

Antes do plantio as sementes foram desinfetadas com álcool etílico e hipoclorito de sódio. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, usando-se vasos de Leonard com areia esterilizada. As plantas de *Arachis* foram coletadas aos 42 dias após a emergência (dae) e as de *Stylosanthes* e *Aeschynomene*, aos 60 dae. O isolamento dos rizóbios se deu de acordo com a metodologia de Fred e Waksman (1928). A caracterização morfológica dos rizóbios isolados foi adaptada de Vicent (1970). Para cada um dos isolados se consideraram: tempo de crescimento; pH; tamanho; forma; borda; transparência e cor da colônia, além da produção de muco. A partir dessa caracterização se agruparam os isolados obtidos por 6 das características que mais os diferenciavam: tempo de crescimento (dia), reação de pH do meio de cultura, tamanho das colônias (mm), tipo de muco, elevação das colônias e cor das colônias.

Os resultados do agrupamento morfológico serviram como para os cálculos da diversidade dos rizóbios nos diferentes solos e plantas utilizadas; para isto, cada grupo morfológico foi considerado como um *táxon*. Utilizaram-se os índices de diversidade de Shannon-Weaver (1949), dominância de Simpson (1949), riqueza de Margalef (1958) e uniformidade de Pielou (1959). Para o cálculo desses índices considerou-se N o número total de indivíduos, S o número total de grupos e  $p_i$  é a frequência observada do enésimo indivíduo em cada grupo, em relação ao número total de grupos (Zak, 1994; Kennedy, 1999).

Tabela 1. Identificação e análise química das amostras de solo

Table 1. Identification and chemical analyses of soil samples

Solo	Local	Cobertura vegetal	Complexo sortivo (cmol. dm <sup>-3</sup> )							P (mg kg <sup>-1</sup> )
			pH (H <sub>2</sub> O)	Ca <sup>2+</sup>	Al <sup>3+</sup>	H <sup>+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	
1	Caruaru (estação experimental do IPA)	cultivo de amendoim	6,0	0,86	0,15	3,80	0,83	48	182	112
2	Serra Talhada (estação experimental do IPA)	cultivo de <i>Stylosanthes</i> sob pastejo de caprinos	7,5	4,68	0,05	-	1,61	37	181	93
3	Serra Talhada (pequeno produtor)	cultivo de amendoim em rotação feijão, milho e melancia	8,0	2,01	0,05	-	1,10	61	110	10
4	Serra Talhada (campus UFRPE)	plântio de <i>Leucaena leucocephala</i> e <i>Mimosa caesalpinifolia</i>	6,48	1,46	0,10	2,70	1,27	20	148	08
5	Serra Talhada	vegetação nativa (caatinga)	7,11	4,95	0,10	-	1,00	37	180	53
6	Goiana (estação experimental do IPA)	cultivo de amendoim	4,50	2,00	1,50	3,00	1,80	0	86	5
7	Goiana (pequeno produtor)	cultivo de amendoim	5,00	2,50	1,00	3,00	2,00	0	80	3

Tabela 2. Análise física das amostras de solo coletadas

Table 2. Physical analysis of soil samples

Solo	Areia grossa	Areia fina	Silte	Argila	Condutividade hidráulica (cm/h)	Porosidade	Água disponível	Grau de floculação
	%							
1	52,68	22,07	11,92	13,33	0,36	2,67	3,44	44,30
2	36,73	31,35	15,92	16,00	0,41	2,06	3,88	66,66
3	2,06	78,02	9,92	10,00	0,50	19,11	2,04	73,39
4	33,01	43,4	15,25	8,33	0,42	9,45	2,45	73,65
5	39,20	28,88	15,92	16,00	0,47	5,58	3,73	70,85
6	25,00	50,00	10,00	5,00	0,28	20,12	2,06	71,23
7	30,00	55,00	15,00	10,00	0,25	19,23	2,12	72,21

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obteve-se o total de 433 isolados de rizóbios, através de nódulos de espécies de *Arachis*, *Stylosanthes* e *Aeschynomene*. Cerca de 90% dos isolados formaram colônias em até 2 dias de crescimento a 28° C, o que caracteriza estirpes de crescimento rápido (Jordan, 1984).

Esta predominância de isolados de crescimento rápido contrasta com o conhecimento corrente de que os rizóbios que nodulam amendoim pertencem ao gênero *Bradyrhizobium* spp que por sua vez compreende, geralmente, estirpes de crescimento lento e são capazes de alcalinizar o meio de cultura (Thies et al., 1991); este, entretanto, não foi um comportamento predominante nos isolados obtidos, visto que os dados sugerem que, dentre os grupos de rizóbio que nodulam essas leguminosas, existem grupos significativos de isolados diferentes do que tem sido definido como *Bradyrhizobium* spp. Os rizóbios que formaram colônias após 2 dias de crescimento tiveram a capacidade de alcalinizar o meio, dependente da planta. Para os isolados de *Arachis* esta característica esteve presente em menos de 50% dos isolados, enquanto para *Stylosanthes* e *Aeschynomene*, cerca de 80% dos isolados alcalinizaram o meio de cultivo (Figura 1).

Para Norris (1965) os rizóbios de crescimento lento que alcalinizam o meio são uma forma ancestral e estão associados a leguminosas tropicais que apresentam baixa eficiência

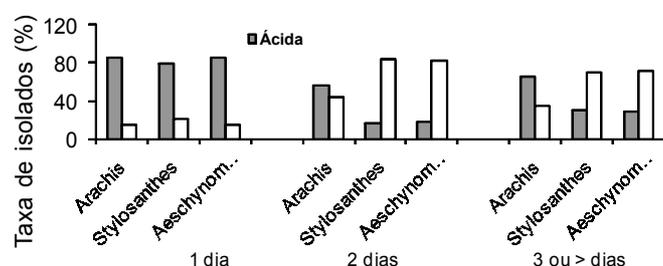


Figura 1. Alteração do pH em meio de cultura de rizóbios isolados de nódulos de espécies de *Arachis*, *Stylosanthes* e *Aeschynomene*, cultivadas em solos da região Nordeste do Brasil, em função das espécies utilizadas

Figure 1. pH in rhizobium culture medium isolated from nodules of *Arachis*, *Stylosanthes* e *Aeschynomene*, species cultivated in soils of northeast region of Brazil, as a function of species utilized

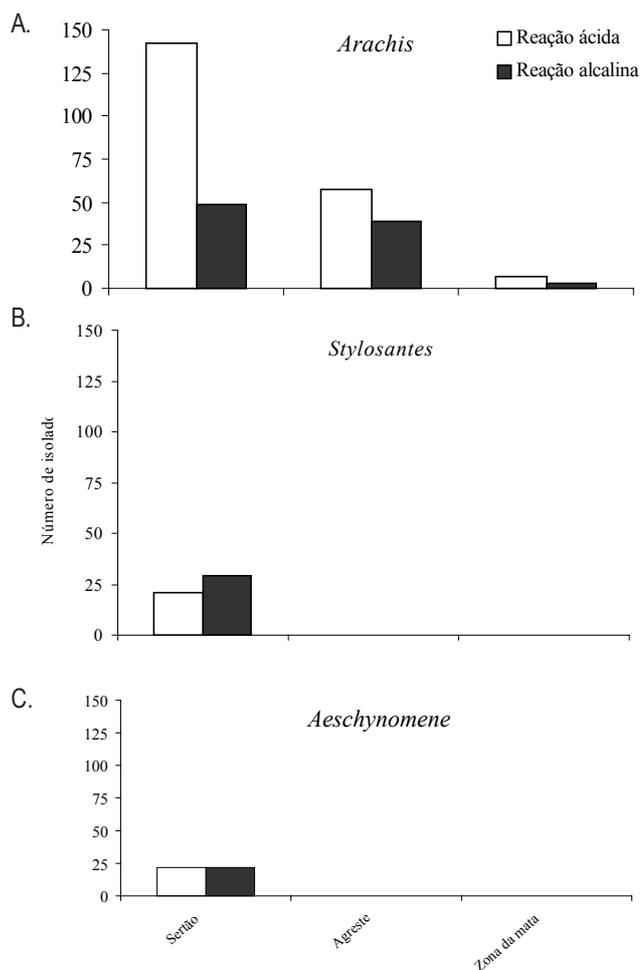
simbiótica e habitam solos ácidos de baixa fertilidade; já os rizóbios de crescimento rápido, que acidificam o meio, são mais eficientes e apresentam maior especificidade hospedeira, colonizam solos neutros a alcalinos, enquanto para Stamford *et al.* (1996) a ocorrência de rizóbio de crescimento lento ou rápido parece estar relacionada a aspectos também relacionados com a variação do pH dos solos. Esses autores isolaram rizóbios de caupi, soja e jacatupé em amostras de solos da Zona da Mata e da região semi-árida de Pernambuco e constataram que 90% dos isolados da região semi-árida apresentaram crescimento rápido enquanto 100% dos isolados da Zona da Mata mostraram crescimento lento.

Os resultados obtidos estão de acordo com Sprent (1994), confirmando que os rizóbios de crescimento rápido são mais comuns em regiões áridas, constituindo esta característica uma estratégia de sobrevivência, já que são mais tolerantes à seca que os de crescimento lento e se multiplicam rápido, em curto espaço de tempo úmido (Van Gestel *et al.* 1991), o que explicaria sua maior frequência nos solos das regiões semi-áridas (Martins 1997).

Apesar da preferência das plantas de amendoim por solos alcalinos e com boa fertilidade (Rosseto, 1993), estas foram capazes de formar nódulos nos solos das três regiões estudadas enquanto as plantas de *Stylosanthes* e *Aeschynomene* só formaram nódulos com rizóbios presentes nos solos do Sertão (Figuras 3A, 3B e 3C). Martins (1996) observou uma ocorrência maior de rizóbios que não alteraram o pH do meio de cultura nos solos do Sertão, em que o pH, varia de neutro a alcalino, em comparação com as áreas da Zona da Mata, com predominância de solos ácidos; observou, também, que a mudança do pH do meio de cultura pelos rizóbios isolados de caupi da região semi-árida, foi independente da velocidade do crescimento da bactéria o que corrobora os resultados encontrados nesta pesquisa, para os rizóbios isolados de *Arachis*, *Stylosanthes* e *Aeschynomene*.

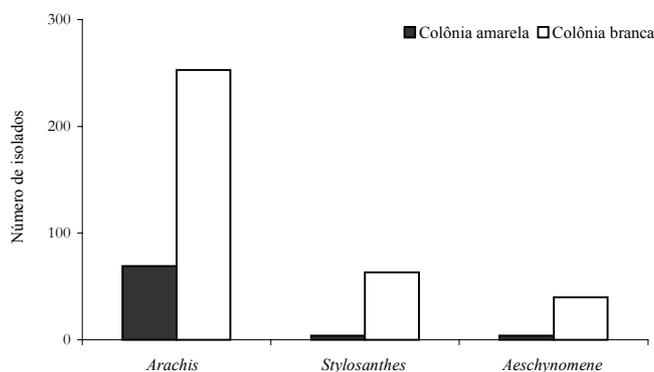
Segundo Jordan (1984), os rizóbios podem desenvolver colônias de cor branca, amarela e rósea. Como se observa na Figura 4, os isolados de *Stylosanthes* e *Aeschynomene* desenvolveram colônias apenas com cor branca, porém os de *Arachis* formaram 75% das colônias de cor branca e 25% de cor amarela.

Colônias de rizóbios muito pequenas (<1mm de diâmetro) são classificadas como puntiformes e estão, geralmente rela-



**Figura 2.** Alteração do pH em meio de cultura de rizóbios isolados de espécies de *Arachis* (A), *Stylosanthes* (B) e *Aeschynomene* (C), cultivadas em solos da região Nordeste do Brasil, em função da Região fisiográfica.

**Figure 2.** pH change in rhizobium culture medium isolated from the species of *Arachis* (A), *Stylosanthes* (B) and *Aeschynomene* (C), cultivated in soils of northeast region of Brazil, as a function of physiographic region



**Figura 3.** Cor de colônia em meio YMA de rizóbios provenientes de nódulos de espécies de *Arachis*, *Stylosanthes* e *Aeschynomene*, cultivadas em solos do Nordeste do Brasil

**Figure 3.** Color of colony in YMA medium of rhizobium from the nodules of species of *Arachis*, *Stylosanthes* and *Aeschynomene*, cultivated in soils of northeast region of Brazil

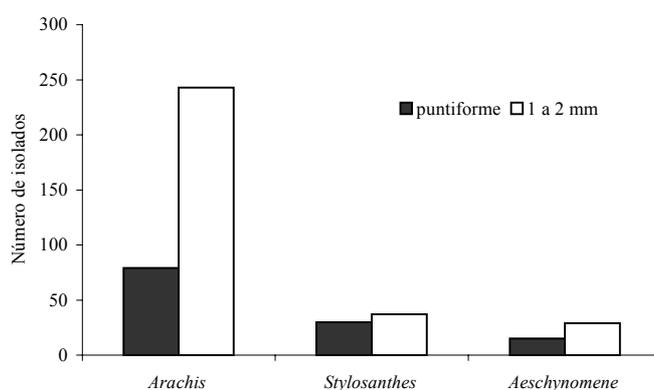
cionadas a bactérias que não produzem muco mas, apresentam superfície seca. Colônias com diâmetro entre 1 a 2 mm são as mais comuns.

Observa-se, na Figura 5, que a maioria dos rizóbios de *A. hypogaea* (76%) apresentou colônias de 1 a 2 mm, enquanto 24% eram puntiformes; em média, 60% dos isolados de *Stylosanthes* e *Aeschynomene* indicaram colônias com diâmetro entre 1 a 2mm.

Rizóbios com colônias pequenas e secas formam simbioses bastante eficientes na cultura da soja; em alguns casos, a eficiência chega a ser até 10 vezes maior que a de isolados com colônias grandes e mucóides (Kuykendal e Elkan, 1976). Xavier et al. (1998) observaram que os rizóbios produtores de muco apresentam maior tolerância a altos níveis de alumínio, sugerindo maior capacidade de sobrevivência e maior competitividade na rizosfera, contribuindo na ineficiência e na formação de nódulos em solos álicos. Coutinho et al. (1999) também sugeriram que a produção de muco pode representar um mecanismo envolvido no processo de adaptação e sobrevivência dos rizóbios, em diferentes condições edafo-climáticas.

Nos estudos de Sinclair e Eaghesham (1990) ficou demonstrado que as estirpes que formam muco são mais eficientes em fixar  $N_2$  que as estirpes do tipo seca, sob condições salinas. Hollingworth et al. (1985) estudando rizóbios isolados de caupi, constataram maior produção de muco quando as bactérias foram submetidas a temperatura elevada ( $42^\circ C$ ). Maior produção de muco foi correlacionada por Martins et al (1997) com maior tolerância às condições de salinidade do solo e resistência intrínseca a antibióticos de rizóbios isolados de nódulos de caupi cultivados em solos do Nordeste.

As estirpes de crescimento rápido, produzem, de maneira geral, mais muco que as de crescimento lento (Campelo, 1976). O muco produzido pode apresentar-se com várias consistências (Martins, 1996). Xavier et al. (1998) definiram 2 tipos principais: Tipo I, que compreende um tipo de muco que coalesce no meio de cultura, denominado viscoso e associado a



**Figura 4.** Tamanho da colônia em meio YMA de rizóbios provenientes de nódulos de espécies de *Arachis*, *Stylosanthes* e *Aeschynomene*, cultivadas em solos do Nordeste do Brasil

**Figure 4.** Size of colony in YMA medium of rhizobium from the nodules of species of *Arachis*, *Stylosanthes* and *Aeschynomene*, cultivated in soils of northeast region of Brazil

colônias planas, e tipo II, que não coalesce, forma colônias bem individualizadas e elevadas, denominado butírico.

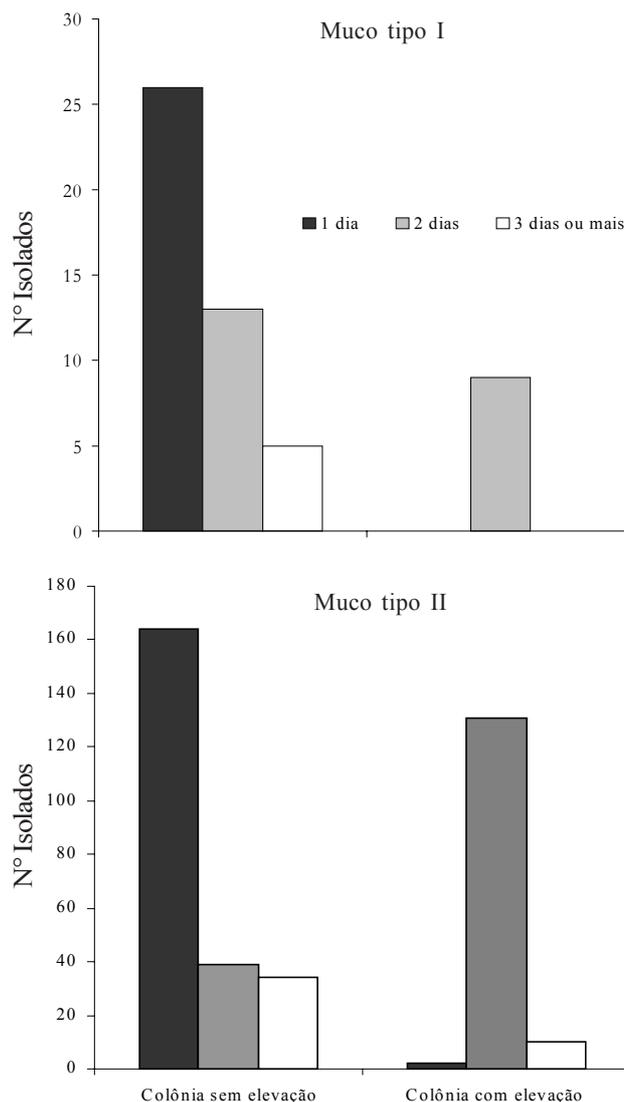
Os isolados obtidos apresentaram muco representativo dos dois tipos principais descritos por Xavier *et al.* (1998). O tipo mais comum foi o II, produzido por isolados que formam colônia em 1, 2, 3 ou mais dias. Entre os isolados que apresentam muco do tipo II chama a atenção o grupo que apresentou colônias planas, sem elevação, o que não está de acordo com a definição deste tipo de muco (Xavier *et al.* (1998). As colônias que mostraram muco do tipo I, geralmente formaram colônias planas mas também houve muco do tipo I com colônia elevada, o que foge à definição desse grupo (Figura 6)

A Figura 6 mostra o comportamento dos isolados de nódulos de *Arachis*, *Stylosanthes* e *Aeschynomene* que produzem muco tipo II, de acordo com a alteração do pH do meio de cultura.

A partir da caracterização morfológica, os isolados foram agrupados pelas 6 características que mais os diferenciavam: tempo de crescimento (dias), reação do pH em meio de cultura (reação ácida e alcalina), tamanho das colônias (mm), tipo de muco (I e II), elevação da colônia (plana e elevada) e, finalmente, a cor desenvolvida pelas colônias (branca e amarela). Esta classificação permitiu a formação de 44 grupos, dados que mostram haver populações nativas diferentes de rizóbio, que parecem ser influenciadas pelo tipo de manejo e por fatores climáticos. De modo geral, os isolados que apresentaram crescimento em apenas um dia, com reação ácida em meio de cultura e produtores de muco do tipo II, foram obtidos dos solos do sertão, sugerindo maior capacidade de adaptação a essas condições. É provável que essas características sejam fundamentais para a sobrevivência e eficiência de rizóbios em regiões tropicais áridas.

Os solos amostrados na região semi-árida, tanto sob vegetação de caatinga quanto cultivados, apresentaram maior riqueza e menor dominância de grupos morfológicos de rizóbios, de acordo com os índices de Margalef e Simpson, que os solos amostrados na Zona da Mata (Figura 7), além de mostrar maior abundância e uniformidade, segundo os índices de Shannon e Weaver e Pielou (Tabela 4).

A região semi-árida possui características peculiares, estando toda a sua biodiversidade em condições de constante estresse, seja de temperatura ou de baixa precipitação pluviométrica. Essas condições podem afetar a sobrevivência e a eficiência dos rizóbios desse ecossistema e é possível que a alta diversidade observada seja uma indicação da capacidade do sistema de manter o grupo funcional sob condições de estresse; portanto, a grande diversidade de rizóbios encontrada nessa região, obtida a partir das espécies usadas como plantas isca, sugere estabilidade dos solos da referida região quanto à fixação de N<sub>2</sub>, tolerando seus estresses; isto pode ser resultado de um processo de adaptação dos rizóbios juntamente com a grande diversidade de leguminosas nativas da caatinga.



**Figura 5.** Produção de muco em rizóbio proveniente de nódulos de espécies de *Arachis*, *Stylosanthes* e *Aeschynomene*, de acordo o tempo de crescimento em meio de cultura. (A), isolados produtores de muco do tipo I e (B), tipo II

**Figure 5.** Production of mucuos in rhizobium from the nodules of species of *Arachis*, *Stylosanthes* e *Aeschynomene* and species

A literatura se refere a poucos trabalhos sobre a diversidade de rizóbio nesse ecossistema de mata atlântica; entretanto, alguns estudos retratam uma baixa diversidade de rizóbio, geralmente associada ao desmatamento (Ribeiro *et al.*, 2000).

Evidências indicam que a comunidade de rizóbio parece sofrer diretamente com o impacto ambiental causado pelo desmatamento e pela atividade agrícola, uma vez que sugere existir correlação muito alta entre a diversidade vegetal e a diversidade microbiana do solo. Silva (1998), estudando a diversidade de rizóbio em áreas sob diferentes coberturas vegetais na região da Amazônia, encontrou a maior diversidade de rizóbio na área de mata nativa clímax e área de mata secundária com 18 anos de recuperação e sugeriu que estudos

**Tabela 3.** Diversidade de rizóbios pelos índices de abundância Shannon e Weaver, riqueza de Margalef, dominância de Simpson e uniformidade de Pielou, dos solos amostrados na Zona da Mata, Agreste e Sertão de Pernambuco, com diferentes coberturas vegetais e sistemas de cultivo

**Table 3.** Diversity of rhizobium by indices of abundance Shannon and Weaver, richness of Margalef, dominance of Simpson and uniformity of Pielou of soils sampled in different regions of Pernambuco with different vegetation cover and cultivation systems

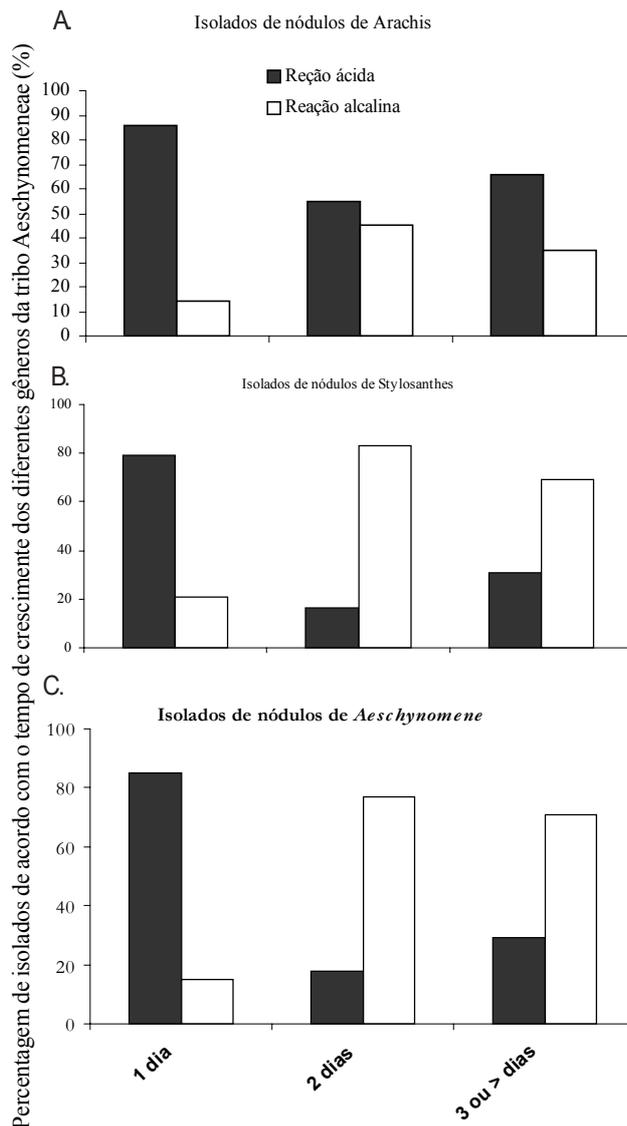
Cobertura vegetal- região	Índices*	
	Shannon-Weaver	Pielou
Solo 1: Amendoim -Agreste	3,76	2,80
Solo 2: <i>Stylosanthes</i> -Sertão	3,33	2,56
Solo 3: Amendoim comercial -Sertão	3,69	2,88
Solo 4: Leucena + Sabiá -Sertão	3,61	2,88
Solo 5: Caatinga sob nativa -Sertão	3,78	2,67
Solo 6: Amendoim -Zona da Mata	2,12	2,06
Solo 7: Amendoim -Zona da Mata	2,18	2,58

\* Índice de abundância de Shannon e Weaver ( $H = -\sum p_i \log_2 p_i$ ) e índice de uniformidade de Pielou ( $e = \frac{1}{\sum p_i \log_2 p_i / \log S}$ ), em que: S é número total de grupos e  $p_i$  é a frequência observada de cada população (Odum, 1988; Magurran, 1988)

sobre a população de rizóbios nativos podem ser utilizados como indicador da qualidade do solo. Coutinho *et al.* (1999) usaram o índice de Shannon e Weaver para estudar a diversidade de rizóbio em solos cultivados com soja e notaram que a conversão de pastos com *Brachiaria decumbens* em cultivo convencional de soja causou baixa diversidade nos rizóbios capazes de nodular o feijão guandu (*Cajanus cajan*). Zilli (2000) observou que a diversidade do rizóbio capaz de nodular caupi também foi reduzida quando a vegetação nativa do cerrado foi retirada e substituída pelo cultivo da soja, evidenciando os efeitos deletérios da monocultura sobre a diversidade de rizóbios.

Observou-se que, de maneira geral, a introdução de cultivos induz a uma redução na diversidade dos rizóbios. Os solos da Zona da Mata sob cultivo de amendoim apresentaram uniformidade de grupos morfológicos de rizóbios, o que revela grande dominância de poucos tipos morfológicos, sugerindo a ocorrência de seleção de populações específicas de rizóbios, em consequência da presença das leguminosas. A influência da leguminosa na população de rizóbio é um fato comum e tem sido indicada como o fator mais importante para a composição da comunidade de rizóbio no solo (Woomer *et al.*, 1988 e Zilli, 2000).

Outro fator significativo a ser considerado no comportamento da diversidade dos microrganismos, é a fertilidade dos solos, uma vez que o número de rizóbios no solo está diretamente relacionado a fatores bióticos e abióticos, tais como clima, fertilidade do solo, cobertura vegetal, presença de leguminosas nativas ou introduzidas (Franco e Neves, 1992). A maioria dos solos coletados na região semi-árida apresentou boa fertilidade, com pH acima de 6,0 o que foi acompanhado de níveis baixos de Al e bons níveis de P em pelo menos 3 das 5 amostras coletadas na região. Este perfil pode ter favorecido o desempenho da população de rizóbio no local. Os solos coletados na região da Zona da Mata foram caracterizados como ácidos (pH < 5), com alto teor de Al e baixo P.

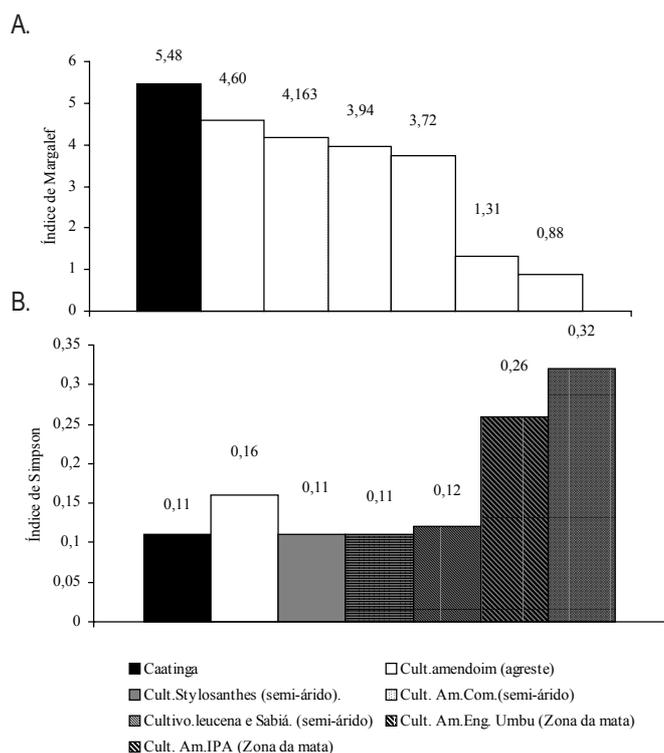


**Figura 6.** Reação ácida e alcalina observada em meio de cultura inoculado com rizóbios que formam colônias de 1 a 7 dias em meio de cultura produtoras de muco do tipo II, isolados de espécies de *Arachis*, (A), *Stylosanthes* (B) e *Aeschynomene* (C) cultivada em solos da região Nordeste do Brasil

**Figure 6.** Observed acid and alkaline reaction in culture medium inoculated with rhizobium which formed colonies of 1 to 7 days in culture medium producer of mucuons of type II isolated from species of *Arachis*, (A), *Stylosanthes* (B) and *Aeschynomene* (C), cultivated in soils of northeast region of Brazil

Com relação às cultivares utilizadas, a Figura 9 revela que a *Arachis hypogaea* foi a espécie que teve a capacidade de reconhecer e nodular, com a maior diversidade de grupos de rizóbios, nativos da região do Nordeste do Brasil pelo índice de Margalef.

De maneira geral, as espécies utilizadas apresentaram comportamento diferenciado em relação à capacidade de formar nódulos com os diferentes grupos morfológicos presentes na população nativa. Entre as espécies de *Arachis*, *A. hypogaea* nodulou com uma diversidade maior de rizóbio que *A. villosulcarpa*. Entre as espécies de *Stylosanthes*, a *S. guyana*



Índice de diversidade de riqueza de Margalef, (DMG=S-1/lnN), e dominância de Simpson (c=Σ(pi)²). N é o número total de indivíduos, S o número total de grupos e pi a frequência relativa dos grupos.

Figura 7. Índice de riqueza de Margalef (A) e Índice de dominância de Simpson (B) de rizóbios isolados de nódulos de espécies de *Arachis*, *Stylosanthes* e *Aeschynomene*, cultivadas em solos da região Nordeste do Brasil.

Figure 7. Index of richness of Margalef (A) and index of dominance of Simpson (B) of rhizobium isolated from nodules of species *Arachis*, *Stylosanthes* and *Aeschynomene*, cultivated in soils of northeast region of Brazil

*ensis* nodulou com diversidade maior de rizóbios que a *S. scabra*. Entre as espécies de *Aeschynomene*, *A. americana* nodulou com diversidade maior que *A. paniculata* e *A. his-trix*, dados que sugerem que, apesar dessas leguminosas nodularem com rizóbio tropical, elas restringem alguns grupos e selecionam outros, indicando diferentes níveis de especificidade das associações planta x bactéria.

Calculou-se, também, o índice de riqueza de grupos morfológicos de rizóbio isolados das cultivares de *A. hypogaea* (Figura 10). Os dados revelam comportamento bastante diferenciado na nodulação de grupos diversificados de rizóbios também entre cultivares de uma mesma espécie. As cultivares Engenho Umbu, IAC-5, BR 1 e Caiapó, foram as que apresentaram os maiores índices de riqueza de rizóbios, enquanto as L7 e Tatu, mostraram os menores índices de riqueza de rizóbio pelo índice de Margalef, além de cultivares com alto grau de especificidade, indicando um potencial para a seleção de cultivares que permitam a otimização da atividade de FBN através da inoculação com estirpes eficientes específicas.

Em ambiente limitado, como a região semi-árida, é preferível o uso de plantas leguminosas com capacidade de reconhecer uma quantidade maior de grupos de rizóbios para que, juntos, macrossimbionte e microssimbionte possam garantir os benefícios da fixação simbiótica do N<sub>2</sub>, mesmo que alguns

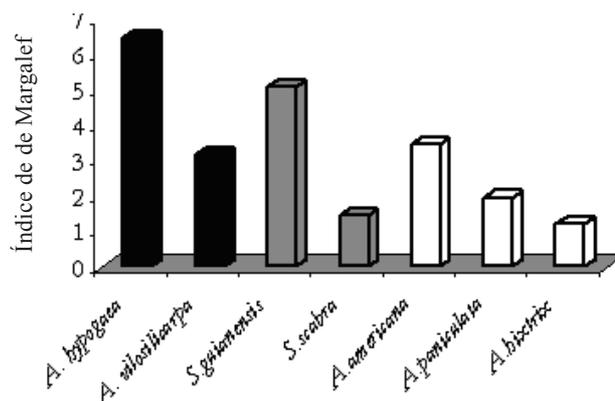


Figura 8. Valores de índices de riqueza de Margalef de rizóbios isolados de nódulos de espécies de *Arachis*, *Stylosanthes* e *Aeschynomene* cultivadas em solos da região Nordeste do Brasil

Figure 8. Values of index of richness of Margalef of rhizobium isolated from nodules of species of *Arachis*, *Stylosanthes* e *Aeschynomene*, cultivated in soils of northeast region of Brazil

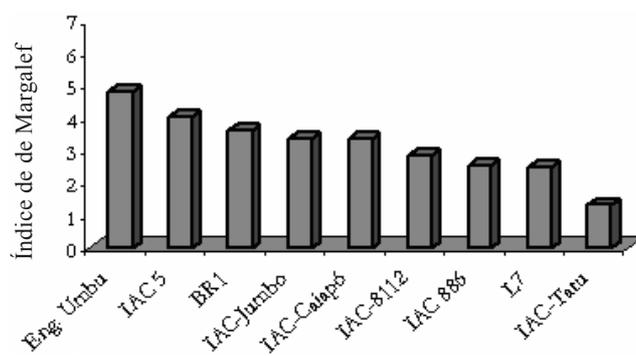


Figura 9. Valores de índices de riqueza de Margalef de rizóbios isolados de nódulos de cultivares de *Arachis hypogaea* cultivadas em solos da região Nordeste do Brasil

Figure 9. Values of index of richness of Margalef of rhizobium isolated from nodules of cultivars of *Arachis hypogaea* cultivated in soils of northeast region of Brazil

grupos apresentem baixa eficiência. As plantas de amendoim, além de reconhecerem uma diversidade maior de tipos morfológicos de rizóbios, possuem certas características que as elegem como cultura promissora para a região semi-árida, como folhas pequenas, baixa relação parte aérea, raiz e ciclo curto. Essas características são consideradas, por Pimentel (1999) essenciais para a adaptação de plantas em condições climáticas, como as encontradas na região semi-árida; além disso, os cotilédones dessas plantas são bastante persistentes e ricos em reservas, garantindo sua nutrição por um período relativamente longo e, quando os cotilédones caem, os nódulos já estão formados nas raízes, permanecendo até o final do ciclo.

## CONCLUSÕES

A caracterização dos isolados mostrou que a região semi-árida possui alta diversidade de rizóbio capazes de nodular

os gêneros *Arachis*, *Stylosanthes* e *Aeschynomene*, enquanto na Zona da Mata há baixa riqueza de rizóbios capazes de nodular *Arachis*, e ausência de rizóbios capazes de nodular *Stylosanthes* e *Aeschynomene*.

Esta alta diversidade de rizóbio encontrada na região Nordeste de Brasil, pode ajudar na seleção de estirpes adaptadas, competitivas e aptas a proporcionar uma FBN alta visando a obtenção de inoculantes para amendoim.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Campelo, A.B. Caracterização e especificidade de *Rhizobium* spp de leguminosas florestais. Itaguaí: UFRRJ, 1976. 122p. Tese de Mestrado.
- Coutinho, H.L.C., Oliveira, V.M., Manfio, G.P.; Rosado, A.S. Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological innovations. *Anais Academia Brasileira de Ciências* 71: 491-503. 1999.
- Elkan, E., Ground substance: an anuran defense agent against desiccation, in: Lofts, B. (ed.), *Physiology of the Amphibia*, vol. III. London: Academic Press, 1976. p. 101-110.
- Fred, E.B.; Waksman, S.A. Yeast Extract-Manitol Agar Laboratory. *Manual of general microbiology*, New York: Mc.Graw Hill, 1928. 145p.
- Hollingsworth, R.; Smith, E.; Ahmad, M.H. Chemical composition of extracellular polysaccharides of cowpea rhizobia. *Archives of Microbiology*, Berlin, v.142, p.18-20, 1985.
- 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, 1984.
- Jordan, D. C. Rhizobiaceae conn 1938, 321 AL P. 234- 256- In: R, R.K. and HOLT, J. G. H. (ed) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. v. 1. The Williams & Williams, C.O Kennedy, A . C. Bacterial diversity in agroecosystems. *Agricultural Ecosystems and Environmental*.7: 65-67.1999.
- Kuykendall, L.D.; Saxena, B.; Devine, T.E.; Udell, S.E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordam, 1982 and a propanol for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology*, n.38, p501-505, 1982.
- Margalef, R. Temporal succession. In: Pouzza, T. & Travers, M. *Perspective in marine biology* Berkeley: University of California (ed). p.323-347, 1958.
- Martins, L.M.V. Características ecológicas e fisiológicas de Caupi (*Vigna unguiculata*) isoladas a partir de solos da região Nordeste do Brasil. Itaguaí: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996. 214p. Tese de Mestrado.
- Martins, L.M.U. Neves, M.C.P.; Rumjanek, N.G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the noeth-east of Brazil. *Soil Biology and Biochemistry*. v.29, n.5/6, p.1005-1010, 1997.
- Norris, D.O.T.; Mannelje, 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, p214-235. 1964.
- Odum, *Ecologia*. Guanabara Koogan, 1988
- Pielou, E.C. The use of point to plant distances in the study of the pattern of plant populations, *Journal Ecologic* v. 47, p. 607-613, 1959.
- Pimentel, C. *Metabolismo de carbono e Agricultura Tropical*. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1997. 125p.
- Ribeiro, J.R.A. Aplicação da técnica de ELISA no estudo ecológico de *Rhizobium* sp. Isolados de nódulos de caupi (*Vigna unguiculata*) originárias da região Nordeste Brasileiro. Rio de Janeiro: UFRJ, 1999. 121p. Tese de Mestrado.
- Rosseto, C.A.V. Efeito do momento de colheita e da calagem na produção e qualidade de sementes de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) c. Botucatu: Universidade Estadual Paulista. SP. 1993. Dissertação de Mestrado
- Shannon, C. E.; Weaver, W. *The mathematical theory of communication*. Urbana. University Illinois Press, 1949.
- Silva, F.V Diversidade de rizóbio em áreas sob diferentes coberturas vegetais do programa Shift localizado na região amazônica. Rio de Janeiro: UFRJ, 1999. 85p. Tese de Mestrado.
- Simpson, E.H. Measurement of diversity. *Nature* v. 163. 1949.
- Sinclair, M.J.; Eaglesham, A.R.J. Intrinsic antibiotic resistance in relation to colony orphology in three populations of West African cowpea rhizobia. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.16, p.247-251, 1984.
- 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.; 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- MG:, v.20,-54, 1996.
- Thies, J.E.; Bohlool, B.B.; Singleton, P.W. Subgroups of de *Cawpea* miscellany: symbiotic specificity within *Bradyrhizobium* spp. for *Vigna unguiculata*, *Phaseolos lunatus*, *Arachis hipogaea* and *Macroptilium atropurpureum*, *Applied Environmental Microbiology*, Washington, D.C. v.57, n.5, p.1540-1545, 1991.
- Van Gestel, M.; Ladd J.N.; Amato, M. Carbon and nitrogen mineralization from two soils of contrasting texture and microaggregate stability: influence of sequential fumigation, drying and storage. *Soil Biology and Biochemistry*, v.23, p.313-322, 1991.
- Vincent, J.M. *A Manual for the practical study of root nodule bacteria*. Oxford: Blackwell Scientific, 1970, 164p.
- Woomer, P.; Singleton, P.W.; Bohlool, B.B. Ecological indicators of native rhizobia in tropical soils. *Applied Environmental Microbiology*, v.54, p.1112-1116, 1988.
- 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.
- Zak, J. C.; Willg, M.R.; Moorhead, L. ; Wildman, H. G. Functional diversity of microbial communities: A quantitative approach. *Soil Biololy Biochemistry Great Britain* v.26. n.9, p.1101-1108. 1994,
- Zilli, J.E.; Caracterização e Seleção de Estirpes de rizóbios para inoculação do caupi (*Vigna unguiculata*) em áreas de Cerrado. Rio de Janeiro, UFRRJ, 2000. Dissertação de Mestrado