

# Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. de solos da Amazônia

Adriana Silva Lima<sup>(1)</sup>, João Paulo Andrade Resende Pereira<sup>(1)</sup> e Fátima Maria de Souza Moreira<sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup>Universidade Federal de Lavras, Dep. de Ciência do Solo, Caixa Postal 3037, CEP 37200-000 Lavras, MG. E-mail: adrianalima@navinet.com.br, joaopauloufla@yahoo.com.br, fmoreira@ufla.br

Resumo – Este trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade fenotípica e a eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium*, isoladas de solos da Amazônia, sob diferentes sistemas de uso da terra (monocultura, capoeira, pastagem, floresta e sistema agroflorestal). A análise dos perfis de proteína total de 46 estirpes, obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), mostrou grande diversidade, tendo formado 11 grupos com similaridade acima de 80%. Apenas um dos grupos continha a estirpe referência de *B. elkanii*: BR29, recomendada como inoculante para soja. Vinte e duas estirpes testadas em vasos de Leonard, com caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), induziram à produção de matéria seca e ao acúmulo de nitrogênio, na parte aérea da planta, e à eficiência relativa superiores aos da testemunha (sem N e sem inoculação). Entre as estirpes testadas, 13 induziram à produção de matéria seca e à eficiência relativa similares às da testemunha nitrogenada (com N, sem inoculação); cinco estirpes induziram a acúmulo de N superior ao da testemunha nitrogenada. Essas populações nativas são constituídas por grande diversidade de estirpes, com eficiência simbiótica variável, algumas das quais podem ser recomendadas para testes de eficiência agronômica.

Termos para indexação: *Vigna unguiculata*, fixação biológica de N<sub>2</sub>, bactérias nodulíferas.

## Phenotypic diversity and symbiotic efficiency of *Bradyrhizobium* spp. strains from Amazonian soils

Abstract – This work aimed to evaluate the phenotypic diversity and symbiotic efficiency of *Bradyrhizobium* strains isolated from Amazonian soils, under different land use systems (crop, fallow, pasture, forest and agroforestry system). Total protein profiles obtained by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of 46 strains showed great diversity, while 11 groups presented similarity above 80%. One of these groups contained the reference strain of *B. elkanii*: BR29, recommended as soybean inoculant. Twenty-two strains, tested in Leonard jars for symbiotic efficiency with *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (cowpea) produced shoot dry matter, N-content, and relative efficiency higher than the control (without N, with inoculation). Production of shoot dry matter and relative efficiency were induced by 13 strains in a way similar to the N-control (with N, without inoculation); five strains induced higher nitrogen content than N-control. Native populations comprise high diversity of strains with variable symbiotic efficiency, and some of them could be recommended for agronomic efficiency assays.

Index terms: *Vigna unguiculata*, biological N<sub>2</sub> fixation, Leguminosae nodulating bacteria.

### Introdução

A Bacia Amazônica possui cerca de sete milhões de quilômetros quadrados e é constituída por uma floresta exuberante, com grande diversidade que, comparada com outras regiões brasileiras, ainda é pouco explorada para a produção agrícola. A intensificação da interferência antropogênica resulta na perda e alteração da diversidade, respectivamente acima e abaixo do solo e pode, conseqüentemente, influenciar os processos bio-

lógicos importantes para o bom funcionamento do ecossistema.

Pela sua diversidade e dinâmica, e por estarem continuamente mudando e se adaptando às alterações ambientais, os microrganismos constituem indicadores sensíveis às mudanças oriundas do manejo do solo (Kennedy & Papendick, 1995) e do tipo de cobertura vegetal (Prasad et al., 1994).

A diversidade biológica é definida como a variabilidade entre as espécies de organismos vivos e pode ser

medida em vários níveis taxonômicos (família, gênero, intraespécies etc.) ou, ainda, em termos de determinadas características genéticas ou fenotípicas (morfológicas, bioquímicas, fisiológicas, simbióticas) (Moreira & Siqueira, 2002). O conhecimento sobre a variedade das bactérias que nodulam leguminosas é ainda limitado, por falta de conhecimento sobre os microssimbiontes da grande maioria dessas espécies vegetais, principalmente as tropicais. Nas últimas décadas, estudos revelaram uma grande diversidade de rizóbios de espécies florestais, até então desconhecida, inclusive no gênero *Bradyrhizobium* (Moreira et al., 1993; Dupuy et al., 1994; Willems et al., 2000).

A caracterização de uma bactéria envolve a descrição de muitas propriedades relativas à morfologia, cultivo, nutrição, bioquímica, metabolismo, ácidos nucleicos, patogenicidade e ecologia, as quais são pré-requisitos para a identificação e base da sistemática desse grupo de organismos. Estudos têm mostrado o potencial da eletroforese de proteínas para o estudo da diversidade de microrganismos em geral (Kampfer et al., 1995), na caracterização de diferentes estirpes de bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> (Dreyfus et al., 1988; Moreira et al., 1993; Dupuy et al., 1994; Lajudie et al., 1998; Pereira, 2000), e de fungos ectomicorrízicos dos gêneros *Pisolithus* (Souza, 2000) e *Suillus* (Keller, 1992). Além disso, foi demonstrado que há correlação entre a análise de hibridação DNA-DNA e o perfil eletroforético de proteínas (Vandamme et al., 1990; Kampfer, 1995).

O feijão caupi é uma cultura de destaque na economia do Norte e Nordeste do Brasil, pois representa cerca de 70% do feijão produzido (Vieira, 1989) e é o principal alimento protéico e energético do homem do campo.

Essa espécie apresenta alta rusticidade e adaptabilidade à estiagem prolongada e capacidade de se desenvolver em solo de baixa fertilidade (Oliveira & Carvalho, 1988). Além disso, seus resíduos podem contribuir com N e outros nutrientes, quando incorporados ao solo ou quando fornecidos como alimento aos animais (Brito, 1992).

Apesar de ser promíscuo, pois nodula com vários gêneros de rizóbio (Lewin et al., 1987), a estirpe recomendada como inoculante para o caupi (BR2001/SEMIA 6145) até 2004 (Relare, 2004) pertence ao gênero *Bradyrhizobium*. Essa estirpe foi substituída por

UFLA03-84, INPA03-11B e BR3267, na última Relare (2004), pois apresentam eficiência agrônômica superior (Martins et al., 2003; Lacerda et al., 2004).

A eficiência das bactérias fixadoras de nitrogênio, que estabelecem simbiose com leguminosas, e sua capacidade de sobreviver e formar nódulos no solo dependem de fatores genéticos inerentes aos simbiontes e da interação com fatores edáfo-climáticos (Moreira & Siqueira, 2002). A diversidade, inclusive de leguminosas, encontrada nos vários sistemas de uso da terra (capoeira, pastagem tradicional, sistema agroflorestal, floresta e monocultura), na Amazônia, pode abrigar também uma grande variabilidade de rizóbios (Moreira et al., 1993; Pereira, 2000), adaptados a condições de baixos valores de pH e temperaturas elevadas (predominantes nos solos brasileiros), cujo imenso potencial ainda é pouco conhecido.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade fenotípica e a eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium*, isoladas de áreas da Amazônia, sob diferentes sistemas de uso da terra.

## Material e Métodos

### Estirpes

As quarenta e seis estirpes de rizóbio estudadas foram obtidas, utilizando-se siratro como planta isca, com inoculação de suspensões de amostras de solo diluídas para contagem de rizóbio, em sítios da Amazônia sob cinco sistemas de uso da terra (SUT): monoculturas, capoeira, pastagem, floresta e sistema agroflorestal (Pereira, 2000) (Tabelas 1 e 2). As estirpes foram isoladas em meio 79 (Fred & Waksman, 1928) e mantidas sob refrigeração (a 4°C e a -80°C), cujas características culturais são típicas de *Bradyrhizobium* (Tabela 3), como: crescimento lento (mais de seis dias para aparecimento de colônias isoladas), reação alcalina e de pouca a média produção de polissacarídeos extracelulares (goma) em meio de cultura 79. As estirpes foram isoladas de diluições do solo que variaram de 5<sup>-1</sup> a 5<sup>-6</sup>. Foram comparadas a estirpes tipo e referência de *Bradyrhizobium* spp.: SEMIA 5019/BR29, estirpe recomendada como inoculante para a soja (*Glycine max* (L.) Merrill), pela Relare (2004), e identificada como

**Tabela 1.** Sistema de uso da terra (SUT), principais características, procedência e estirpes de *Bradyrhizobium* estudadas.

Sistema de uso da terra <sup>(1)</sup>	Principais características	Procedência Município, Estado	Estirpes
Monocultura – feijão (M1)	Feijão depois do plantio de milho no fim de um ano de queimada. Muitos galhos e tocos.	Theobroma, RO	UFLA04-0110, UFLA04-0151
Monocultura – mandioca (M2)	Mandioca em presença de plantas daninhas, depois de três anos de plantio (arroz, feijão, entre outras).	Theobroma, RO	UFLA04-0204 UFLA04-0208, UFLA04-0212, UFLA04-0214, UFLA04-0225, UFLA04-0230
Monocultura – arroz (M3)	Um ano depois da queimada. Arroz já colhido, com algumas plantas e palhas presentes. Feijão plantado em alguns lugares. Muitos troncos, tocos e galhos. Significativo brotamento e presença de ervas daninhas.	Pedro Peixoto, AC	UFLA04-1521
Capoeira (C1)	Recobrimento natural de três anos.	Theobroma, RO	UFLA04-0304, UFLA04-03114, UFLA04-0321, UFLA04-0337, UFLA04-0338, UFLA04-0339, UFLA04-0355
Capoeira (C2)	Recobrimento natural de dois anos, depois do plantio de feijão e milho.	Theobroma, RO	UFLA04-0401, UFLA04-0417
Capoeira (C3)	Recobrimento de cinco anos. Árvores muito desenvolvidas.	Pedro Peixoto, AC	UFLA04-1309, UFLA04-1332
Pastagem (P1)	Pastagem de <i>Brachiaria brizantha</i> com oito a dez anos.	Theobroma, RO	UFLA04-0546, UFLA04-0459
Pastagem (P2)	Idade de dez anos. Algumas árvores e tocos. Muitas touceiras de capim.	Ji-Paraná, RO	UFLA04-0820, UFLA04-0821, UFLA04-0824, UFLA04-0849, UFLA04-0850, UFLA04-0885, UFLA04-08113, UFLA04-08118
Pastagem (P3)	Limpa, com presença de poucos tocos.	Pedro Peixoto, AC	UFLA04-1272
Floresta (F1)	Desmatamento seletivo, liteira muito espessa com muitos galhos mortos e tocos.	Theobroma, RO	UFLA04-0640
Floresta (F2)	Floresta pouco desenvolvida. Solo com pedregosidade e baixa fertilidade.	Pedro Peixoto, AC	UFLA04-1406, UFLA04-1413, UFLA04-1417
Sistema agroflorestal (A1)	Café com seringueira (12 anos). Cobertura vegetal de 70%, com algumas espécies de árvores pioneiras. Poucos galhos mortos ou tocos.	Ji-Paraná, RO	UFLA04-0903, UFLA04-0917, UFLA04-0918, UFLA04-0924, UFLA04-0926, UFLA04-0957, UFLA04-0958
Sistema agroflorestal (A2)	Cupuaçu, castanha-do-Brasil e pupunha (sete anos), cobertura vegetal de 90%, liteira fina com muitos galhos e tocos.	RECA <sup>(2)</sup> , AC	UFLA04-1001, UFLA04-1018, UFLA04-1019, UFLA04-1020

<sup>(1)</sup>Código de identificação. <sup>(2)</sup>RECA: reflorestamento econômico consorciado adensado.

**Tabela 2.** Análise de amostras de solos da Amazônia, sob diferentes sistemas de uso da terra: monoculturas de feijão (M1), mandioca (M2) e arroz (M3), capoeiras (C1, C2 e C3), pastagens (P1, P2 e P3), florestas (F1 e F2) e sistema agroflorestal (A1 e A2).

Análise	M1	M2	M3	C1	C2	C3	P1	P2	P3	F1	F2	A1	A2
pH (água)	6,6	4,6	4,8	4,7	5,4	6,1	5,3	6,1	5,1	4,1	4,8	5	5,7
P (mg dm <sup>-3</sup> )	14	1	4	1	3	4	2	2	1	2	3	1	2
K (mg dm <sup>-3</sup> )	41	22	103	39	58	39	58	75	95	33	83	94	58
Ca (mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	40	8	22	10	23	57	16	29	13	7	15	24	23
Mg (mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	17	8	16	6	9	12	4	3	11	2	14	12	11
Al (mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	0	11	15	9	2	0	4	0	4	15	19	10	0
H+Al (mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	17	50	88	56	29	19	36	19	29	70	110	79	23
S <sup>(1)</sup> (mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	58	17	41	17	33	70	21	39	26	10	31	38	35
t <sup>(2)</sup> (mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	58	28	56	26	35	70	25	39	30	25	50	48	35
T <sup>(3)</sup> (mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> )	75	67	129	73	62	89	57	58	55	80	141	117	58
m <sup>(4)</sup> (%)	0	40	27	35	6	0	16	0	1,3	60	38	21	0
V <sup>(5)</sup> (%)	77	25	32	23	54	79	37	67	48	12	22	33	61
Carbono (g kg <sup>-1</sup> )	9	8	11	11	11	14	11	9	9	11	17	14	9
MO <sup>(6)</sup> (Dag kg <sup>-1</sup> )	1,6	1,3	1,9	1,9	1,9	2,4	1,9	1,6	1,5	1,9	2,9	2,5	1,5
Areia (g kg <sup>-1</sup> )	500	460	140	420	520	480	500	780	540	500	180	100	660
Silte (g kg <sup>-1</sup> )	150	150	260	150	130	280	150	130	270	150	290	210	190
Argila (g kg <sup>-1</sup> )	350	390	600	430	350	240	350	90	190	350	530	690	150
Zn (mg dm <sup>-3</sup> )	1,9	0,2	0,2	0,1	0,28	0,6	0,28	2,2	0,2	0,2	0,5	0,2	0,9
Cu (mg dm <sup>-3</sup> )	1	0,6	1,6	0,9	0,9	1	0,8	2,3	1	0,7	1,8	1,6	1,2
Fe (mg dm <sup>-3</sup> )	82	116	80	63	63	32	95	33	69	156	147	56	51
Mn (mg dm <sup>-3</sup> )	9	3	12	12	5	68	9	97	15	6	16	5	63

<sup>(1)</sup>Soma de bases trocáveis. <sup>(2)</sup>CTC efetiva. <sup>(3)</sup>CTC em pH 7. <sup>(4)</sup>Saturação de Al da CTC efetiva. <sup>(5)</sup>Saturação de bases da CTC a pH 7. <sup>(6)</sup>Matéria orgânica.

*Bradyrhizobium elkanii*; ATCC 10324<sup>T</sup>, estirpe tipo de *Bradyrhizobium japonicum*; SEMIA 6145/BR2001, estirpe previamente recomendada pela Relare (2004) para inoculação em caupi; UFLA 03-170, estirpe de área reabilitada com bracinga, após mineração com bauxita e com alta eficiência em vasos de Leonard (Motta, 2002) e vasos com solo (Lacerda et al., 2004); INPA-03-11B,

estirpe isolada da Amazônia, eficiente para caupi em vasos de Leonard (Magalhães, 1986; Lacerda et al., 2004), vasos com solo e campo (Lacerda et al., 2004); e UFLA 03-84, estirpe de alta eficiência em caupi, em vasos de Leonard, com solo e em campo (Lacerda et al., 2004). As duas últimas são, atualmente, recomendadas como inoculantes para caupi pela Relare (2004).

**Tabela 3.** Características culturais de estirpes de *Bradyrhizobium*, isoladas de nódulos de siratro com inoculação de suspensões diluídas na base 5, de amostras de solo da Amazônia, sob diferentes sistemas de uso da terra (SUT).

Estirpe	SUT	Dias <sup>(1)</sup>	Diâmetro <sup>(2)</sup>	pH <sup>(3)</sup>	Goma <sup>(4)</sup>	Cor	Indicador	D <sup>(5)</sup>
UFLA04-0110	M1	6	1	AL	1	Branca	Não	5 <sup>-1</sup>
UFLA04-0151	M1	6	<1	AL	1	Branca	Não	5 <sup>-5</sup>
UFLA04-0204	M2	6	1-2	AL	2	Branca	Não	5 <sup>-3</sup>
UFLA04-0208	M2	6	>2	AL	2	Amarela	Não	5 <sup>-1</sup>
UFLA04-0212	M2	7	1-2	AL	1	Branca	Não	5 <sup>-4</sup>
UFLA04-0214	M2	6	1-2	AL	1	Branca	Não	5 <sup>-4</sup>
UFLA04-0225	M2	6	1-2	AL	2 aquosa	Branca	Não	5 <sup>-1</sup>
UFLA04-0230	M2	6	<<1	AL	1	Branca	Não	5 <sup>-3</sup>
UFLA04-1521	M3	11	<1	AL	1	Branca	Não	5 <sup>-2</sup>
UFLA04-0304	C1	7	1-2	AL	1	Branca	Não	5 <sup>-1</sup>
UFLA04-0314	C1	6	1-2	AL	2 aquosa	Branca	Não	5 <sup>-2</sup>
UFLA04-0321	C1	7	1-2	AL	1	Creme	Não	5 <sup>-3</sup>
UFLA04-0337	C1	6	<1	AL	1	Creme	Não	5 <sup>-6</sup>
UFLA04-0338	C1	6	1-2	AL	2 aquosa	Branca	Não	5 <sup>-6</sup>
UFLA04-0339	C1	7	<1	AL	1	Creme	Não	5 <sup>-6</sup>
UFLA04-0355	C1	6	<1	AL	1	Creme	Não	5 <sup>-2</sup>
UFLA04-0401	C2	6	1-2	AL	2	Branca	Não	5 <sup>-1</sup>
UFLA04-0417	C2	6	1-2	AL	2	Branca	Não	5 <sup>-1</sup>
UFLA04-1309	C3	6	<1	AL	2	Branca	Não	5 <sup>-2</sup>
UFLA04-1332	C3	6	<1	AL	2	Branca	Não	5 <sup>-1</sup>
UFLA04-0546	P1	6	1-2	AL	2	Branca	Não	5 <sup>-5</sup>
UFLA04-0559	P1	6	1-2	AL	2	Branca	Não	5 <sup>-5</sup>
UFLA04-1272	P3	8	<1	AL	1	Branca	Não	5 <sup>-2</sup>
UFLA04-0820	P2	7	1-2	AL	2 aquosa	Branca	Não	5 <sup>-2</sup>
UFLA04-0821	P2	7	1-2	AL	2	Branca	Não	5 <sup>-2</sup>
UFLA04-0824	P2	7	<1	AL	1	Branca	Não	5 <sup>-2</sup>
UFLA04-0917	A1	7	<1	AL	2 aquosa	Branca	Não	5 <sup>-4</sup>
UFLA04-0849	P2	7	1-2	AL	2 aquosa	Branca	Não	5 <sup>-4</sup>
UFLA04-0850	P2	8	<1	AL	1	Amarela	Não	5 <sup>-4</sup>
UFLA04-0885	P2	7	1-2	AL	2	Branca	Não	5 <sup>-6</sup>
UFLA04-8113	P2	6	1-2	AL	2 aquosa	Branca	Não	5 <sup>-3</sup>
UFLA04-8118	P2	7	1-2	AL	1	Amarela	Não	5 <sup>-4</sup>
UFLA04-0903	A1	7	<1	AL	2 aquosa	Branca	Não	5 <sup>-1</sup>
UFLA04-0918	A1	7	<1	AL	2 aquosa	Branca	Não	5 <sup>-4</sup>
UFLA04-0924	A1	7	<1	AL	2 aquosa	Branca	Não	5 <sup>-5</sup>
UFLA04-0926	A1	7	<1	AL	2 aquosa	Branca	Não	5 <sup>-6</sup>
UFLA04-0957	A1	7	<1	AL	1	Branca	Não	5 <sup>-4</sup>
UFLA04-0958	A1	8	<1	AL	1	Branca	Não	5 <sup>-4</sup>
UFLA04-1001	A2	7	1-2	AL	1	Branca	Não	5 <sup>-2</sup>
UFLA04-1018	A2	7	<1	AL	1	Branca	Não	5 <sup>-3</sup>
UFLA04-1019	A2	7	<1	AL	1	Branca	Não	5 <sup>-3</sup>
UFLA04-1020	A2	7	1-2	AL	2 aquosa	Branca	Não	5 <sup>-1</sup>
UFLA04-0640	F1	10	<1	AL	2	Branca	Não	5 <sup>-3</sup>
UFLA04-1406	F2	11	1-2	AL	2	Branca	Sim	5 <sup>-1</sup>
UFLA04-1413	F2	8	1-2	AL	1	Branca	Não	5 <sup>-5</sup>
UFLA04-1417	F2	9	1-2	AL	2	Branca	Não	5 <sup>-5</sup>

<sup>(1)</sup>Tempo para aparecimento de colônias isoladas. <sup>(2)</sup>Diâmetro da colônia em mm. <sup>(3)</sup>A reação do meio de cultivo após crescimento de colônias foi alcalina (AL). <sup>(4)</sup>Escala de notas de 1 a 4 para produção de goma: 1 (pouca) e 2 (média). <sup>(5)</sup>Diluição da amostra de solo de onde foi isolada.



### **Análise de proteínas totais por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

As condições de cultivo foram rigorosamente padronizadas para todas as estirpes. As estirpes armazenadas cresceram em meio de cultura 79 por 4 dias. Após o crescimento por duas vezes sucessivas, em meio TY sólido, com mesmo tempo de incubação, foram inoculadas colônias isoladas em 50 mL de meio de cultura líquido TY. O crescimento bacteriano foi obtido após 4 dias, sob agitação constante de 120 rpm a 28°C. Em seguida, o meio com cada cultura foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 min, à temperatura de 4°C, o sobrenadante foi descartado e o “pellet” formado ressuspense em tampão fosfato de sódio (NaPBS). Esse procedimento foi repetido duas vezes para lavagem das células. Setenta miligramas do “pellet” foi transferido para tubos de 1,5 mL; foi adicionado 0,9 mL do tampão da amostra (TTA) e 0,1 mL de SDS a 20% para solubilização das proteínas. Essa mistura foi aquecida em banho-maria à 95°C por 10 min. As amostras de proteínas solubilizadas foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 min, à temperatura de 4°C, e 30 mL foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). Para tal, foi utilizado o método Laemmli (1970), com modificações descritas por Jackman (1985), utilizadas para rizóbio por Moreira et al. (1993). Para eletroforese, utilizou-se um gel de sistema descontínuo, com concentração de poliacrilamida a 12% para o gel separador, e a 5% para o gel de concentração.

Uma matriz binária dos dados originais foi construída, com 13 cadeias polipeptídicas (bandas mais fortes), representativas dos 46 padrões gerados. Foi atribuído o valor 1 ou 0, para indicar presença ou ausência de cada banda. Os padrões foram comparados por seu grau de similaridade estimado pelo coeficiente de Jacard ( $S_j$ ), agrupados pelo método UPGMA (average linkage clustering) e representados graficamente por um dendrograma obtido pelo programa NTSYS-pc, versão 2.0.

### **Análise da eficiência simbiótica**

Para avaliação da eficiência simbiótica foram selecionadas uma ou duas estirpes, representantes de cada sítio nos sistemas de uso da terra (SUT). As estirpes selecionadas foram as seguintes: UFLA04-0110, UFLA04-0151, UFLA04-0204, UFLA04-0230, UFLA04-03114, UFLA04-0321, UFLA04-0401,

UFLA04-0546, UFLA04-0559, UFLA04-0640, UFLA04-0849, UFLA04-0885, UFLA04-0917, UFLA04-0926, UFLA04-1001, UFLA04-1020, UFLA04-1272, UFLA04-1309, UFLA04-1332, UFLA04-1413, UFLA04-1417 e UFLA04-1521.

O experimento foi conduzido em vasos de Leonard (Vincent, 1970), em casa de vegetação, de setembro a outubro de 2002. O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado, com três repetições e 28 tratamentos, constituídos pela inoculação individual das 22 estirpes citadas anteriormente, e de quatro das estirpes referências (BR2001, INPA03-11B, UFLA03-84 e UFLA03-170), mais dois controles (N mineral e testemunha sem N e sem inoculação). O nitrogênio foi aplicado em 3 parcelas, com intervalos de 10 dias, num total de 210 mg de N ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) por vaso.

A parte superior dos vasos de Leonard continha uma mistura de 1:1 de areia (250 mL) e de vermiculita (250 mL), enquanto a inferior continha solução nutritiva de Jensen modificada ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,2 g L<sup>-1</sup>;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,2 g L<sup>-1</sup>; NaCl, 0,2 g L<sup>-1</sup>;  $\text{CaHPO}_4$ , 1 g L<sup>-1</sup>;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g L<sup>-1</sup>), diluída quatro vezes. Após o preparo, os vasos foram autoclavados por uma hora, à pressão de 1,5 kg cm<sup>-2</sup>, a 127°C. A solução nutritiva foi autoclavada por 20 min, à pressão de 1,5 kg cm<sup>-2</sup> e a 127°C. A cultivar de caupi utilizada foi a BR14 Mulato. As sementes empregadas foram desinfestadas, superficialmente, com etanol a 70% por 5 minutos, e hipoclorito de sódio a 1% por 3 minutos; em seguida, foram lavadas seis vezes com água destilada esterilizada. No momento da semeadura, com cinco sementes por vaso, 1 mL de meio 79 semi-sólido, com as estirpes na fase log de seu crescimento (quatro dias de cultivo a 28°C), foi colocado junto a cada semente.

A superfície do vaso foi coberta com uma fina camada de mistura esterilizada de areia, benzeno e parafina, na proporção de 5:1:0,015, respectivamente, com a finalidade de evitar possíveis contaminações. Os níveis de solução nos vasos foram repostos, periodicamente, com solução autoclavada. Decorridos três a cinco dias da germinação, foi feito o desbaste, deixando-se duas plantas por vaso.

As plantas foram colhidas no estágio de florescimento, para determinação da matéria seca da parte aérea e avaliação do número e peso de nódulos secos. Após o destacamento manual, os nódulos das raízes foram contados, e assim como a parte aérea, foram acondiciona-

dos em sacos de papel e levados para uma estufa de circulação forçada (65°C a 70°C) até massa constante, para determinação da massa da matéria seca. A eficiência relativa de cada tratamento foi calculada segundo a fórmula (Bergensen et al., 1971):

$ER = (MSPA \text{ inoculada} / MSPA \text{ com N}) \times 100$ ,  
em que ER é a eficiência relativa; MSPA inoculada é a matéria seca da parte aérea da planta com inoculação; e MSPA com N é a matéria seca da parte aérea da planta com N mineral.

O nitrogênio (N) total foi analisado pelo método semi-microkjedahl, de acordo com Sarruge & Haag (1979), tendo-se determinado a porcentagem de N na matéria seca. O N acumulado na parte aérea foi calculado com a multiplicação da massa da matéria seca da parte aérea (g) pela porcentagem de N.

Os dados foram analisados, estatisticamente, com o programa SISVAR versão 4.3. Os efeitos dos tratamentos foram comparados pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

## Resultados e Discussão

Foi possível agrupar as estirpes que apresentaram perfil protéico semelhante em 11 grupos, conforme Tabela 4 e Figuras 1 e 2. Onze estirpes não se agruparam visualmente com os demais grupos. O perfil protéico das estirpes UFLA03-170, UFLA04-1521 (M3), UFLA04-1417 (F2), UFLA04-1413 (F2) e UFLA04-1406 (F2) não foi revelado no gel. O grupo 1 foi formado por estirpes somente do SUT monocultura, UFLA04-151 (M1) e UFLA04-230 (M2); o grupo 2 por estirpes do SUT capoeira, UFLA04-337 (C1) e UFLA04-355 (C1); o grupo 9 com as estirpes UFLA04-849 (P2) e UFLA04-885 (P2) do SUT pastagem; e o grupo 11 apenas por estirpes do SUT – sistema agroflorestral, UFLA04-903 (A1), UFLA04-917 (A1), UFLA04-918 (A1), UFLA04-924 (A1) e UFLA04-926 (A1). O grupo 6 foi formado pelas estirpes UFLA04-958 (A1), UFLA04-1272 (P3) e pela estirpe de referência SEMIA 5019/BR 29 *Bradyrhizobium elkanii*, recomendada como inoculante para a soja. Os demais grupos foram formados por estirpes de diferentes SUT.

Considerando-se que existem apenas três espécies de *Bradyrhizobium* descritas até o momento, *B. japonicum*, *B. elkanii* e *B. liaoningense*, e que vários grupos fenotípicos não se agruparam com estirpes

tipo ou referência das duas primeiras espécies, nem apresentaram a característica cultural da terceira (crescimento muito lento), existe uma grande possibilidade de existência de novas espécies no grupo de estirpes estudadas. Resultados semelhantes foram encontrados por Motta (2002), que concluiu que estirpes de *Bradyrhizobium*, isoladas de área minerada de bauxita reabilitada, apresentam alta diversidade fenotípica e podem também representar novas espécies do gênero.

Moreira et al. (1993) verificaram, mediante análise de proteína total por SDS-PAGE, que a maior parte das estirpes isoladas de espécies florestais da Amazônia e da Mata Atlântica pertenciam ao gênero *Bradyrhizobium*, e que havia grande diversidade dentro desse gênero.

Dupuy et al. (1994) encontraram alta diversidade em estudo com 84 estirpes de *Bradyrhizobium*, isoladas de *Acacia albida* do Senegal, por meio da análise de proteína total SDS-PAGE, para determinar a posição taxonômica desses organismos e a relação entre estirpes obtidas na superfície e em profundidade no solo. A maioria das estirpes foi distribuída em 8 grupos eletroforéticos, que continham estirpes representativas de *B. japonicum*, *B. elkanii* e *Bradyrhizobium* sp.

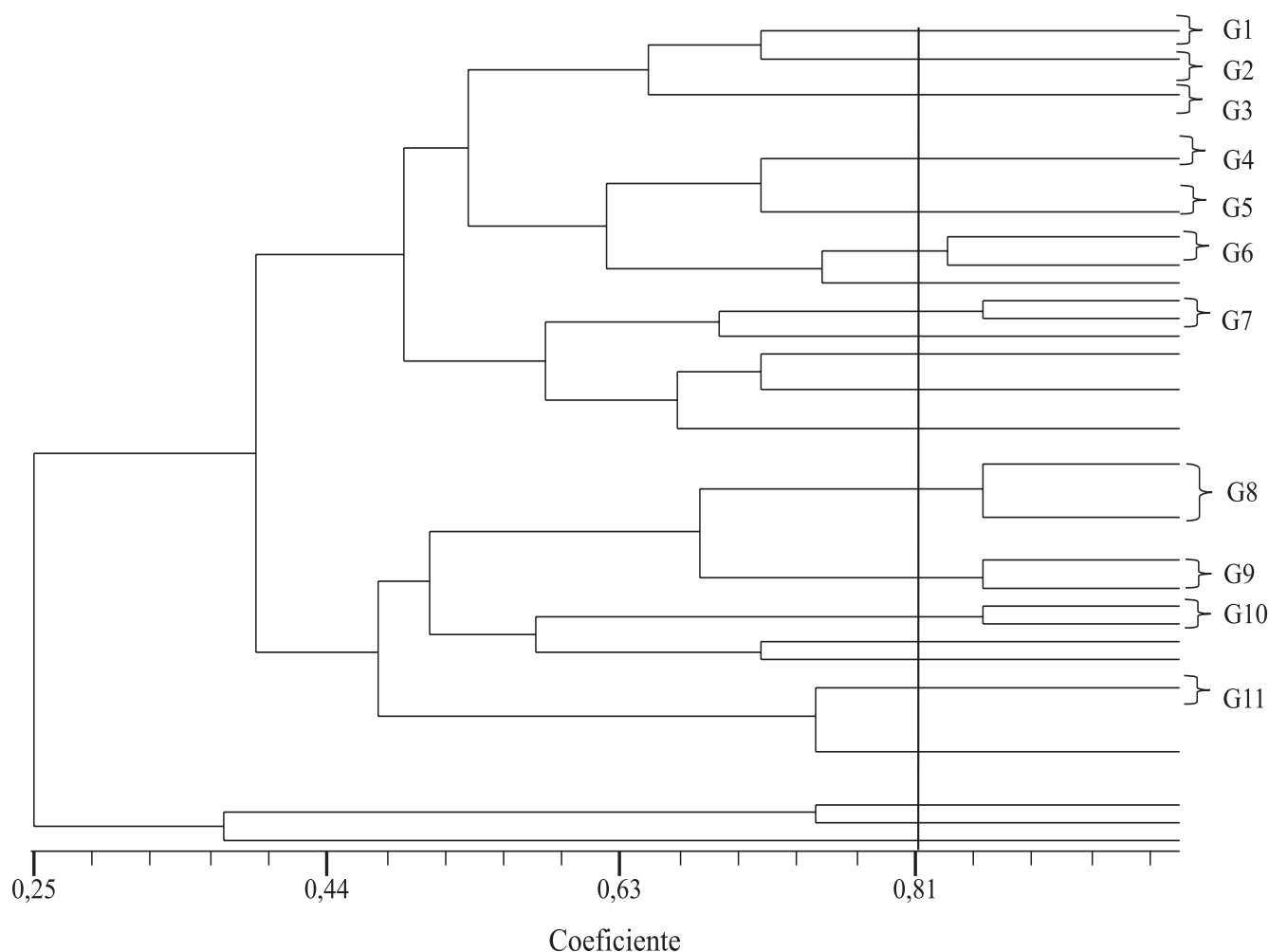
**Tabela 4.** Grupos de proteína total celular, obtidos por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia: monoculturas de feijão (M1), mandioca (M2) e arroz (M3), capoeiras (C1, C2 e C3), pastagens (P1, P2 e P3), florestas (F1 e F2) e sistemas agroflorestrais (A1 e A2).

Grupo	Estirpes
G1	UFLA04-151(M1) e UFLA04-230 (M2)
G2	UFLA04-337 (C1) e UFLA04-355 (C1)
G3	UFLA04-212 (M2), UFLA04-824 (P2), UFLA04-957 (A1), UFLA04-1018 (A2) e UFLA04-1019 (A2)
G4	UFLA04-304 (C1), UFLA04-821 (P2) e UFLA04-1001(A2)
G5	UFLA04-640 (F1) e UFLA04-1309 (C3)
G6	UFLA04-958 (A1), UFLA04-1272 (P3) SEMIA 5019 /BR29;
G7	UFLA04-204 (M2), UFLA04-417 (C2), UFLA04-559 (P1), UFLA04-225 (M2), UFLA04-314 (C1) e UFLA04-338 (C1)
G8	UFLA04-401 (C2), UFLA04-546 (P1) e UFLA04-8113 (P2)
G9	UFLA04-849 (P2) e UFLA04-885 (P2)
G10	UFLA04-820 (P2) e UFLA04-1020 (A2)
G11	UFLA04-903 (A1), UFLA04-917 (A1), UFLA04-918 (A1), UFLA04-924 (A1) e UFLA04-926 (A1)
Separadas	INPA03-11B (1), UFLA03-84 (2), ATCC 10324 <sup>T</sup> (3), UFLA04-110 (M1) (4), UFLA04-028 (M2) (5), UFLA04-214 (M2) (6), UFLA04-321(C1) (7), UFLA04-339(C1) (8), UFLA04-850 (P2) (9), UFLA04-8118 (P2) (10) e UFLA04-1332 (C3) (11).

As médias de número e matéria seca de nódulos (NN e NSM), de matéria seca da parte aérea (MSPA), eficiência relativa (ER) e acúmulo de N na parte aérea (ANPA) encontram-se na Tabela 5. Não foi verificada a presença de nódulos nas testemunhas com nitrogênio e sem nitrogênio. As estirpes que tiveram maior número de nódulos foram: UFLA04-0230, UFLA04-0640, UFLA04-0204, UFLA04-0401, UFLA04-0917, UFLA04-1272, UFLA04-1332, UFLA04-1309, UFLA04-0885, UFLA04-0559, UFLA04-0546, UFLA04-1020, UFLA04-1417, UFLA04-0314, UFLA04-1001, com as estirpes referência INPA03-11B, UFLA03-170 e UFLA03-84. Todas aquelas estudadas aumentaram o crescimento das plantas em relação ao controle (testemunha sem nitrogênio e sem inoculação).

As estirpes que induziram à maior produção de matéria seca da parte aérea encontram-se na Tabela 5. Essas apresentaram MSPA semelhantes às das referências UFLA03-84 e INPA03-11B, recomendadas para caupi (Magalhães, 1986; Lacerda et al., 2004), e podem representar potenciais estirpes inoculantes.

As estirpes, UFLA04-0110, UFLA04-1309, UFLA04-0885, UFLA04-0559, UFLA04-0546, UFLA04-0321, UFLA04-1020, UFLA04-1417, UFLA04-0314, UFLA04-1001 e as estirpes de referência INPA03-11B, UFLA03-170 e UFLA03-84 tiveram eficiência relativa similar à da testemunha que recebeu nitrogênio (210 mg de N por vaso). As estirpes: UFLA04-1020, UFLA04-1417, UFLA04-0314, UFLA04-1001 e a estirpe de referência UFLA03-84 induziram ao acúmulo de nitrogê-



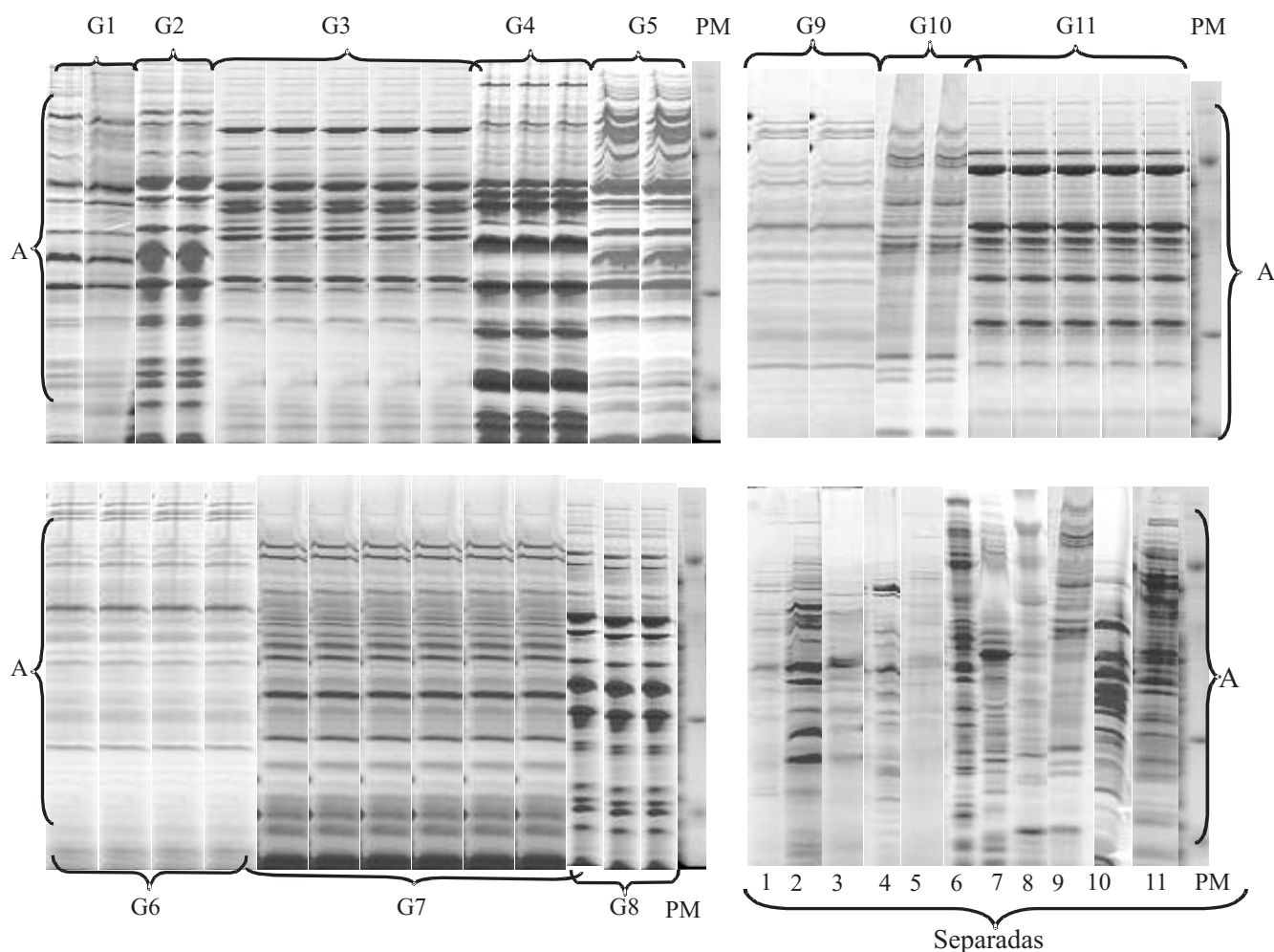
**Figura 1.** Dendrograma de similaridade, construído com base no perfil proteico total (SDS-PAGE) das estirpes estudadas e das estirpes tipo e de referência.

nio na parte aérea (ANPA) superior à da testemunha nitrogenada (210 mg de N por vaso). Uma dessas estirpes, a UFLA04-1417, foi isolada da diluição 5<sup>-5</sup> e, portanto, ocorria em números elevados no SUT de onde foi isolada (floresta). Houve correlação significativa a 1% entre MSPA e MSN ( $r = 0,56$ ) e entre MSN e ANPA ( $r = 0,48$ ).

Todas as estirpes proporcionaram valores de NN, MSN, MSPA, ER e ANPA superiores aos apresentados pela estirpe BR2001/SEMIA 6145 recomendada pela Relare (2004) até 2004. Resultados semelhantes foram encontrados em outros trabalhos (Martins et al., 1997; Pereira, 2000; Motta, 2002; Lacerda et al., 2004), que

indicaram a baixa eficiência da BR2001/SEMIA 6145 e melhor eficiência simbiótica de outras estirpes de rizóbio.

Os grupos eletroforéticos obtidos possuíam estirpes com eficiência variada e oriundas de diferentes SUT, ou seja, não houve relação entre os agrupamentos fenotípicos e simbióticos. Isto pode ser explicado pelo fato de que as proteínas totais representam a expressão de todo o genoma funcional bacteriano, enquanto a eficiência está relacionada a alguns genes específicos. A ocorrência de estirpes diversas e comuns, em diferentes SUT, indica tanto um alto nível de dispersão, como um certo endemismo nesse grupo de bactérias na Amazônia.



**Figura 2.** Perfis de proteína celular total, de estirpes isoladas de solos da Amazônia, sob diferentes sistemas de uso da terra, e das estirpes tipo e de referência obtidas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). A: área utilizada de 13 bandas; PM: padrão de peso molecular LMWM.



**Tabela 5.** Número (NN) e matéria seca de nódulos (MSN), matéria seca da parte aérea (MSPA), eficiência relativa (ER) e acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) em caupi com inoculação de rizóbio, com N mineral e sem N mineral, cultivado em vasos de Leonard<sup>(1)</sup>.

Formas de N	SUT <sup>(2)</sup>	NN	MSN (g)	MSPA (g)	ER (%)	ANPA (g planta <sup>-1</sup> )
Sem N	-	0c	0,00d	0,49c	4,08c	0,020d
BR2001	R	282b	0,50c	3,74b	31,17b	0,119c
UFLA04-0230	M2	514a	0,66c	5,64b	47,00b	0,119c
UFLA04-0926	A1	438b	0,62c	5,38b	44,83b	1,152c
UFLA04-0151	M1	310b	0,75c	5,17b	43,08b	0,155c
UFLA04-0640	F1	674a	0,69c	5,71b	47,58b	0,166c
UFLA04-0204	M2	663a	0,93c	8,36b	69,67b	0,178c
UFLA04-0401	C2	682a	1,26b	7,30b	60,83b	0,188c
UFLA04-0917	A1	693a	1,46a	5,50b	45,83b	0,189c
UFLA04-1521	M3	369b	0,61c	6,41b	53,42b	0,202c
UFLA04-1413	F2	331b	1,03b	6,10b	50,83b	0,221c
UFLA04-0849	P2	452b	1,15b	8,36b	69,67b	0,253c
UFLA04-1272	P3	597a	0,86c	8,94b	74,50b	0,267c
UFLA04-1332	C3	526a	0,74c	8,35b	69,58b	0,276c
INPA03-11B	R	753a	1,63a	9,97a	83,08a	0,206c
UFLA04-0110	M1	378b	0,82c	10,48a	87,33a	0,293b
UFLA04-1309	C3	709a	0,67c	10,44a	87,00a	0,299b
UFLA03-170	R	607a	1,26b	13,00a	108,33a	0,311b
UFLA04-0885	P2	580a	1,48a	10,74a	89,50a	0,317b
UFLA04-0559	P1	801a	1,29b	10,95a	91,25a	0,359b
UFLA04-0546	P1	596a	1,83a	11,49a	95,75a	0,370b
Com N	-	0c	0d	12,00a	100,00a	0,377b
UFLA04-0321	C1	468b	1,54a	12,15a	101,25a	0,378b
UFLA04-1020	A2	707a	1,05b	10,01a	83,42a	0,409a
UFLA04-1417	F2	516a	1,61a	13,43a	111,92a	0,444a
UFLA04-0314	C1	725a	1,05b	12,17a	101,42a	0,475a
UFLA03-84	R	871a	1,16b	13,06a	108,25a	0,490a
UFLA04-1001	A2	552a	1,40a	14,19a	118,25a	0,497a

<sup>(1)</sup>Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. <sup>(2)</sup>Sistemas de uso da terra (SUT) na Amazônia: monoculturas de feijão (M1), mandioca (M2) e arroz (M3), capoeiras (C1, C2 e C3), pastagens (P1, P2 e P3), florestas (F1 e F2) e sistemas agroflorestais (A1 e A2); R: estirpes referência.

## Conclusões

1. As 46 estirpes avaliadas apresentam alta diversidade fenotípica (SDS-PAGE), e distribuem-se em 11 grupos com similaridade superior a 80%, dos quais apenas um grupo contém a estirpe referência de *B. elkanii*: BR29, recomendada como inoculante para a soja.

2. Não há relação entre os agrupamentos fenotípicos baseados nos padrões protéicos e na eficiência simbiótica, assim como, entre esses agrupamentos e os sistemas de uso da terra de origem das estirpes.

3. As populações nativas são constituídas por estirpes com eficiência variável, das quais algumas podem ser recomendadas para testes de eficiência agrônômica.

## Agradecimentos

Ao Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (PNUD), pelo financiamento (GEF/

UNDP) deste trabalho, no âmbito do projeto “Alternatives to Slash-and-Burn” do “International Center for Research in Agroforestry” e do “Tropical Soil Biology and Fertility Programme” (ASB/ICRAF/TSBF); à Fapemig e ao CNPq, pela concessão de bolsas de M.Sc., IC e Produtividade de Pesquisa aos autores.

## Referências

- BERGENSEN, F.J.; BROCKWELL, J.; GIBSON, A.H.; SCHWINGHAMER, E.A. Studies of natural populations and mutants of *Rhizobium* in the improvement of legume inoculants. *Plant and Soil*, v.46, p.3-16, 1971. (Supplement, 1).
- BRITO, M. de M.P. **Marcha de absorção do nitrogênio do solo, do fertilizante e da fixação simbiótica em caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) e feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) determinada usando <sup>15</sup>N**. 1992. 197p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- DREYFUS, B.; GARCIA, J.L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.38, p.89-98, 1988.

- DUPUY, N.; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; VANDENBRUAENE, I. Phenotypic and genotypic characterization of *Bradyrhizobia* nodulating the leguminous tree *Acacia albida*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.44, p.461-473, 1994.
- FRED, E.B.; WAKSMAN, S.A. **Laboratory manual of general microbiology**. New York: McGraw-Hill, 1928. 143p.
- JACKMAN, P.J.H. Bacterial taxonomy based on electrophoretic whole-cell protein patterns. In: GOODFELLOW, M.; MINNIKIN, D. (Ed.). **Chemical methods in bacterial systematics**. London: Academic, 1985. p.119-129.
- KAMPFER, P. Differentiation of *Brevibacterium* species by electrophoretic protein patterns. **Systematic and Applied Microbiology**, v.17, p.533-535, 1995.
- KELLER, G. Isozymes in isolates of *Suillus* species from *Pinus cembra* L. **New Phytologist**, v.120, p.351-358, 1992.
- KENNEDY, A.C.; PAPENDICK, R.I. Microbial characteristics of soil quality. **Journal of Soil and Water Conservation**, v.50, p.243-248, 1995.
- LACERDA, A.M.; MOREIRA, F.M.S.; MAGALHÃES, F.M.M.; ANDRADE, M.J.B. de; SOARES, A.L. de E.L. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão caupi. **Revista Ceres**, v.51, p.67-82, 2004.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- LAJUDIE, P. de; WILLEMS, A.; NICK, G.; MOREIRA, F.; MOLOUBA, F.; HOSTE, B.; TORCK, U.; NEYRA, M.; COLLINS, M.D.; LINDSTROM, K.; DREYFUS, B.; GILLIS, M. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.48, p.369-382, 1998.
- LEWIN, A.; ROSENBERG, C.; MEYER, H.Z.A.; WONG, C.H.; NELSON, L.; MANEN, J.F.; STANLEY, J.; DOWLING, D.N.; DÉNARIE, J.; BROUGHTON, W.J. Multiple host-specificity *loci* of the broad host-range *Rhizobium* sp. NGR234 selected using the widely compatible legume *Vigna unguiculata*. **Plant Molecular Biology**, v.8, p.447-459, 1987.
- MAGALHÃES, F.M.M. O estado atual do conhecimento sobre fixação biológica de nitrogênio na Amazônia. In: SIMPÓSIO DO TRÓPICO ÚMIDO, 1., Belém, 1984. **Anais**. Belém: Embrapa-CPATU, 1986. p.499-512.
- MARTINS, L.M.V.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the Northeast region of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.29, p.1005-1010, 1997.
- MARTINS, L.M.V.; XAVIER, G.R.; RANGEL, F.W.; RIBEIRO, J.R.A.; NEVES, M.C.P.; MORGADO, L.B.; RUMAJANEK, N.G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving yield in the Semi-Arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, v.38, p.333-339, 2003.
- MOREIRA, F.M.S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERS, K.; FRANCO, A.A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrilamide gel electrophoresis of their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, v.16, p.135-146, 1993.
- MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Ufla, 2002. 626p.
- MOTTA, J.S. **Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* sp. isoladas de áreas de mineração de bauxita reabilitadas**. 2002. 43p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- OLIVEIRA, I.P.; CARVALHO, A.M.A. de. A cultura do caupi nas condições de clima e solo dos trópicos úmidos e semi-áridos do Brasil. In: ARAÚJO, J.P. de; WATT, E.A. (Org.). **O caupi no Brasil**. Brasília: IITA; Embrapa-SPI, 1988. p.65-95.
- PEREIRA E.G. **Diversidade de rizóbios isolados em diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia**. 2000. 93p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- PRASAD, P.; BASU, S.; BEHERA, N. A comparative account of the microbiological characteristics of soils under natural forest, grassland and crop field from Eastern India. **Plant and Soil**, v.175, p.85-91, 1994.
- RELARE. **Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbianos de Interesse Agrícola [home page]**. Disponível em: <<http://www.relare.org.br>>. Acesso em: abr. 2004.
- SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: Esalq; USP, 1979. 27p.
- SOUZA, A.M. de. **Diversidade fenotípica e genotípica de isolados de *Pisolithus* sp.** 2000. 107p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- VANDAMME, P.; POT, B.; FALSEN, E.; KERSTERS, K.; DE LEY, J. Intra and interspecific relationships of veterinary campilobacters revealed by numerical analysis of electrophoretic protein profiles and DND: DNA hybridizations. **Systematic and Applied Microbiology**, v.13, p.295-303, 1990.
- VIEIRA, R.F. **Comparações de feijões dos gêneros *Vigna* e *Phaseolus* com feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1989. 213p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- VINCENT, J.M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970. 164p.
- WILLEMS, A.; DOIGNON-BOURCIER, F.; COOPMAN, R.; HOSTE, B.; DE LAJUDIE, P.; GILLIS, M. AFLP fingerprint analysis of *Bradyrhizobium* strains isolated from *Faidherbia albida* and *Aeschynomene* species. **Systematic and Applied Microbiology**, v.23, p.137-147, 2000.

Recebido em 10 de setembro de 2004 e aprovado em 11 de abril de 2005