

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

**SELEÇÃO DE RIZÓBIOS NATIVOS, DE SOLOS DO RIO GRANDE DO SUL,  
PARA *Lotus glaber* e *Lotus subbiflorus***

**RICARDO DE ALBUQUERQUE FONTOURA**  
Biólogo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Porto Alegre, RS, Brasil

maio de 2007



Aos meus pais e a minha namorada,  
Caroline, pela cooperação, tempo,  
paciência, dedicação e amor,  
importantes durante essa jornada,  
dedico essa conquista.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao professor Enilson Luiz Saccol de Sá, pelos ensinamentos que me levaram a construir não só a base para a conclusão do curso de mestrado, mas também me guiam freqüentemente em situações no dia-a-dia.

Aos professores e colegas do Curso de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente e da Pós Graduação em Ciência do Solo, pelos ensinamentos, científicos e humanos, pela convivência e troca de idéias.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Agronomia, Andréia Bins, Andressa Silveira, Benjamin Filho, Brenda Tonon, Mariel Bizarro, Marta Coutinho.

Ao colega e parceiro Márcio L. dos Santos Frizzo, um exemplo de profissionalismo, que me amparou desde o início com seu conhecimento em temas de âmbito agrário e científico, mas principalmente pelas provas de amizade e paciência.

Ao professor Miguel Dall' Agnol, do Departamento de Plantas Forrageiras, pela concessão das sementes e apoio com definições de caráter taxonômico.

Aos pesquisadores Adriana Giongo e Luciano Kayzer Vargas pelas dicas e pela infra-estrutura na área de Biologia Molecular.

Ao Márcio Silva da Silveira, pelo apoio técnico em química.

Ao pesquisador Edemar Brose, pelas estirpes gentilmente cedidas.

Aos meus pais, sempre servindo de inspiração para a finalização de mais uma etapa, e ao meu irmão, companhia incondicional na jornada da vida.

À minha namorada Caroline, pelo carinho, paciência e apoio.

Ao CNPq e a comunidade européia, pelo auxílio financeiro.

A todos os que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

## SELEÇÃO DE RIZÓBIOS NATIVOS, DE SOLOS DO RIO GRANDE DO SUL, PARA *Lotus glaber* e *L. subbiflorus*

Autor: Ricardo de Albuquerque Fontoura

Orientador: Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá

### RESUMO:

Leguminosas forrageiras como espécies de *Lotus*., adaptadas às condições ambientais nos estados do sul do Brasil, podem ser uma alternativa importante para aumentar o fornecimento de forragem de alto teor protéico para o gado além de ter boa adaptabilidade a solos de baixa fertilidade. Uma das vantagens do uso de leguminosas forrageiras é a obtenção de nitrogênio a partir da simbiose com bactérias diazotróficas como os rizóbios. Este trabalho objetivou a seleção de rizóbios nativos a partir de amostras de solo de oito localidades do Rio Grande do Sul. Foram obtidos 259 isolados de rizóbios em plantas de *Lotus glaber* e 68 em *Lotus subbiflorus*. Estes foram avaliados quanto à eficiência na fixação de nitrogênio em simbiose com plantas, em cultivo em casa de vegetação, e quanto à morfologia colonial, produção de melanina e caracterizados geneticamente por comparação do perfil eletroforético dos produtos de amplificação do DNA genômico, pela reação em cadeia da polimerase com os oligonucleotídeos iniciadores BOX e ERIC. Apenas cinco isolados produziram melanina. Foram selecionados nove isolados para *L. glaber* que foram mais eficientes na fixação de nitrogênio do que as estirpes SEMIA 830 e U510, com índice de eficiência relativa de 88 a 132% e dois isolados para *L. subbiflorus* que foram mais eficientes do que as estirpes SEMIA 849 e SEMIA 850, com Índice de eficiência relativa de 128 a 159%. Na caracterização genética, observou-se que nenhum isolado apresentou identidade com as estirpes recomendadas, o que demonstra que nos solos do Rio Grande do Sul existem rizóbios autóctones capazes de fixar nitrogênio eficientemente em simbiose com *Lotus glaber* e *Lotus subbiflorus*, podendo ser recomendados para estudos a campo e para a produção de inoculantes para estas leguminosas no Brasil.

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (83p.) Maio, 2007.

**SELECTION OF NATIVE RHIZOBIA, FROM RIO GRANDE DO SUL SOILS,  
FOR *Lotus glaber* AND *L. subbiflorus***

Author: Ricardo de Albuquerque Fontoura

Advisor: Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá

**ABSTRACT:**

Forage legume species such as *Lotus*., adapted to the local environmental conditions of South Brazilian States can be an important alternative to increase the supply of high protein content forage to the cattle besides the good adaptability to low-fertility soils. One of the advantages of using forage legumes relies on the acquisition of nitrogen from the symbiosis with diazotrophic bacteria such as Rhizobia. This work aimed the selection of native Rhizobia from soil samples of eight localities of Rio Grande do Sul. It was obtained 259 Rhizobia isolates from plants of *Lotus glaber* and 68 from *Lotus subbiflorus*. These isolates were evaluated on the efficiency of symbiotic nitrogen fixation with plants, grown in greenhouse conditions, on colonial morphology, capability of melanin production and genetically characterized by PCR genomic DNA fingerprinting using primers BOX and ERIC. Only five isolates produced melanin. It was selected nine isolates for *L. glaber* that were more efficient on nitrogen fixation than strains SEMIA 830 and U510, with relative efficiency index ranging from 88 to 132%, and two isolates for *L. subbiflorus* that were more efficient than strains SEMIA 849 and SEMIA 850, with relative efficiency index of 128 and 159%. Related to the genetic characterization, it was observed that isolates have no identity to the recommended strains, which shows that in the soils of Rio Grande do Sul there are autochthonous Rhizobia capable of efficient symbiotic nitrogen fixation with *Lotus glaber* and *Lotus subbiflorus*, which may be recommended to field evaluations and to the production of inoculants to these legume in Brazil.

<sup>1</sup>Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology – Microbiologia do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil (83p.) May, 2007.

## SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
2.1 Características das leguminosas estudadas.....	4
2.2 A simbiose entre rizóbios e espécies do gênero <i>Lotus</i> .....	6
2.3 Caracterização das culturas bacterianas de rizóbios.....	8
2.3.1 Produção de melanina.....	9
2.3.2 Capacidade de fixação biológica do nitrogênio.....	10
2.4 Avaliação da variabilidade genética dos rizóbios.....	11
2.5 Análise estatística pelo teste de Scott – Knott.....	13
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1 Obtenção dos nódulos e isolamento de rizóbios nativos.....	15
3.2 Caracterização fenotípica dos rizóbios nativos.....	17
3.3 Avaliação da eficiência na fixação simbiótica do nitrogênio pelos isolados de rizóbios nativos.....	18
3.4 Caracterização genética dos isolados de rizóbios nativos..	20
3.4.1 Extração do DNA genômico dos rizóbios.....	20
3.4.2 Amplificação do DNA genômico por oligonucleotídeos iniciadores.....	22
3.4.3 Análise dos produtos da amplificação.....	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	25
4.1 Isolamento de rizóbios nativos.....	25
4.2 Caracterização fenotípica dos isolados.....	27
4.2.1 Tempo de nodulação dos isolados utilizados na avaliação da eficiência simbiótica.....	27
4.2.2 Morfologia colonial.....	29
4.2.3 Produção de melanina.....	31
4.3 Avaliação da eficiência simbiótica dos isolados de rizóbios em plantas de <i>Lotus glaber</i> em casa de vegetação.....	32
4.3.1 Capacidade de nodulação e produção de matéria seca da parte aérea.....	32
4.3.2 Nitrogênio total acumulado na parte aérea e índice de eficiência relativa na fixação simbiótica do nitrogênio....	35
4.4 Avaliação da eficiência simbiótica dos isolados de rizóbios em plantas de <i>Lotus subiflorus</i> em casa de vegetação.....	38
4.4.1 Capacidade de nodulação e produção de matéria seca da parte aérea.....	39
4.4.2 Nitrogênio total acumulado na parte aérea e índice de eficiência relativa na fixação simbiótica de nitrogênio....	42

4.5	Diversidade genotípica dos isolados.....	45
	4.5.1 Caracterização genotípica dos isolados de rizóbios e estirpes para <i>Lotus glaber</i> .....	46
	4.5.2 Caracterização genotípica dos isolados de rizóbios e estirpes para <i>Lotus subbiflorus</i> .....	50
	4.5.3 Índice de diversidade de Shannon-Weaver.....	54
5	CONCLUSÕES .....	55
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	56
7	APÊNDICES.....	66

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Nitrogênio total acumulado na parte aérea de plantas de <i>Lotus glaber</i> inoculadas com as estirpes e os isolados estudados (Médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 1%, C.V. 28,02%, erro padrão 3,026).....	37
Figura 2 Índice de eficiência relativa na fixação simbiótica de nitrogênio dos isolados de rizóbios estudados e estirpes SEMIA 830 e U510 para <i>L. glaber</i> . (Médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 1%, C.V. 30,67, erro padrão 11,64) .....	38
Figura 3 Nitrogênio total acumulado na parte aérea de plantas de <i>Lotus subbiflorus</i> inoculadas com as estirpes e os isolados estudados (Médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 1%, C.V. 28,39%, erro padrão 2,55).....	44
Figura 4 Índice de eficiência relativa na fixação simbiótica de nitrogênio dos isolados e estirpes de rizóbio para <i>L. subbiflorus</i> estudados. (Médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 1%, C.V. 39,68, erro padrão 11,58).....	45
Figura 5 Perfil eletroforético obtido com a amplificação do DNA genômico com o primer BOX A1 dos isolados em <i>L. glaber</i> e das estirpes SEMIA 830 e U510. Gel de agarose 1,5% corado com Brometo de etídio.....	48
Figura 6 Perfil eletroforético obtido com a amplificação do DNA genômico com o primer ERIC dos isolados em <i>L. glaber</i> e das estirpes SEMIA 830 e U510. Gel de agarose 1,5% corado com Brometo de etídio.....	48
Figura 7 Dendrograma de genotipagem dos isolados para <i>L. glaber</i> nota: agrupamento obtido por UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard, para perfil de bandas obtido a partir de PCR com os oligonucleotídeos ERIC e BOX.....	49

figura 8	Perfil eletroforético obtido com a amplificação do DNA genômico com o primer BOX A1 dos isolados em <i>L. subbiflorus</i> e as estirpes SEMIA 849 e SEMIA 849. Gel de agarose 1,5% corado com Brometo de etídio.....	52
Figura 9	Perfil eletroforético obtido com a amplificação do DNA genômico com o primer ERIC dos isolados em <i>L. subbiflorus</i> e as estirpes SEMIA 849 e SEMIA 849. Gel de agarose 1,5% corado com Brometo de etídio.....	52
Figura 10	Dendrograma de genotipagem dos isolados para <i>L. subbiflorus</i> . Agrupamento obtido por UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard, para perfil de bandas obtido a partir de PCR com os oligonucleotídeos ERIC e BOX.....	53

## LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Análise das amostras de solo das localidades coletadas.....	14
Tabela 2	Programas dos ciclos utilizados na amplificação do DNA genômico com os oligonucleotídeos iniciadores ERIC1-R e ERIC2.....	23
Tabela 3	Programas dos ciclos utilizados na amplificação do DNA genômico com o oligonucleotídeo iniciador BOX.....	23
Tabela 4	Número de isolados obtidos a partir de <i>L. glaber</i> e <i>L. subbiflorus</i> em cada localidade.....	25
Tabela 5	Localidade amostrada, morfologia colonial e tempo necessário para nodulação dos isolados de rizóbios avaliados quanto à eficiência simbiótica em <i>L. Glaber</i> .....	29
Tabela 6	Localidade, morfologia colonial e tempo necessário para nodulação dos isolados de rizóbios avaliados quanto à eficiência simbiótica em <i>L. subbiflorus</i> .....	30
Tabela 7	Massa seca da parte aérea, massa seca dos nódulos e número de nódulos formados em plantas de <i>L. glaber</i> inoculadas com os isolados de rizóbio estudados e as estipes SEMIA 830 e U510 (média de 4 repetições).....	34
Tabela 8	Massa seca da parte aérea, massa seca dos nódulos e número de nódulos formados em plantas de <i>L. subbiflorus</i> inoculadas com os isolados de rizóbio estudados e as estipes SEMIA 849, SEMIA 850 e U510 (média de 4 repetições).....	41

## LISTA DE APÊNDICES

	Página
APÊNDICE 1 Meio extrato de levedura-manitol - LMAV (Vincent, 1970).....	67
APÊNDICE 2 Meio extrato de levedura-triptona (LT) (Somasegaram & Hoben, 1994).....	68
APÊNDICE 3 Solução Nutritiva (Sarruge, 1974).....	69
APÊNDICE 4 Composição da mistura ( <i>master mix</i> ) para as reações de PCR.....	70
APÊNDICE 5 Gráfico da variação da temperatura ambiente na casa de vegetação observada durante os 97 dias após a inoculação nos vasos de cultivo.....	71
APÊNDICE 6 Características dos isolados de rizóbios obtidos em <i>Lotus glaber</i> Mill.(= <i>Lotus tenuis</i> Waldst. et Kit. ex Wild.)...	72
APÊNDICE 7 Características dos isolados de rizóbios obtidos em <i>Lotus subbiflorus</i> Lag. (syn. <i>Lotus hispidus</i> Desf.).....	80

## 1 INTRODUÇÃO

As leguminosas são particularmente importantes devido a sua capacidade em estabelecer simbiose com rizóbios, bactérias que nodulam suas raízes e fixam nitrogênio atmosférico, elevando, assim, o valor nutricional tanto como alimentos para uso direto para humanos como forragem para o gado. Esta fixação tem se tornado cada vez mais importante em vista dos esforços para desenvolvimento de uma agricultura mais econômica e sustentável.

Entre as leguminosas com grande potencial forrageiro encontram-se as espécies introduzidas do gênero *Lotus*, que apresentam boa adaptação a solos de baixa fertilidade e capacidade de fixação simbiótica de N. Outra característica importante é o elevado conteúdo de taninos condensados, que reduz a ocorrência de timpanismo no gado e tornam estas espécies de plantas importantes para o estudo e introdução em áreas de pecuária do sul do Brasil.

A utilização de leguminosas forrageiras, além de contribuir para o aumento da oferta de forragem com alto teor de proteína, também pode ser de grande importância se estas forem usadas como cobertura vegetal de solos susceptíveis a erosão. O Brasil conta, hoje, com mais de 117 milhões de hectares que são utilizados como pastagens, sendo considerados tanto campos nativos como áreas de pastagens cultivadas.

Quando se deseja a introdução e o estabelecimento de leguminosas em novos ambientes, nem sempre se encontram populações de rizóbios efetivas na fixação de nitrogênio na microbiota do solo. Esta situação pode ser evitada caso existam estirpes eficientes que possam ser inoculadas, favorecendo o desenvolvimento e o rendimento das pastagens com leguminosas, neste caso, para espécies do gênero *Lotus*. As bactérias capazes de nodular as espécies de *Lotus* incluem tanto cepas de crescimento intermediário (*Mesorhizobium loti*) como de crescimento lento (*Bradyrhizobium* sp.)

Estas bactérias são selecionadas para maior eficiência de fixação de nitrogênio em simbiose com a planta nos ambientes e solos a serem empregados. No Brasil, os últimos trabalhos com seleção de rizóbios datam da década de 80, realizados pelo Dr. Elemar Brose a partir de solos de Santa Catarina. Estes dados sugerem a existência, em solos do sul do Brasil, de uma população diversa de rizóbios capazes de realizar a simbiose com estas leguminosas.

O banco nacional (coleção SEMIA) de estirpes disponíveis para estas leguminosas é muito pequeno, e, em se tratando de estirpes recomendadas para a produção de inoculantes, este número se reduz ainda mais. Também não são conhecidas a infectividade e efetividade dos rizóbios nas diferentes espécies de *Lotus*. Tampouco se conhece a existência de população de rizóbios nativos nos solos do sul do Brasil capazes de nodular espécies de *Lotus*, nem a variabilidade de tal população.

O número reduzido de estirpes para estas forrageiras, a falta de experimentação com avaliação de eficiência simbiótica e a necessidade de implantação desta leguminosa, nas condições dos solos do estado do Rio Grande do Sul, mostram a importância de trabalhos de isolamento e seleção de rizóbios nativos comprovadamente eficientes na fixação simbiótica do nitrogênio. Com base nas hipóteses de que: 1) existem, nos solos do Rio Grande do Sul, populações de rizóbios nativos eficientes na fixação de nitrogênio com plantas das espécies *Lotus subbiflorus* e *Lotus glaber*, o que poderia viabilizar a implantação da cultura no estado; e 2) existe grande diversidade na população de rizóbios nativos que podem nodular espécies de leguminosas do gênero *Lotus* sp. em solo de áreas de campo natural, este trabalho foi realizado visando o isolamento e a seleção de rizóbios nativos, eficientes na fixação simbiótica de nitrogênio em plantas de *Lotus subbiflorus* e *Lotus glaber*, de solos de diversas áreas do estado do Rio Grande do Sul bem como a caracterização da eficiência simbiótica e a caracterização genética dos isolados obtidos..

## 2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA:

### 2.1 Características das leguminosas estudadas

Quando se pretende estabelecer a introdução de um organismo exótico, é preciso que ele tenha características que venham fazer frente às adversidades do local onde será implantado.

*Lotus glaber* Mill.(=*Lotus tenuis* Waldst. et Kit. ex Wild.) é uma forrageira perene, de crescimento prostrado que se ajusta a ambientes úmidos de clima temperado (Blumenthal e McGraw, 1999), como solos de áreas arroseiras. Tem crescimento ótimo no outono e na primavera, contudo tolera baixas temperaturas e cobertura de gelo (Vigniola *et al.*, 1999). Tem por distribuição primária o noroeste europeu, bacia do mediterrâneo e sudoeste asiático e posteriormente foi introduzida na Argentina e partes dos EUA (Blumenthal e McGraw, 1999), além do Chile. No Chile, esta espécie está presente nas pastagens da zona central do país e tem uma contribuição importante na produção forrageira, especialmente durante a temporada estival, em solos argilosos que eventualmente recebem água de irrigação (Barrientos *et al.*, 2002), inclusive crescendo de forma espontânea nas áreas arroseiras.

Vigniola *et al.* (1999) descreveram a colonização por *Lotus glaber* em campo alagado na região centro-oeste da Argentina. Sua resistência foi atribuída ao aumento do número de raízes adventícias, que por sua vez apresentaram boa taxa de nodulação. Insausti (2004) pesquisou a concorrência por nichos abertos aleatoriamente nesta região devido aos eventos meteorológicos, e concluiu que *L. glaber* apresenta características que permitem a sobrevivência nesta área. Striker (2005), por outro lado, em trabalho de campo, detectou persistência do crescimento desta leguminosa, mas com baixa no potencial hídrico ( $\Psi_w$ ), o que resultou em decréscimo de dois terços da sua produtividade. A planta também se adapta a ambientes de muita salinidade. Mujica e Rumi (1999) constataram boa resistência a salinidade na germinação de duas estirpes de *L. glaber* oriundos da bacia do Rio Salado, Argentina, região também conhecida por pH muito alto. Clua *et al.* (2005) avaliaram diferentes genótipos do vegetal quanto à tolerância à salinidade nesta mesma região e detectaram diferentes graus de tolerância a este fator. As populações tolerantes não variavam significativamente quanto ao controle sem adição de NaCl, enquanto que os suscetíveis tiveram decréscimo de 60 a 100% em relação ao controle.

*Lotus subbiflorus* Lag. (syn. *Lotus hispidus* Desf.) foi introduzida no Rio Grande do Sul desde a década de 40 (Paim e Riboldi, 1991), encontrando-se de forma espontânea em áreas de antigas coleções. É muito usado no Uruguai, principalmente na região da fronteira com o Brasil e Argentina (Ciluti *et al.*, 2003). Além disso, *L. subbiflorus* apresenta adaptação para solos ácidos (Lowther *et al.*, 1987). Não foi encontrado, no entanto, ampla disponibilidade de

trabalhos detalhados sobre a avaliação desta espécie no estado e em outras localidades.

A cultivar *el Rincón* (*L. subbiflorus*) é de procedência uruguaia e tem sido muito estudada na estação experimental la Estanzuela (Uruguai). No Brasil, esta variedade também tem sido utilizada em experimentação e introduzida em pastagens. Na Estação Experimental Agronômica da UFRGS, Paim e Riboldi (1991) acompanharam o desenvolvimento e compararam o rendimento de três espécies de *Lotus*, sendo que *Lotus corniculatus* se destacou como maior produtor de massa vegetal em todos os cortes ao longo do experimento de 2 anos de duração. Já *L. subbiflorus* foi semelhante a *L. corniculatus* com relação à produtividade nos cortes realizados na primavera e no outono. Observa-se nos dados do trabalho que a estirpe usada como inoculante foi eficiente para *L. corniculatus*, mas não para *L. uliginosus* e nem para *L. subbiflorus*.

## **2.2 A simbiose entre rizóbios e espécies do gênero *Lotus***

Quando se deseja a introdução e o estabelecimento de leguminosas em novos ambientes, nem sempre se encontram populações de rizóbios efetivas (tanto qualitativamente como quantitativamente) na fixação de nitrogênio na microbiota do solo. Esta situação pode ser evitada caso existam estirpes eficientes que possam ser inoculadas, favorecendo o desenvolvimento e o rendimento das pastagens com leguminosas, como no caso do gênero *Lotus*. As bactérias capazes de nodular as espécies de *Lotus* incluem tanto

cepas de crescimento rápido (*Mesorhizobium loti*) como de crescimento lento (*Bradyrhizobium* sp.) (Jordan, 1982, 1994; Jarvis *et al.*, 1997).

Apesar da maioria das estirpes bacterianas destes dois gêneros serem capazes de nodular a maioria das espécies de *Lotus*, parece existir uma especificidade particular na simbiose *Lotus*/rizóbios. Espécies como *L. corniculatus* e *L. glaber* geralmente estabelecem associações efetivas com *Mesorhizobium* sp. (Baraibar *et al.*, 1999; Labandera, 2007) , enquanto que espécies como *L. subbiflorus* e *L. uliginosus* o fazem preferencialmente com *Bradyrhizobium* sp. (Irisarri *et al.*, 1996).

No Uruguai, tem sido observada uma série de problemas. Um deles é a grande dificuldade de implantação de *L. subbiflorus* e *L. uliginosus* em solos onde havia anteriormente *L. corniculatus* e *L. glaber*. Os rizóbios eficientes em um grupo de especificidade comportam-se como parasitas em outro (Irisarri *et al.*, 1996; Baraibar *et al.*, 1999; Labandera (comunicação pessoal)). No entanto, existem certas estirpes como NZP2037 (Pankhurst *et al.* 1987) que são capazes de estabelecer simbiose efetiva com todas as espécies, mas ainda não está claro se esta efetividade simbiótica é expressa em níveis ótimos com todas as espécies de *Lotus*.

A variabilidade na simbiose de *Lotus*/rizóbios foi estudada por Baraibar *et al.* (1999) que obtiveram, em dez amostras de solo do Uruguai, 50 isolados que demonstraram especificidade para *L. corniculatus*. Os autores identificaram *Rhizobium loti* (atualmente conhecido como *Mesorhizobium loti*) e *R. leguminosarum* bv. *Trifolii*, o que não descarta a existência de outras espécies. Foi encontrada uma boa variabilidade entre os isolados para as

características estudadas. No Brasil, poucos trabalhos têm sido realizados visando o isolamento e seleção de estirpes para *Lotus*. Kolling *et al.* (1983) realizaram trabalhos de seleção de estirpes para *Lotus corniculatus*. Brose (1992 b) isolou 13 estirpes a partir de *Lotus pedunculatus* de solo ácido, com diferentes capacidades de fixação de N, sendo que duas delas, apesar de produzirem grandes nódulos, se mostraram ineficientes como fixadoras. O autor também demonstrou a existência, em solos do sul do Brasil, de rizóbios capazes de realizar a simbiose com plantas do gênero *Lotus*.

Em solos com população de rizóbios estabelecida é necessário que a estirpe eficiente do inoculante seja capaz de competir pela nodulação e ter capacidade de sobreviver e crescer no solo sem seu hospedeiro. Vance e Graham (1995) perceberam que o sucesso do inoculante é inversamente proporcional à população nativa de rizóbios. Rupela e Sudarshana (1990) constataram maior número de nódulos oriundos de rizóbios nativos nodulando grão-de-bico do que do próprio inoculante.

### **2.3 Caracterização das culturas bacterianas de rizóbios**

Características como resistência a antibióticos (Mueller *et al.*, 1988), resistência a fungicidas (Curley & Burton, 1975), tolerância à pH baixo (Munns & Keyser, 1981; Munns e Cooper, 1985; Oliveira e Magalhães, 1999), à seca e tolerância a temperaturas elevadas (Munevar & Wollum II, 1981; Graham, 1992), produção de bacteriocina (Schwingamer & Brockwell, 1978); tolerância a salinidade (Cassán *et al.*, 2005), entre outras, são consideradas

características importantes na seleção de estirpes de rizóbios com adaptabilidade nas regiões com condições adversas.

### 2.3.1 Produção de melanina

Apesar da capacidade de produção de melanina ser amplamente encontrada em estirpes de *Rhizobium*, existem diferenças fisiológicas entre espécies do gênero. Por este motivo, a capacidade de produção desse pigmento em meio de cultura, foi utilizada para a caracterização de isolados de rizóbios nativos de soja (Keyser *et al.*, 1982; Hungria *et al.*, 2001) e feijoeiro (Sá, 2001; Andrade *et al.*, 2002, Giongo, 2003).

Pouco se sabe sobre a função da melanina em rizóbios. Alguns autores citam que talvez ela seja utilizada para polimerizar moléculas fenólicas que surjam por ocasião da senescência de nódulos, destoxificando esses compostos que normalmente são letais para a bactéria (Hynes & Priefer, 1988). Estudos indicam que a produção de melanina não está relacionada com a fixação biológica de nitrogênio (Lamb *et al.*, 1982; Cubo *et al.*, 1997), embora os genes *mel*, responsáveis pela produção de melanina, estejam no plasmídeo simbiótico *sym* (Hawkins & Johnston, 1988). Estudos recentes indicam que a produção de melanina evoluiu paralelamente em grupos diferentes de organismos para a proteção a estresses ambientais, exceto em organismos patogênicos em que está relacionado com aumento da virulência (Plonka & Grabacka, 2006).

Segundo Romero-Martinez *et al.* (2000), normalmente a melanina é formada durante um período de estresse biótico ou abiótico ao qual os rizóbios estão expostos, servindo como uma ferramenta de auxílio no aumento da capacidade de sobrevivência no ambiente e competição em situações particulares, como as já mencionadas anteriormente.

### **2.3.2 Capacidade de fixação biológica do nitrogênio.**

A fixação biológica de nitrogênio na simbiose com leguminosas forrageiras tem sido avaliada no estado com ênfase no macro-hospedeiro. Scheffer-Basso *et al* (2001) compararam o desenvolvimento, a morfologia, o acúmulo de matéria seca e a fixação de nitrogênio com rizóbios em *Adesmia latifolia* e cornichão (*Lotus corniculatus*) cv. São Gabriel e perceberam diferenças no desenvolvimento de cada planta, mas atribuíram os resultados ao hábito de crescimento de cada espécie.

Para uma leguminosa em fase inicial de caracterização, como *Lotus* sp., tais observações são muito relevantes como base para de se iniciar um estudo em campo. Segundo Bliss (1987), na ausência de fatores físicos limitantes e na presença de rizóbio efetivo, a densidade e o padrão da nodulação são controlados pela planta, embora o meio circundante produza grandes variações.

Brose (1992b) selecionou rizóbios para *L. uliginosus* a partir de solos de Santa Catarina. Em seu experimento, pode-se perceber a distinção de dois grupos de estirpes quanto a nodulação, produção de matéria seca e acúmulo de nitrogênio na parte aérea.

## 2.4 Avaliação da variabilidade genética dos rizóbios.

Consideráveis avanços foram conseguidos, nos últimos anos, pelo emprego de técnicas de biologia molecular nos estudos de taxonomia e diversidade de rizóbio. Nos estudos de diversidade genética de isolados de rizóbios têm sido freqüentemente utilizadas a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com oligonucleotídeos iniciadores como BOX A1, ERIC e REP, e a análise dos perfis dos produtos de DNA obtidos após a reação que permitem a diferenciação das estirpes (Versalovic *et al.*, 1991, 1994; De Bruijn, 1992; Selenska-Pobell *et al.*, 1995; Hungria *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 1999; Chueire *et al.*, 2000b; Mostasso *et al.*, 2002; Carvalho, 2003; Giongo, 2003).

Além da análise de PCR têm sido utilizados outros métodos como a análise do polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) das regiões do 16S rRNA, o 23S rRNA e o espaço intergênico (IGS), usado para detectar diferenças entre gêneros e espécies, sendo possível discriminar, inclusive, linhagens geneticamente relacionadas (Young *et al.*, 1991; Laguerre *et al.*, 1996; Terefework *et al.*, 1998; Tesfaye & Holl, 1998; Vinuesa *et al.*, 1998; Chueire *et al.*, 2000a; Tan *et al.*, 2001).

Para fins de determinação da diversidade genética e agrupamento por similaridade, a técnica de PCR parece demonstrar bons resultados. Fernandes *et al.* (2003) analisaram rizóbios isolados dos tabuleiros costeiros do Sergipe empregando três técnicas: PCR com o oligonucleotídeo específico BOX; PCR-RPFL da região do DNA que codifica para o gene 16S rRNA e da região intergênica entre 16S e 23S rRNA, com cinco enzimas de restrição; e seqüenciamento parcial da região 16S rRNA. Os resultados obtidos neste

estudo revelaram diversidade genética elevada entre as estirpes nativas e confirmam que a análise por BOX-PCR é eficiente para discriminá-las, mas como já relatado por outros autores (Laguerre *et al.*, 1997; Chueire *et al.*, 2000b) nem sempre foi adequada nas avaliações filogenéticas, onde houve coerência entre as análises envolvendo a região do 16S rRNA, mas o agrupamento com uma das estirpes diferiu pela análise do espaço intergênico.

Nos estudos conduzidos para avaliar a qualidade dos inoculantes, Chueire *et al* (2000b) estudaram a variabilidade das estirpes de *Bradyrhizobium* sp. e *Rhizobium* sp. (coleção SEMIA) recomendadas respectivamente para soja e feijoeiro. Desde 1992, variantes naturais destas estirpes foram incluídas na coleção SEMIA. Não foi possível, no entanto, diferenciar entre as estirpes parentais e as variantes, dentro de cada par de estirpes de *Bradyrhizobium* pela análise sorológica de aglutinação com anticorpos de células totais, ou com anticorpos de lipopolissacarídeos celulares. Contudo, no estudo foi possível distinguir as quatro estirpes pela reação de amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD). Os autores observaram que as estirpes SEMIA 5079, SEMIA 5080 e as duas outras recomendadas para o uso em inoculantes comerciais, SEMIA 587 e SEMIA 5019 (= 29w), mostraram perfis diferenciados pela técnica de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores REP e ERIC, no entanto, o REP e ERIC-PCR produziram perfis idênticos para os pares de estirpes SEMIA 566 X SEMIA 5079 e SEMIA 586 X SEMIA 5080. Tanto o RAPD como o REP e ERIC-PCR mostraram perfis distintos para as duas estirpes de *Rhizobium*, SEMIA 4077 (=CIAT 899) e SEMIA 4080 (=PRF 81).

## 2.5 Análise estatística pelo teste de Scott - Knott

Com o objetivo de eliminar a ambigüidade na interpretação dos cálculos estatísticos, foram propostos métodos aglomerativos, destacando-se o de Scott - Knott (1974). O teste de Scott - Knott foi comparado por Silva (1998) com o teste de Tukey, t, Scheffé, Newman Keuls modificado e t-bayesiano, com relação à precisão, número de tratamentos, número de repetições e nível de significância, em um estudo de simulação, sendo avaliado quanto ao poder e taxas de erro tipo I. De acordo com os resultados obtidos, o aumento do número de tratamentos do experimento afetou o desempenho dos testes, destacando-se o teste de Scott - Knott, por ser o mais poderoso e controlar adequadamente as taxas de erro tipo I, apesar de a taxa de erro por experimento (“experimentwise”) aparentemente apresentar valores um pouco acima do nível de significância nominal do teste, quando utilizou-se  $H_0$  parcial.

Von Pinho *et al.* (1997) aplicaram o teste de Duncan aos resultados de um experimento com genótipos da cultura do algodoeiro, em que foram avaliados 35 genótipos em casa-de-vegetação e 32 em condições de campo e Souza, Maluf e Gomes (1997) utilizaram o teste de Tukey para comparar os resultados de um experimento com cultivares, linhagens, híbridos experimentais e comerciais de beringela, totalizando 29 tratamentos. Os dados deste dois trabalhos foram recalculados por Ferreira *et al.* (1999) e os resultados apresentados nestes trabalhos evidenciam o efeito da ambigüidade, exigindo em algumas características a utilização de até 15 letras do alfabeto na discriminação das médias de tratamentos, o que, sem dúvida, deve ter trazido dificuldades aos autores na discussão dos resultados.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Procurou-se realizar a coleta de plantas de *Lotus* sp. em áreas com histórico de cultivo dessas espécies. Quando isto não foi possível, coletou-se solo da rizosfera de outras leguminosas forrageiras nativas, como *Desmodium* spp. e *Stylosanthes* spp. As amostras de solo foram coletadas em oito localidades (Tabela 1).

Tabela 1: Análise das amostras de solo das localidades coletadas

Localidade	Argila (%)	pH H <sub>2</sub> O	MO (%)	Al	Ca	Mg	K	P
				(cmol <sub>c</sub> *dm <sup>-3</sup> )				
Hulha Negra	13	5,0	3,1	0,6	5,0	1,8	73	4,0
Eldorado do Sul	21	5,1	1,7	0,2	2,2	1,1	118,0	12,0
Rio Pardo	13	5,4	2,6	0,1	3,4	1,6	83,0	31,0
Mostardas	9	5,6	1,8	0,0	3,3	0,9	159,0	67,0
Bagé	14	5,0	4,0	0,2	5,5	2,6	66,0	7,6
Passo Fundo	22	6,5	8,0	0,0	12,4	11,3	347,0	23,0

Obs.: Análise realizada no laboratório de Análise de Solos da Faculdade de Agronomia da UFRGS. MO= matéria orgânica.

Amostras de plantas de diferentes espécies de *Lotus* foram coletadas em Bagé e Porto Alegre. Cada amostra foi acondicionada em saco plástico fechado, identificada e mantida à temperatura ambiente durante o transporte até o laboratório. Foram anotados dados de campo, do local de coleta de cada amostra, como: tipo de solo, o relevo, a localização pelo sistema de posicionamento global (GPS), descrição do tipo de vegetação local, bem

como a provável espécie da planta de onde se coletou solo rizosférico, além de documentação fotográfica. Os procedimentos para isolamento de rizóbios a partir de amostras de solo foram realizados no prazo máximo de uma semana, e de nódulos em 24 horas.

### **3.1 Obtenção dos nódulos e isolamento de rizóbios nativos**

Para a obtenção de nódulos, visando o isolamento de rizóbios nativos a partir de amostras de solo, sementes de *L. subiflorus* Lag. (syn. *Lotus hispidus* Desf.) e *L. glaber* Mill (= *Lotus tenuis* Waldst. et Kit. ex Wild) (cedidas pelo Dr. Miguel Dall'Agnol) foram previamente desinfestadas por imersão em etanol (70%) por 30 segundos seguido de imersão em Hipoclorito de Sódio (5%) e lavadas em água destilada esterilizada por 7 vezes sucessivas. Após, as sementes foram colocadas para germinar em papel filtro, previamente esterilizado em autoclave, e incubadas a 28°C em estufa. Após 24 horas, as plântulas foram colocadas em vasos do tipo *Leonard* contendo, na parte superior, mistura de vermiculita e areia (na proporção de 2:1) previamente esterilizados em autoclave a 120 °C por 90 minutos. Na parte inferior dos vasos foi adicionada solução nutritiva (Apêndice 3) isenta de nitrogênio e esterilizada em autoclave. Em cada vaso, foi inoculado 10ml de suspensão da amostra de solo de cada localidade (10g de solo em 90ml de solução salina NaCl 0,85% esterilizada em autoclave). Cada amostra de solo foi inoculada em dois vasos, contendo duas plantas cada.

As plantas foram cultivadas por 30 dias a partir da data de inoculação do solo. Após este período, as plantas foram coletadas e seus nódulos foram retirados e classificados conforme tamanho e cor e utilizados para o isolamento dos rizóbios.

Os nódulos foram desinfestados usando-se a mesma metodologia utilizada para desinfestação de sementes, descrita anteriormente. Os nódulos foram macerados com pinça esterilizada sobre Placas de Petri contendo meio extrato de levedura manitol com vermelho congo (meio LMV) e ágar (Apêndice 1) e espalhados na placa e colocados a incubar a 28 °C até aparecimento de crescimento bacteriano. As culturas obtidas foram purificadas utilizando-se a técnica de esgotamento de inóculo por estrias em placas com LMV ágar até obtenção de colônias isoladas, homogêneas e com características persistentes. As colônias foram então inoculadas em tubos de ensaio contendo meio LM ágar inclinado. As culturas foram, então, inoculadas em frascos contendo 10 ml de Caldo LM e incubadas em agitador orbital a 28°C, com agitação de 120 rpm por 7 dias. Após, alíquotas de 0,5 ml da cultura foram colocadas em tubos de microcentrifuga contendo 0,5 ml de Glicerol 50%(v:v), esterilizado em autoclave a 120°C por 20 minutos. Os tubos foram então homogeneizados e deixados por 4 horas em temperatura ambiente e depois colocados em freezer para crio-prezervação.

Plantas de *Lotus* sp. coletadas a campo tiveram seus nódulos destacados, lavados e desinfestados, procedendo-se o isolamento conforme metodologia descrita acima.

### 3.2 Caracterização fenotípica dos rizóbios nativos

Os isolados obtidos foram caracterizados quanto à morfologia colonial e produção de goma em meio LMV ágar durante o período de incubação de 10 dias em estufa a 28 °C.

Determinou-se a capacidade dos isolados em formar nódulos em plantas de *Lotus*, bem como a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico em simbiose. Para isto, desinfestou-se sementes de *L. subbiflorus* e *L. glaber* conforme metodologia descrita no item 3.1 e realizou-se a pré-germinação em papel filtro esterilizado. As plantas foram colocadas em tubos de vidro de 250 mm de comprimento e 24 mm de diâmetro, contendo gel formado com solução Nutritiva (Apêndice 3) sem nitrogênio e ágar (7,5 g. L<sup>-1</sup>) e esterilizado em autoclave a 120 °C por 20 minutos. Os tubos foram colocados em um lampadário com um fotoperíodo de 12 horas. Cada isolado foi inoculado em dois tubos. O desenvolvimento das plantas foi acompanhado diariamente com a finalidade de se determinar o tempo de nodulação, bem como a coloração dos nódulos formados. Observando-se a ausência da formação de nódulos, o isolado era descartado.

A produção de melanina dos isolados foi avaliada conforme o método de Cubo *et al.* (1988). Culturas crescidas em meio Triptona Levedura (meio TY - Apêndice 2) por 48 horas foram inoculadas em placas de Petri com meio TY suplementado com L-tirosina (600 µg mL<sup>-1</sup>) e CuSO<sub>4</sub> (40 µg mL<sup>-1</sup>). Após sete dias de incubação, as colônias foram tratadas com 50 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% (peso/volume) em tampão TBE para liberação da

enzima intracelular, que polimeriza tirosina, formando um pigmento escuro. Como controle negativo foi utilizada a estirpe CIAT 899 (SEMIA 4077), conhecida como não produtora de melanina (Cubo *et al.*, 1988; Gao & Borthakur, 1995) e como positivos os isolados 7E e 1AG, de rizóbios nativos isolados de solos de São Paulo (Sá, 2001).

### **3.3 Avaliação da eficiência na fixação simbiótica do nitrogênio pelos isolados de rizóbios nativos**

O experimento foi realizado utilizando vasos do tipo *Leonard*, confeccionados conforme descrito no item 3.1. As sementes foram desinfestadas e pré-germinadas, conforme descrito no mesmo item, e plantadas após 24 horas de germinação. Após o plantio das sementes pré-germinadas, foi realizada a inoculação com alíquotas de 5 ml de cada cultura bacteriana previamente crescida em meio LM por 7 dia a 28°C com agitação de 120rpm, contendo cerca de  $10^8$  ufc/mL.

Para a avaliação da eficiência simbiótica de fixação de nitrogênio em casa de vegetação, deu-se prioridade para os isolados que mostraram uma amplitude de características morfológicas em LMV ágar e que induziram nodulação, no experimento de autenticação dos isolados, em até 45 dias. Para *L. glaber*, foram estudados os tratamentos inoculados com a estirpe SEMIA 830 e com a estirpe U510, proveniente do Uruguai (cedida pelo Dr. Carlos Labandera), além dos isolados UFRGS Lg4, UFRGS Lg9, UFRGS Lg13, UFRGS Lg19, UFRGS Lg29, UFRGS Lg30, UFRGS Lg108, UFRGS Lg113,

UFRGS Lg119, UFRGS Lg121, UFRGS Lg124, UFRGS Lg138, UFRGS Lg144, UFRGS Lg149, UFRGS Lg156 e UFRGS Lg166. Para *L. subbiflorus* foram utilizados tratamentos inoculados com as estirpes SEMIA 849 e SEMIA 850, a estirpe Uruguaia U510 e os isolados UFRGS Ls1, UFRGS Ls9, UFRGS Ls14, UFRGS Ls22, UFRGS Ls23, UFRGS Ls29, UFRGS Ls36, UFRGS Ls50, UFRGS Ls54, UFRGS Ls57, UFRGS Ls58, UFRGS Ls62, UFRGS Ls63, UFRGS Ls65 e UFRGS Ls71. Além dos tratamentos inoculados, foram utilizados dois tratamentos controle não inoculados, para cada espécie de *Lotus* estudada, um sem a adição de nitrogênio e outro com adição de solução  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (20 g/L), aplicados parceladamente, duas vezes por semana, ao longo do experimento, equivalente a adição de 100 Kg de nitrogênio por hectare.

O experimento foi conduzido por 97 dias em casa de vegetação em um delineamento em blocos ao acaso com cinco repetições. A parte aérea das plantas foi separada do sistema radicular, em corte próximo à base do caule, acondicionada em sacos de papel etiquetados e colocada em estufa a 60-65°C, com aeração forçada, para secagem até atingir peso constante. Após, foi determinada a massa seca da parte aérea em balança digital semi-analítica. Os nódulos foram retirados um a um da raiz e contados para determinação do número de nódulos e colocados em sacos de papel etiquetados. A seguir foram colocados em estufa com aeração forçada para secagem até atingirem peso constante e após foram pesados para determinação da massa de nódulos secos em balança digital semi-analítica. O teor total de Nitrogênio foi determinado pelo método semi micro Kjeldall (Tedesco *et al.*, 1995). A análise estatística dos dados foi realizada pela comparação de médias com teste de

Scott-Knott (1% de significância). Determinou-se o índice de eficiência relativa (Brockwell *et al.*, 1966), para comparação da eficiência na fixação de nitrogênio.

### **3.4 Caracterização genética dos isolados de rizóbios nativos:**

Para a determinação da diversidade e caracterização genética dos rizóbios obtidos, realizou-se a análise do perfil eletrofóretico dos fragmentos de DNA pela amplificação do DNA genômico dos isolados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores BOX A1 e ERIC.

#### **3.4.1 Extração do DNA genômico dos rizóbios**

O DNA genômico foi extraído das culturas de rizóbio usando-se o procedimento descrito por Sá (2001). No procedimento empregado não se utiliza solução de lisozima para ruptura celular, as quantidades de SDS e perclorato de sódio são reduzidas e não se utiliza solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico para a precipitação de proteínas e impurezas.

Para a redução da produção de polissacarídeos, os rizóbios foram inoculados em meio TY (Apêndice 2) e incubados a 28°C durante 48 horas em agitação constante. Alíquotas de 750 µL do caldo de cultura foram transferidas para microtubos esterilizados, centrifugadas e submetidas a lavagens com soluções salinas por duas vezes, e aplicado um pulso de 12000 rpm em

centrifuga para coleta de células. O precipitado (pelet) formado foi suspenso em 100 µL de EDTA salina (EDTA 10mM pH 8; NaCl 150mM) e adicionado de 100 µL de SDS 20% (50°C) e mantido em banho de água a 50°C por 15 minutos com eventuais agitações suaves. Após o rompimento da parede celular, foi adicionado 50 µL de Perclorato de Sódio 5M, gota a gota, e homogeneizado. Em seguida se adicionou 500 µL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), se homogeneizou e centrifugou a 12000 rpm por 5 minutos. Retirou-se a fase aquosa com o auxílio de uma pipeta, e se conduziu para um novo microtubo, onde se adicionou 250 µL de NaCl 4M e a mistura foi homogeneizada, para a precipitação do DNA. Adicionou-se 20 µL uma suspensão de sílica (1g. L<sup>-1</sup>), se homogeneizou suavemente e em seguida se levou para banho de água a 55°C por 5 minutos, agitando suavemente ocasionalmente. Foi aplicado um pulso de 12000 rpm e o pelet foi lavado com Solução G (NaCl 50mM; Tris pH 7,5 10mM; EDTA 2,5mM em Etanol 50%) e em seguida o pellet foi seco em câmara de vácuo por uma hora. O pellet foi novamente suspenso em H<sub>2</sub>O ultrapura e levado para banho de água a 40°C por 10 minutos. Se centrifugou a 12000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi então armazenado sob refrigeração (-20°C) em um novo tubo de reação.

Para verificar-se o produto da extração, amostras de DNA foram aplicadas em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 0,5x. O carregamento do gel foi realizado preparando-se uma mistura de 5 µL de amostra de DNA mais 3 µL de tampão de carregamento (sacarose 40% ; azul de bromofenol 0,25%).

### 3.4.2 Amplificação do DNA genômico por oligonucleotídeos iniciadores.

O DNA genômico dos isolados e das estirpes foi amplificado usando-se os seguintes nucleotídeos iniciadores:

1. ERIC- correspondendo a seqüências repetitivas intergênicas de enterobactérias (de Bruijn, 1992):

ERIC1-R - (5' - ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C - 3')

ERIC-2 - (5' - AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G - 3').

2. BOX A1- amplifica regiões conservadas e repetitivas do DNA cromossômico (Versalovic *et al.*, 1994).

BOX A1 - (5' -CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3').

As reações foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por Richardson *et al.* (1995) modificado (Apêndice 4). As condições empregadas para o oligonucleotídeo ERIC e BOX A1 são descritas na tabela 2 e 3 respectivamente. A temperatura de anelamento para ERIC foi estipulada em 51°C, enquanto que para BOX foi estipulada em 53°C.

Em todos os experimentos de amplificação do DNA genômico, utilizaram-se como controle negativo reações contendo 20 µL da mistura master mix e 5 µL de água ultra pura esterilizada.

Tabela 2 - Programas dos ciclos utilizados na amplificação do DNA genômico com os oligonucleotídeos iniciadores ERIC1-R e ERIC2

<b>Ciclo</b>	<b>n.º de vezes</b>	<b>Temperatura – Tempo</b>
1	1	95 °C - 7 min
2	30	94 °C - 1 min
		51 °C - 1 min
		65 °C - 8 min
3	1	65 °C - 16 min
4		4 °C -∞

Tabela 3 - Programas dos ciclos utilizados na amplificação do DNA genômico com o oligonucleotídeo iniciador BOX

<b>Ciclo</b>	<b>n.º de vezes</b>	<b>Temperatura – Tempo</b>
1	1	95 °C - 7 min
2	30	94 °C - 1 min
		53 °C - 1 min
		65 °C - 8 min
3	1	65 °C - 16 min
4		4 °C -∞

Para fim de comparação, as estirpes recomendadas SEMIA 830, SEMIA 849 e SEMIA 850, além da estirpe U510 e a estirpe EEL698 (cedida pelo pesquisador Edemar Brose - EPAGRI) também tiveram seu produto de PCR analisado em perfil de bandas. As amplificações foram repetidas no mínimo duas vezes para verificação da reprodutibilidade do perfil de bandas para cada oligonucleotídeo.

### 3.4.3 Análise dos produtos da amplificação.

Os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1x durante três horas a 80 V. Um padrão de massa molecular de DNA Lambda EcoR1/HindIII foi utilizado na primeira, na central e na última canaleta dos géis. O perfil de bandas no gel foi transformado em uma matriz binária bidimensional, pelo programa GelPro Analyser 3.1, onde 0 (zero) indicava a ausência de banda e 1 (um) a presença. A similaridade/dissimilaridade genética entre os isolados foi medida pelo coeficiente de Jacard (i,j) que não considera as similaridades negativas. As matrizes foram analisadas em conjunto pelo programa NTSYS-PC 2.01a e os dendrogramas obtidos pelo método de agrupamento Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages (UPGMA) pelo programa SAHN CLUSTERING do NTSYS.

O índice de Shannon (Shannon-Weaver, 1948) para a diversidade dos isolados foi calculado usando-se a fórmula  $H = C / N (N \times \log N - \sum n_i \times \log n_i)$ , onde o  $n_i$  corresponde ao número dos isolados com o mesmo perfil para o PCR dos dois oligonucleotídeos, N corresponde ao número total dos isolados e C é uma constante igual a 2,3.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Isolamento de rizóbios nativos

Das oito amostras de solo das diferentes localidades estudadas, somente em Arroio dos Ratos e Hulha Negra não foram isolados rizóbios. Em cinco obteve-se nodulação em plantas de *Lotus glaber*, tendo sido obtidos 259 isolados de rizóbios (Tabela 4). As amostras de solo das localidades de onde se obtiveram isolados para esta espécie foram Bagé, Eldorado do Sul, Passo Fundo, Porto Alegre e Rio Pardo. Em *Lotus subbiflorus*, apenas nas amostras de solo das localidades de Mostardas e Porto Alegre houve a formação de nódulos de onde foram obtidos 68 isolados bacterianos (Tabela 4).

Tabela 4: Número de isolados obtidos a partir de *L. glaber* e *L. subbiflorus* em cada localidade

Localidade	<i>Lotus glaber</i>	<i>Lotus subbiflorus</i>
Arroio dos Ratos	-	-
Bagé	35	-
Eldorado do Sul	18	-
Hulha Negra	-	-
Mostardas	-	48
Passo Fundo	107	0
Porto Alegre	29	28
Rio Pardo	70	-
TOTAL/espécie	259	76

Legenda: - = ausência de nodulação

Na maior parte das amostras de solo pôde-se isolar rizóbios para *L. glaber* enquanto que isto não foi observado em *L. subbiflorus*. Este resultado pode ser devido ao fato de que, no estado, *L. corniculatus* (cornichão) é a espécie de *Lotus* mais difundida e que tem sido cultivada desde 1940 (Paim e Riboldi, 1991). Embora o cultivo de *L. glaber* não seja expressivo no estado, o grande número de isolados obtidos para esta espécie (Tabela 4) pode estar relacionado ao fato de que os rizóbios (*Mesorhizobium* sp.) capazes de estabelecer simbiose com cornichão são também capazes de estabelecer simbiose com *L. glaber* (Baraibar *et al.*, 1999; Labandera, 2007), formando um grupo de inoculação cruzada.

Deve-se salientar que as amostras de solo provenientes de Eldorado do Sul, Passo Fundo e Porto Alegre correspondem a áreas experimentais onde têm sido cultivadas diversas espécies de *Lotus* e outras leguminosas forrageiras. Desta forma, os isolados de rizóbios, oriundos destas localidades e capazes de nodular *L. glaber* e *L. subbiflorus*, poderiam não ser originados de população microbiana autóctone e sim de população introduzida juntamente com as sementes destas leguminosas utilizadas em experimentação. Em áreas sem histórico de cultivo anterior, de onde se obteve rizóbios capazes de nodular estas espécies de *Lotus* é possível que estes rizóbios sejam autóctones. No entanto, este fato não invalida trabalhos de seleção de estirpes mais eficientes a partir de população de rizóbios já adaptadas às condições de tais solos.

Os nódulos obtidos de plantas, tanto de *L. glaber* como de *L. subbiflorus*, possuíam tamanho de 1 a 5 mm e a coloração interna verde ou vermelha. Esta observação foi mais evidente em plantas de *L. glaber* inoculadas com amostra de solo de Bagé e plantas de *L. subbiflorus* inoculadas com amostra de solo de Mostardas que apresentaram nódulos de diversos tamanhos e colorações na mesma planta, o que poderia indicar a nodulação por rizóbios diferentes.

## **4.2 Caracterização fenotípica dos isolados**

Todos os isolados obtidos foram caracterizados quanto à morfologia colonial, ao tempo de aparecimento do primeiro nódulo na planta (tempo de nodulação), e quanto à capacidade para produção de melanina. Os resultados da avaliação de morfologia e do tempo para formação de nódulos são mostrados nos Apêndices 6 e 7. As plantas inoculadas com os isolados de rizóbio diferiram quanto ao tempo de aparecimento dos nódulos, que variou de 9 a 90 dias (Apêndice 6 e 7).

### **4.2.1 Tempo de nodulação dos isolados utilizados na avaliação da eficiência simbiótica**

Nenhum relato anterior sobre observações quanto as diferenças no tempo para o aparecimento de nódulos, conforme verificado nas plantas inoculadas no experimento de autenticação dos isolados de rizóbios, foi encontrado na bibliografia pesquisada. Na avaliação da capacidade de

nodulação, entre as plantas de *L. glaber* inoculadas, observou-se que os isolados UFRGS Lg124 e UFRGS Lg138 induziram nódulos em apenas 13 dias de condução do ensaio (Tabela 5). Enquanto que nas plantas inoculadas com os isolados UFRGS Lg166 e UFRGS Lg108 o aparecimento dos nódulos ocorreu aos 36 dias e 44 dias, respectivamente (Tabela 5).

Já em *L. subbiflorus*, observou-se que no tratamento inoculado com o isolado UFRGS Ls62 os nódulos apareceram 11 dias após a inoculação (Tabela 6). Nas plantas inoculadas com os isolados UFRGS Ls1, UFRGS Ls23, UFRGS Ls29, UFRGS Ls57, UFRGS Ls63 e UFRGS Ls71 observou-se o aparecimento dos nódulos aos 31 dias (Tabela 6).

#### **4.2.2 Morfologia colonial**

Os rizóbios estudados quanto à eficiência em *L. glaber*, exceto os isolados UFRGS Lg30, UFRGS Lg121 e UFRGS Lg138 (com colônias pequenas e com pouca produção de goma, características de *Bradyrhizobium*), apresentaram colônias de 4 a mais de 10 mm de diâmetro, com cerca de 5 a 7 dias de crescimento em placas com meio LMV ágar e muita produção de goma (Tabela 5, Apêndice 6). Estas características são comumente observadas em colônias de estirpes dos gêneros *Mesorhizobium* e *Rhizobium* (Barberi *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2003), o que indicaria que estes isolados poderiam pertencer a estes gêneros. Observações semelhantes foram obtidas nos trabalhos de Baraibar *et al.* (1999) e Labandera (2007), e as características dos

isolados obtidos em *L.glaber* sugerem que esta espécie pode ser nodulada tanto por *Mesorhizobium* como por *Bradyrhizobium*.

Tabela 5: Localidade amostrada, morfologia colonial e tempo necessário para nodulação dos isolados de rizóbios avaliados quanto à eficiência simbiótica em *L. glaber*.

Isolados	Local	Nodul.* (dias)	Diâmetro da colônia	Produção de goma	Densidade ótica
UFRGS Lg4	Rio Pardo	18	>10mm	muita	translúcida
UFRGS Lg9	Rio Pardo	18	5mm	muita	translúcida
UFRGS Lg13	Rio Pardo	20	>10mm	muita	translúcida
UFRGS Lg19	Rio Pardo	25	>5mm	muita	translúcida
UFRGS Lg29	Rio Pardo	34	>10mm	muita	translúcida
UFRGS Lg30	Rio Pardo	34	2mm	média	translúcida
UFRGS Lg108	Porto Alegre	44	6mm	muita	translúcida
UFRGS Lg113	Porto Alegre	28	6mm	muita	translúcida
UFRGS Lg119	Porto Alegre	28	4mm	muita	translúcida
UFRGS Lg121	Porto Alegre	15	2mm	média	translúcida
UFRGS Lg124	Porto Alegre	13	9mm	muita	translúcida
UFRGS Lg138	Passo Fundo	13	2mm	média	translúcida
UFRGS Lg144	Passo Fundo	28	>10mm	muita	translúcida
UFRGS Lg149	Passo Fundo	28	6mm	muita	translúcida
UFRGS Lg156	Passo Fundo	28	8mm	muita	translúcida
UFRGS Lg166	Passo Fundo	36	6mm	muita	translúcida

Legenda: nodul. = nodulação

Tabela 6: Localidade, morfologia colonial e tempo necessário para nodulação dos isolados de rizóbios avaliados quanto à eficiência simbiótica em *L. subbiflorus*.

Isolados	Local	Nodul.* (dias)	Diâmetro da colônia	Produção de goma	Densidade ótica
UFRGS Ls1	Mostardas	31	2mm	Pouca	Translúcida
UFRGS Ls9	Mostardas	15	1,5mm	Pouca	Translúcida
UFRGS Ls14	Mostardas	13	1mm	pouca	translúcida
UFRGS Ls22	Mostardas	13	2mm	Pouca	Translúcida
UFRGS Ls23	Mostardas	31	1mm	Pouca	Translúcida
UFRGS Ls29	Mostardas	31	<1mm	Não	Opaca
UFRGS Ls36	Mostardas	16	2mm	Pouca	Opaca
UFRGS Ls50	Porto Alegre	14	1mm	Pouca	Translúcida
UFRGS Ls54	Porto Alegre	14	<1mm	Pouca	Opaca
UFRGS Ls57	Porto Alegre	31	2mm	Pouca	Opaca
UFRGS Ls58	Porto Alegre	14	<1mm	Pouca	Opaca
UFRGS Ls62	Porto Alegre	11	1mm	Pouca	Translúcida
UFRGS Ls63	Porto Alegre	31	2mm	Pouca	Opaca
UFRGS Ls65	Porto Alegre	14	1mm	Pouca	Opaca
UFRGS Ls71	Porto Alegre	31	1mm	Pouca	Opaca

Legenda: nodul. = nodulação

Os isolados de rizóbios estudados quanto à eficiência em *L. subbiflorus* apresentaram colônias pequenas, de menos de 1 a 2 mm de diâmetro, com 7 dias de crescimento em placas com meio LMV ágar, com pouca ou nenhuma produção de goma, (Tabela 6, Apêndice 7). Tais características são

comumente observadas em colônias de estirpes do gênero *Bradirhizobium* (Barberi *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2003), o que indicaria que estes isolados poderiam pertencer a este gênero. Dados semelhantes foram encontrados em Irisarri *et al.* (1996) e Labandera (2007), e indicam a existência de um grupo de inoculação para cada espécie de *Lotus*.

#### 4.2.3 Produção de melanina

Entre todos os isolados estudados, apenas os isolados UFRGS Lg111, UFRGS Lg121, UFRGS Lg124, UFRGS Lg125 e UFRGS Lg128, oriundos de amostra de solo de Porto Alegre e capazes de nodular plantas de *L. glaber*, produziram melanina. Nenhum dos isolados de rizóbios capazes de nodular *L. subbiflorus* foram capazes de produzir melanina. Aparentemente estes rizóbios ou não apresentam o gene *mel* (Cubo *et al.* 1997) ou falharam na expressão do mesmo.

Neste trabalho, a produção de melanina não parece ser uma capacidade muito difundida entre os isolados de rizóbios estudados, não sendo uma característica útil, no caso deste trabalho, para a diferenciação entre isolados uma vez que apenas os cinco já referidos anteriormente foram capazes de produzir melanina. A formação de melanina poderia estar relacionada a proteção contra estresses ambientais, principalmente compostos fenólicos originados da degradação da matéria orgânica do solo ou da própria senescência do nódulo (Borthakur *et al.*, 1987). Assim como encontrado no

trabalho de Giongo (2003), os solos de onde foram isolados rizóbios sem esta característica fenotípica, apresentavam baixo teor de matéria orgânica. Por outro lado, a produção de melanina foi observada em rizóbios nativos capazes de nodular feijoeiro em solo sujeito a inundações periódicas (áreas alagadas) na região de Cunha/ SP e que apresentavam maior teor de matéria orgânica (Sá, 2001).

#### **4.3 Avaliação da eficiência simbiótica dos isolados de rizóbios em plantas de *L. glaber* em casa de vegetação.**

Os 16 isolados selecionados para ensaio de eficiência, bem como a estirpe recomendada SEMIA 830 e a estirpe U510, induziram nodulação e fixaram nitrogênio em simbiose com plantas de *L. glaber* sob condições de casa de vegetação (Tabela 7). Devido as características de planta perene que estas leguminosas de clima temperado apresentam, a condução do experimento de casa de vegetação foi de longa duração, limitando-se a 97 dias por causa da deficiência severa de nitrogênio nas plantas do controle não inoculado e sem adição de nitrogênio.

##### **4.3.1 Capacidade de nodulação e produção de matéria seca da parte aérea**

As plantas inoculadas com os isolados UFRGS Lg149, UFRGS Lg19, UFRGS Lg144, UFRGS Lg30, UFRGS Lg13, UFRGS Lg121, UFRGS Lg9 e

UFRGS Lg4 produziram o maior número médio de nódulos por planta (máximo de 203), sendo superior ao produzido pelas inoculadas com a estirpe recomendada SEMIA 830 e a estirpe U510, enquanto que as inoculadas com o isolado UFRGS Lg113 apresentaram o menor número médio de nódulos (43 nódulos/ planta) (Tabela 7).

Em relação à massa de nódulos formados nas plantas, aquelas inoculadas com os isolados que induziram a formação de maior número de nódulos, incluindo os tratamentos inoculados com os isolados UFRGS Lg166, UFRGS Lg108 e com a estirpe U510, apresentaram massa de nódulos superior à formada nas plantas inoculadas dos demais tratamentos (Tabela 7). Embora os tratamentos inoculados com os isolados UFRGS Lg166, UFRGS Lg108 e com a estirpe U510 tenham apresentado elevada massa de nódulos, não apresentaram elevado número de nódulos, indicando a formação de nódulos maiores e mais pesados. Observa-se ainda que, em relação à massa seca de nódulos formados, o tratamento inoculado com a estirpe U510 foi superior ao inoculado com a estirpe SEMIA 830, embora não tenham diferido significativamente no número de nódulos formados (Tabela 7).

Os isolados obtidos neste trabalho, apresentaram grande capacidade de induzir nodulação em *L.glaber* (203 nódulos/ planta), quando comparados com os resultados obtidos por Barrientos *et al* (2002) com cepas autóctones de regiões do Chile, cuja maior nodulação foi de 2 nódulos por planta.

Tabela 7: Massa seca da parte aérea, massa seca dos nódulos e número de nódulos formados em plantas de *L. glaber* inoculadas com os isolados de rizóbio estudados e as estipes SEMIA 830 e U510 (média de 4 repetições).

Tratamento	Massa seca da parte aérea (mg)	Massa seca dos nódulos (mg)	Número de nódulos/ planta
T+N	2.380 a	-	-
UFRGS Lg30	1.413 b	112,0 a	186 a
UFRGS Lg121	1.303 b	147,1 a	178 a
UFRGS Lg19	1.218 b	115,3 a	200 a
UFRGS Lg149	1.173 b	144,0 a	203 a
UFRGS Lg144	1.153 b	134,4 a	195 a
UFRGS Lg108	1.128 b	121,1 a	111 b
UFRGS Lg9	1.123 b	143,5 a	166 a
UFRGS Lg166	1.053 b	124,3 a	135 b
UFRGS Lg4	953 b	108,0 a	146 a
U510	733 c	116,6 a	125 b
UFRGS Lg156	690 c	93,0 b	114 b
UFRGS Lg138	655 c	93,3 b	95 b
UFRGS Lg13	573 c	85,3 b	180 a
UFRGS Lg29	525 c	73,4 b	112 b
SEMIA 830	500 c	72,0 b	98 b
UFRGS Lg113	500 c	55,4 b	43 c
UFRGS Lg124	440 c	66,3 b	107 b
UFRGS Lg119	308 c	59,1 b	103 b
T-N	35 c	-	-

Valores seguidos por letras iguais na coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott\_Knott a 1% de significância. Legenda: T+N = controle com adição de nitrogênio; T-N= sem adição de nitrogênio.

As plantas do tratamento sem inoculação e com adição de nitrogênio foram as que apresentaram a maior massa seca da parte aérea (Tabela 7). As plantas dos tratamentos inoculados com os isolados UFRGS Lg30, UFRGS Lg19, UFRGS Lg9 e UFRGS Lg4, oriundos de Rio Pardo, UFRGS Lg121 e UFRGS Lg108, de Porto Alegre e UFRGS Lg149, UFRGS Lg144 e UFRGS Lg166, oriundos de Passo Fundo, apresentaram as maiores massas, sendo superiores à produção de massa das plantas inoculadas com as estirpes SEMIA 830 e U510 e com os demais isolados (Tabela 7).

#### **4.3.2 Nitrogênio total acumulado na parte aérea e índice de eficiência relativa na fixação simbiótica de nitrogênio**

As plantas inoculadas com os isolados UFRGS Lg30, UFRGS Lg19, UFRGS Lg149, UFRGS Lg108, UFRGS Lg121, UFRGS Lg9, UFRGS Lg4, UFRGS Lg166 e UFRGS Lg144 acumularam as maiores quantidades de nitrogênio fixado na parte aérea, não diferindo das observadas nas plantas do tratamento controle sem inoculação e com adição de nitrogênio e sendo superiores ao obtido nas plantas inoculadas com as estirpes SEMIA 830 e U510, que não diferiram entre si (Figura 1). Estes isolados apresentaram Índices de Eficiência Relativa na fixação simbiótica de nitrogênio acima de 80% em relação tratamento controle com adição de nitrogênio (Figura 2) sendo superiores aos índices de eficiência relativa das estirpes SEMIA 830 e U510, respectivamente, 50 e 61%. Desta forma, estes isolados podem ser

considerados como mais eficientes na simbiose com plantas de *L.glaber* , em condições de casa de vegetação, do que a estirpe SEMIA 830, atualmente recomendada para esta espécie no Brasil, podendo ser usadas no futuro como estirpes recomendadas.

Deve-se salientar que os isolados UFRGS Lg30, UFRGS Lg19, UFRGS Lg149 e UFRGS Lg108 apresentaram, respectivamente, Índice de Eficiência Relativa de 133, 113, 104 e 103% (Figura 2), sendo, portanto, muito eficientes na fixação simbiótica de nitrogênio, pois forneceram este nutriente para a planta em quantidades semelhantes ao fornecido com a suplementação mineral via solução nutritiva (Figura 1). Dados semelhantes, em estudos com cepas para *L. glaber*, foram apresentados por Barrientos *et al.* (2002), onde três cepas induziram nitrogênio total na parte aérea do vegetal superior ao presente no controle com adição de nitrogênio.

Já as plantas do tratamento inoculado com o isolado UFRGS Lg 119 apresentaram o menor teor de nitrogênio fixado, não diferindo do teor de nitrogênio das plantas do tratamento controle não inoculado e sem adição de nitrogênio (Figura 1), o que demonstra que este isolado, embora não apresente problemas em induzir nodulação, produzindo número de nódulos similar ao das estirpes SEMIA 830 e U510 (Tabela 7), é ineficiente na fixação simbiótica de nitrogênio e não fornece este para a planta.

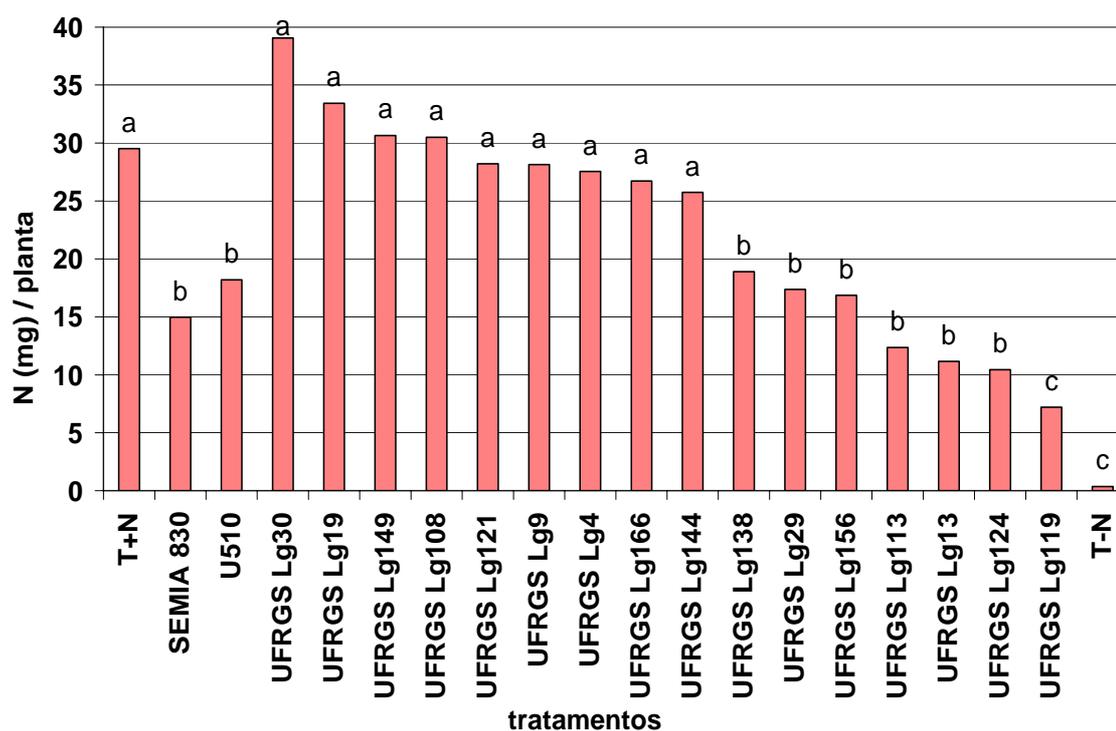


Figura 1: Nitrogênio total acumulado na parte aérea de plantas de *Lotus glaber* inoculadas com as estirpes e os isolados estudados (Médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 1%, C.V. 28,02%, erro padrão 3,026). Legenda: T+N = controle com adição de nitrogênio; T-N= sem adição de nitrogênio.

No entanto, o Índice de Eficiência Relativa (23%) obtido por este isolado (Figura 2) não diferiu dos índices obtidos pelas estirpes SEMIA 830 e U510 e pelos isolados UFRGS Lg138, UFRGS Lg29, UFRGS Lg156, UFRGS Lg113, UFRGS Lg13 e UFRGS Lg124, comparados pelo teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade de erro.

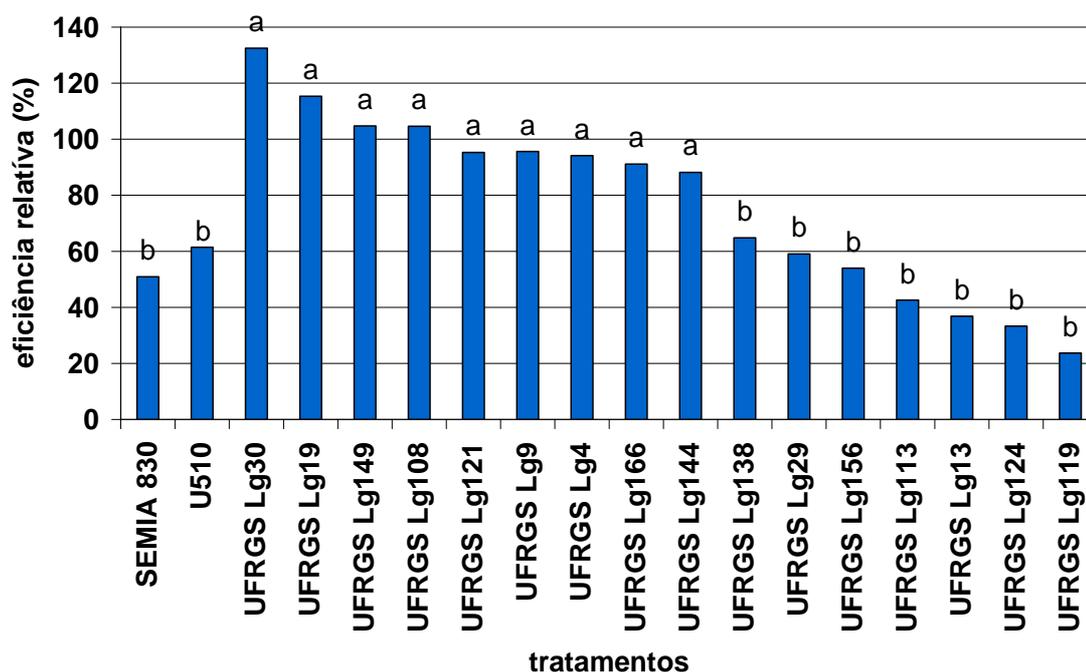


Figura 2: Índice de eficiência relativa na fixação simbiótica de nitrogênio dos isolados de rizóbios estudados e estirpes SEMIA 830 e U510 para *L. glaber*. (Médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 1%, C.V. 30,67, erro padrão 11,64)

#### 4.4 Avaliação da eficiência simbiótica dos isolados de rizóbios em plantas de *Lotus subbiflorus* em casa de vegetação

Sob condições de casa de vegetação, os isolados estudados e as estirpes recomendadas SEMIA 849 e SEMIA 850, para as plantas de *L. subbiflorus*, foram capazes de fixar nitrogênio atmosférico em simbiose com a leguminosa referida. A estirpe U510, que é recomendada para *L. corniculatus* e *L. glaber*, não foi capaz de estabelecer simbiose efetiva com *L. subbiflorus*, como já se esperava.

#### **4.4.1 Capacidade de nodulação e produção de matéria seca da parte aérea**

As plantas inoculadas com os isolados UFRGS Ls36, UFRGS Ls23, UFRGS Ls9, UFRGS Ls14, UFRGS Ls54, UFRGS Ls22, UFRGS Ls1, UFRGS Ls57 e com a estirpe SEMIA 850 produziram o maior número de nódulos do que as inoculadas com as estirpes SEMIA 849 e U510 (Tabela 8), que induziu apenas a formação de primórdios nodulares, e com os demais isolados estudados.

No entanto, em relação à massa seca de nódulos formada, as plantas inoculadas com os isolados UFRGS Ls36, UFRGS Ls23, UFRGS Ls54 e UFRGS Ls1 superaram os demais tratamentos (Tabela 8). Os tratamentos inoculados com os isolados UFRGS Ls22, UFRGS Ls14, UFRGS Ls29, UFRGS Ls58, UFRGS Ls9 e UFRGS Ls57 e estirpe SEMIA 850 formaram massa nodular intermediária sendo superior aos inoculados com os demais isolados e com a estirpe SEMIA 849. Observa-se que, apesar de formar elevado número de nódulos, as plantas inoculadas com o isolado UFRGS Ls57 formaram menor massa nodular e baixo acúmulo de massa na parte aérea (Tabela 8), indicando a formação de nódulos pequenos e ineficientes.

Os isolados avaliados neste trabalho demonstram grande capacidade de nodulação em comparação com os rizóbios nativos avaliados em *L. uliginosus* por Barrientos *et al.* (2002) e que produziram menos de dois nódulos por planta em experimento conduzido por 45 dias.

Em relação à produção de matéria seca da parte aérea (Tabela 8), nenhum tratamento inoculado obteve maior produção do que o tratamento com

adição de nitrogênio mineral. As plantas de *L. subbiflorus* inoculadas com os isolados UFRGS Ls36 e UFRGS Ls23, oriundos de Mostardas, apresentaram produção de matéria seca superior a todos os demais tratamentos inoculados, inclusive com a estirpe recomendada SEMIA 850. Os tratamentos inoculados com os isolados UFRGS Ls1, UFRGS Ls22 e UFRGS Ls9, oriundos também de Mostardas, assim como UFRGS Ls54, de Porto Alegre, e os inoculados com a estirpe SEMIA 850 apresentaram maior massa de parte aérea do que os inoculados com o restante dos isolados e com a estirpe SEMIA 849.

Atualmente no Brasil, apenas a estirpe SEMIA 849 é recomendada para produção de inoculante para *L. subbiflorus*. No entanto, esta estirpe foi originalmente isolada de *L. divaricatus*. Em adição, dados de campo mostraram que a estirpe SEMIA 850, por sua vez isolada de *L. subbiflorus*, mostrou a maior indução de matéria seca (Péres, 2007).

Irrisari *et al.* (1996), trabalhando com isolados oriundos de solo do Uruguai, obtiveram resultado satisfatório com um tratamento, no qual constataram uma produção média de massa seca da parte aérea de 2,6g por planta, superando a estirpe padrão NZP2037 em 0,8g. No entanto, os autores não utilizaram controles positivo e negativo, o que dificulta as comparações entre os resultados. Já os resultados obtidos neste trabalho, utilizando controles positivo e negativo, mostraram produção superior ao obtido nas plantas inoculadas com as estirpes atualmente recomendadas, indicando que tais isolados podem ser promissores em estudos a campo.

Tabela 8: Massa seca da parte aérea, massa seca dos nódulos e número de nódulos formados em plantas de *L. subbiflorus* inoculadas com os isolados de rizóbio estudados e as estipes SEMIA 849, SEMIA 850 e U510 (média de 4 repetições).

tratamento	Massa seca da parte aérea (mg)	Massa seca dos nódulos (mg)	Número de nódulos/ planta
T+N	2.055 a	-	-
UFRGS Ls36	1.318 b	144,0 a	235 a
UFRGS Ls23	1.270 b	123,5 a	224 a
UFRGS Ls1	1.018 c	114,5 a	169 a
UFRGS Ls9	903 c	82,5 b	215 a
UFRGS Ls22	855 c	102,8 b	191 a
SEMIA 850	853 c	89,0 b	208 a
UFRGS Ls54	778 c	120,3 a	193 a
UFRGS Ls14	678 d	96,3 b	199 a
UFRGS Ls58	570 d	84,0 b	132 b
UFRGS Ls29	360 e	86,0 b	106 b
UFRGS Ls57	358 e	48,5 c	165 a
UFRGS Ls65	273 e	34,8 c	124 b
UFRGS Ls62	248 e	31,5 c	131 b
SEMIA 849	208 e	38,8 c	78 b
UFRGS Ls71	193 e	34,5 c	120 b
UFRGS Ls50	180 e	20,3 c	75 b
UFRGS Ls63	168 e	22,5 c	113 b
U 510	48 e	0 c	0 c
T-N	48 e	-	-

Valores seguidos por letras iguais na coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott\_Knott a 1% de significância. Legenda: T+N = controle com adição de nitrogênio; T-N= sem adição de nitrogênio.

#### **4.4.2 Nitrogênio total acumulado na parte aérea e índice de eficiência relativa na fixação simbiótica de nitrogênio**

As plantas inoculadas com os isolados UFRGS Ls36 e UFRGS Ls23 acumularam os maiores teores de nitrogênio fixado na parte aérea, inclusive superando o teor acumulado nas plantas do tratamento controle sem inoculação e com adição de nitrogênio e do tratamento inoculado com a estirpe SEMIA 850 (Figura 3). Estes isolados apresentaram índices de eficiência relativa na fixação simbiótica de nitrogênio de 159 e 128%, respectivamente (Figura 4), sendo mais eficientes na simbiose com plantas de *L.subbiflorus*, nas condições de condução do experimento em casa de vegetação, do que as estirpes atualmente recomendadas para esta espécie no Brasil (Brasil, 2006).

Um grupo intermediário foi formado pelos tratamentos inoculados com os isolados UFRGS Ls14, UFRGS Ls9, UFRGS Ls22, UFRGS Ls1, UFRGS Ls54 e com a estirpe SEMIA 850 que apresentaram índices de eficiência relativa acima de 70% (Figura 4), sendo superiores ao obtido nas plantas inoculadas com a estirpe SEMIA 849, e com os demais isolados.

A estirpe SEMIA 850, neste ensaio, demonstrou uma boa capacidade de fixar nitrogênio, já a estirpe SEMIA 849 igualou-se ao controle sem adição de N. O isolado UFRGS Ls57 apresentou baixa eficiência na fixação de nitrogênio (Figura 4), apesar de induzir uma grande quantidade de nódulos e pequena massa nodular (Tabela 8), mostrando desta forma que muitos nódulos pequenos e ineficientes foram formados. Este fenômeno tem sido observado em outros trabalhos (Brose, 1992a; Brose, 1992b; Giongo, 2003; Laguerre *et*

*al.*, 2003; Maâtallah *et al.*, 2002) podendo ser a razão das dificuldades de implantação desta espécie de *Lotus*, em determinadas áreas onde tais rizóbios possam predominar no solo, de forma semelhante ao observado em estudos com ervilha (Laguerre *et al.*, 2003).

Os resultados obtidos neste trabalho foram superiores aos relatados em experimento com *L. uliginosus* por Barrientos *et al.* (2002), que observaram eficiência relativa satisfatória em apenas duas estirpes, sendo que em ambos os casos o acúmulo de nitrogênio na parte aérea do vegetal foi de 7% a mais do que o controle com adição de nitrogênio.

Os rizóbios com alto potencial de fixação de nitrogênio em *L. subbiflorus*, analisados neste trabalho, podem significar aumento de produção de massa vegetal a campo. Paim e Riboldi (1991) concluíram em seu trabalho que a produção de *L. corniculatus* em área com outras espécies espontâneas foi superior a de *Lotus subbiflorus* e de *Lotus uliginosus*. No entanto, os autores mencionam o uso de um único inoculante para todas as espécies de *Lotus*, sendo possivelmente a causa do baixo resultado observado com *L. subbiflorus*.

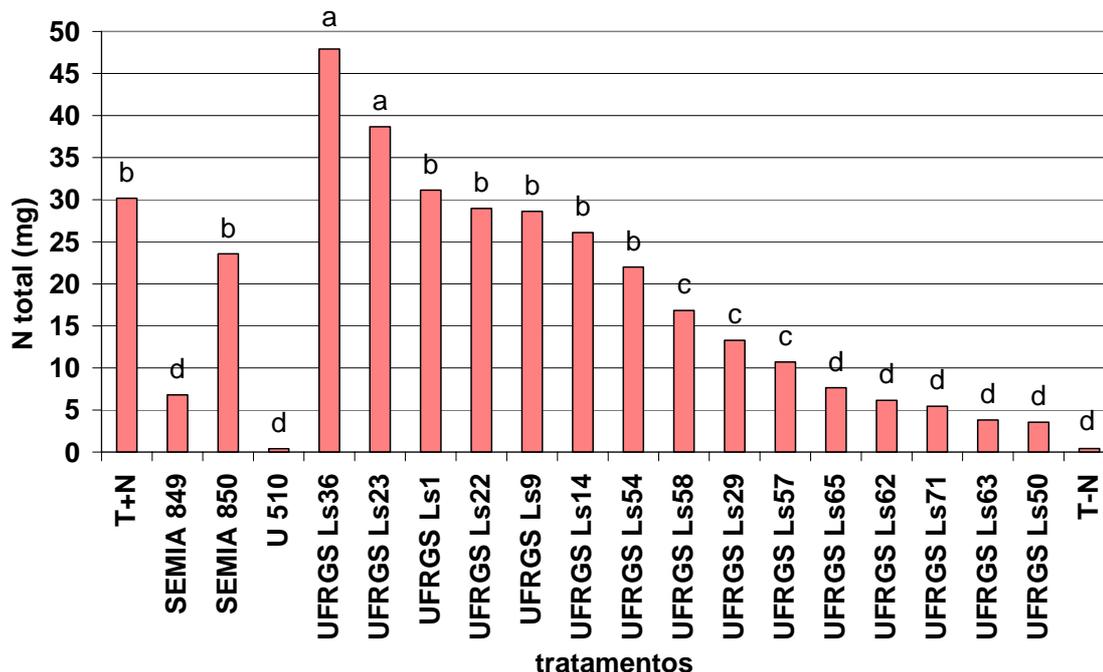


Figura 3: Nitrogênio total acumulado na parte aérea de plantas de *Lotus subbiflorus* inoculadas com as estirpes e os isolados estudados (Médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 1%, C.V. 28,39%, erro padrão 2,55). Legenda: T+N = controle com adição de nitrogênio; T-N= sem adição de nitrogênio.

Irisarri *et al.*(1996) relataram que rizóbios isolados a partir de *L. corniculatus* ou de *L. glaber* quando inoculados em *L. subbiflorus*, se mostravam ineficientes e induziam nódulos pequenos e ineficientes, porém com pigmentação vermelho forte na superfície do nódulo. Tal fenômeno também foi observado neste trabalho de forma semelhante ao que ocorre em plantas de *Lotus uliginosus* que apresentam coloração vermelha na superfície dos nódulos e que também está presente no caule das plantas sendo uma característica da espécie.

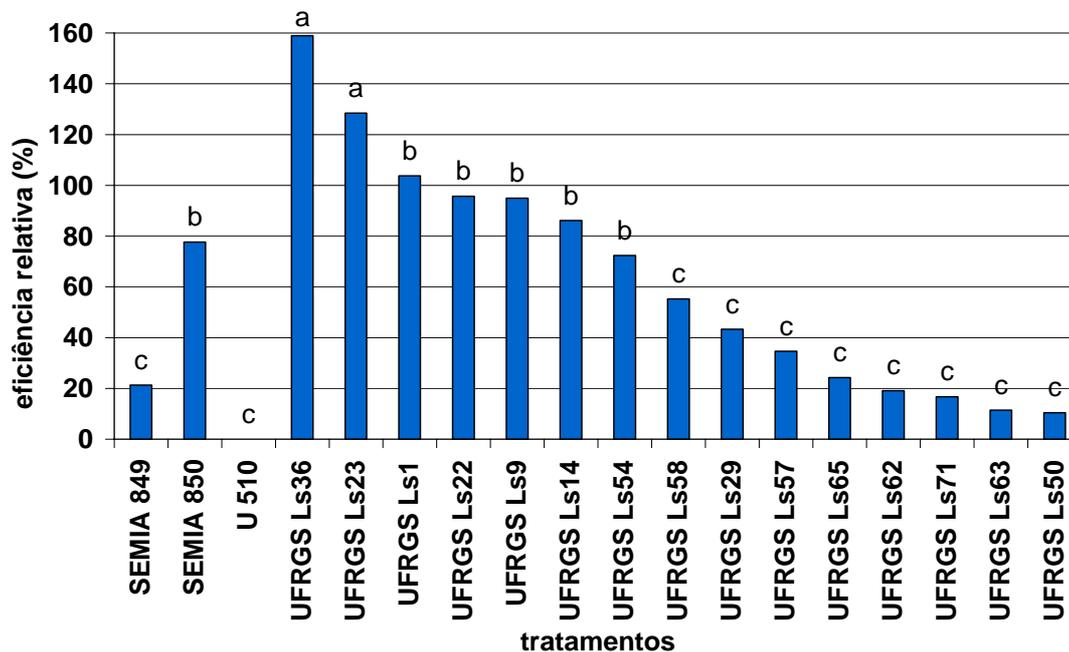


Figura 4: Índice de eficiência relativa na fixação simbiótica de nitrogênio dos isolados e estirpes de rizóbio para *L. subbiflorus* estudados. (Médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 1%, C.V. 39,68, erro padrão 11,58).

Os índices de eficiência relativa dos isolados UFRGS Lg30, UFRGS Lg19, UFRGS Lg149 e UFRGS Lg108 (Figura 2) e dos isolados UFRGS Ls36 e UFRGS Ls23 (Figura 4) foram superiores a 100%, apesar de apresentarem produção de matéria seca da parte aérea inferior ao tratamento controle com adição de nitrogênio (Tabelas 7 e 8), devido ao teor de nitrogênio da parte aérea das plantas destes tratamentos (Figuras 1 e 3).

#### 4.5 Diversidade genotípica dos isolados

A caracterização genotípica dos isolados de rizóbios estudados quanto a eficiência simbiótica, mostrou grandes diferenças quando analisados

quanto ao perfil eletroforético de fragmentos de DNA oriundos da amplificação do DNA genômico pela PCR com os oligonucleotídeos iniciadores BOXA1 e ERIC.

#### **4.5.1 Caracterização genotípica dos Isolados de rizóbios e estirpes para *Lotus glaber***

O perfil eletroforético obtido com a amplificação do DNA genômico com o oligonucleotídeo iniciador BOX A1 é mostrado na Figura 5 e o perfil da amplificação com ERIC na Figura 6. O dendrograma formado pelo agrupamento dos perfis de bandas dos isolados de rizóbios e estirpes para *L.glaber* é mostrado na Figura 7.

Na figura 7, observa-se que o isolado UFRGS Lg113, oriundo da amostra de solo de Porto Alegre, de uma área experimental onde se tem histórico de inoculação freqüente com diferentes estirpes, é destacado com apenas 25% de similaridade com os demais rizóbios estudados. Também pode-se observar que os isolados estudados não mostraram similaridade com as estirpes U510 e SEMIA 830, o que descarta a possibilidade de se ter recuperado uma destas estirpes do campo.

Na análise de agrupamento conjunto do perfil de bandas obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores BOXA1 e ERIC, os isolados UFRGS Lg138, UFRGS Lg166, UFRGS Lg144 e UFRGS Lg156, todos oriundos de amostra de

solo de Passo Fundo, e o isolados UFRGS Lg 19 e UFRGS Lg 29, obtidos da amostra de Rio Pardo, mostraram similaridade absoluta (100%).

No entanto, embora estes isolados mostrem similaridade na análise do perfil de bandas da PCR com estes oligonucleotídeos iniciadores, os índices de eficiência relativa na fixação de nitrogênio em simbiose com plantas de *L.glaber* (Figura 2), indicam que os isolados UFRGS Lg166 e Lg144 são diferentes dos isolados UFRGS Lg138 e Lg156. O mesmo pode ser observado com o isolado UFRGS Lg19, que apresentou índice de eficiência relativa de 115%, e o isolado UFRGS Lg29, de 59% . Isto pode ser explicado pelo fato de os oligonucleotídeos iniciadores não serem específicos para rizóbios (de Bruijn, 1992; Versalovic, 1994) e apresentarem distribuição aleatória no genoma.

Entre os isolados que apresentaram índice de eficiência relativa acima de 80% (Figura 2), isolados UFRGS Lg30, Lg121 e Lg108, a análise dos perfis eletroforéticos da PCR com BOXA1 e ERIC mostrou que estes apresentaram menos de 40% de similaridade entre si e apenas 30% de similaridade com as estirpes SEMIA830 e U510 (Figura 7). Estes resultados indicam que estes isolados eficientes não são re-isolamentos de estirpes recomendadas. Não foram observados identidade total entre isolados obtidos de localidades diferentes.

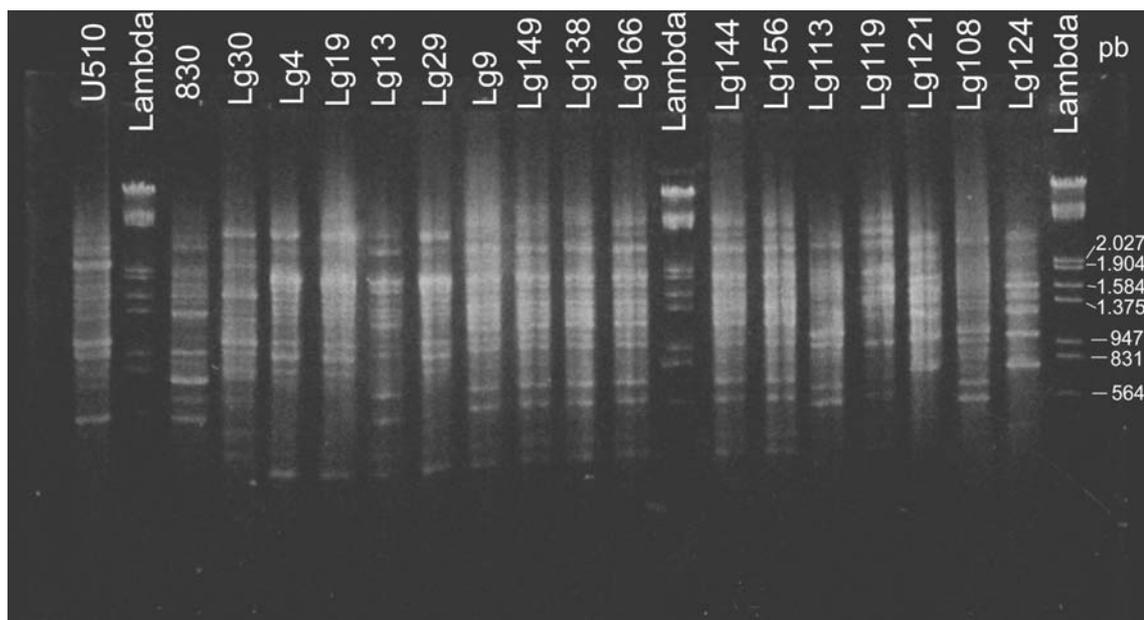


Figura 5: perfil eletroforético obtido com a amplificação do DNA genômico com o primer BOX A1 dos isolados em *L. glaber* e das estirpes SEMIA 830 e U510. Gel de agarose 1,5% corado com Brometo de etídio

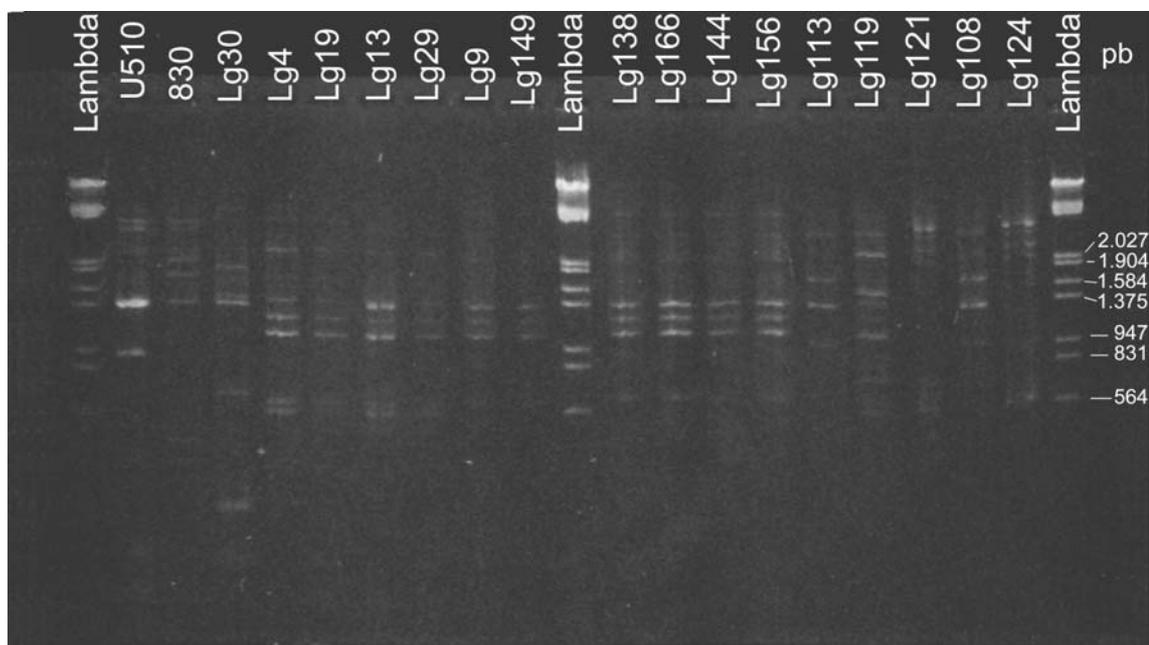


Figura 6: perfil eletroforético obtido com a amplificação do DNA genômico com o primer ERIC dos isolados em *L. glaber* e das estirpes SEMIA 830 e U510. Gel de agarose 1,5% corado com Brometo de etídio

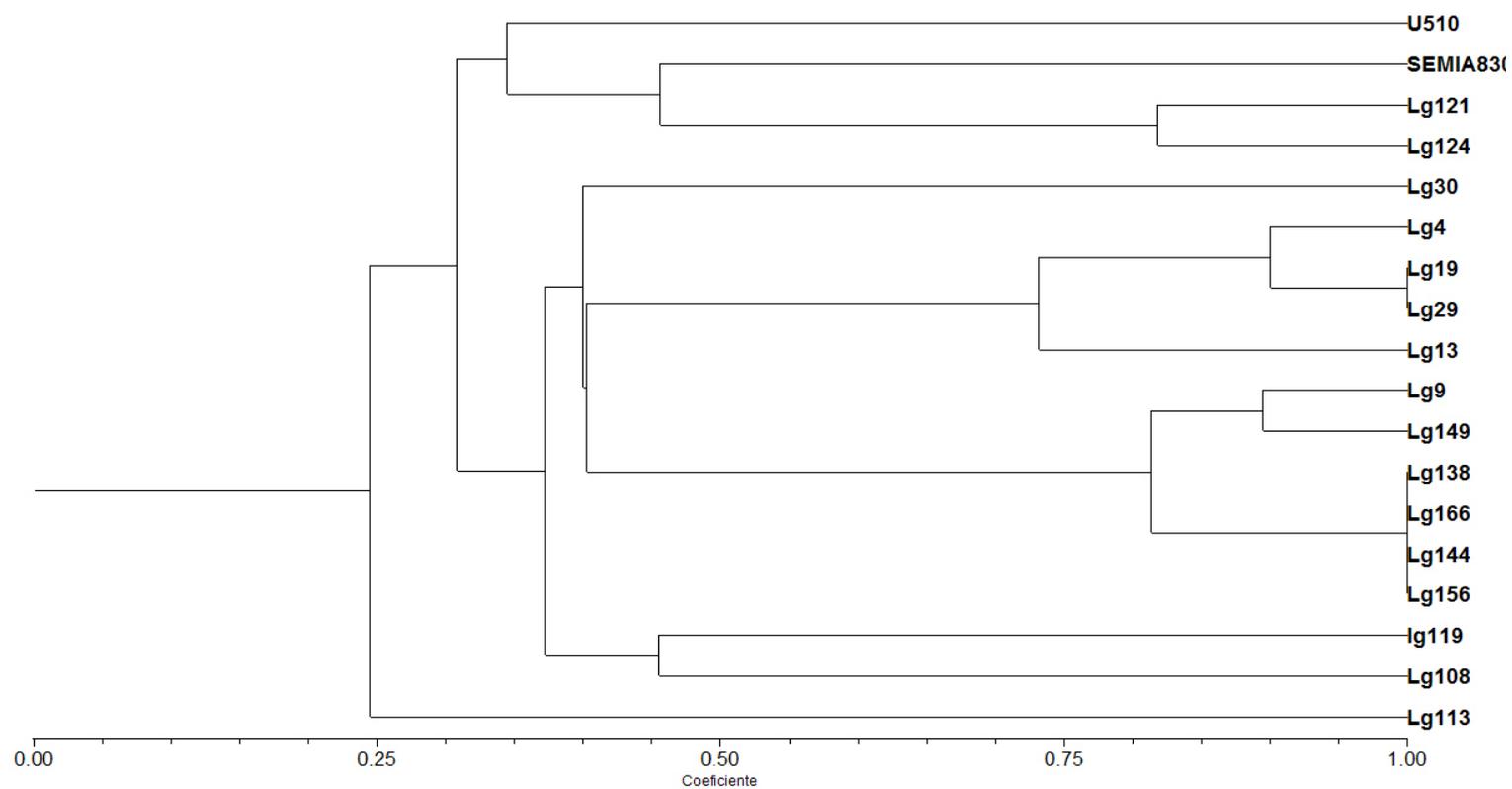


Figura 7: Dendrograma de genotipagem dos isolados para *L. glaber*.. Agrupamento obtido por UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard, para perfil de bandas obtido a partir de PCR com os oligonucleotídeos ERIC e BOX.

#### 4.5.2 Caracterização genotípica dos Isolados de rizóbios e estirpes para *Lotus subbiflorus*

O perfil eletroforético obtido com a amplificação do DNA genômico com o primer BOX A1 é mostrado na Figura 8 e a amplificação com ERIC na Figura 9. O dendograma formado pelo agrupamento dos perfis de bandas dos isolados de rizóbios e estirpes para *L. subbiflorus* é mostrado na Figura 10.

Como observado na figura 10, o isolado UFRGS Ls9, oriundo de amostra de solo de Mostardas, apresentou similaridade de 60% com a estirpe SEMIA 850, sendo o mais semelhante a esta estirpe. A estirpe recomendada SEMIA 849, bem como uma estirpe eficiente em *L. subbiflorus*, EEL698, oriunda de Santa Catarina, apresentaram menos de 50% de similaridade com os demais rizóbios utilizados na avaliação de eficiência em associação com *L. subbiflorus*.

Na análise de agrupamento conjunto do perfil de bandas obtidos com os oligonucleotídeos iniciadores BOXA1 e ERIC, os isolados UFRGS Ls36, e UFRGS Ls22, originados de amostra de solo de Mostardas, demonstram similaridade absoluta (100%). O mesmo é observado entre os isolados UFRGS Ls50, UFRGS Ls65, UFRGS Ls57 e UFRGS Ls71, todos oriundos de amostra de solos de Porto Alegre. No entanto, apesar dos isolados UFRGS Ls36 e UFRGS Ls22 apresentarem o mesmo perfil de fragmentos de DNA da PCR, os índices de eficiência relativa na fixação de nitrogênio em simbiose com plantas de *L. subbiflorus* (Figura 4), mostraram que eles são diferentes entre si. Para os isolados UFRGS Ls50, UFRGS Ls65, UFRGS Ls57

e UFRGS Ls71, por outro lado, os dados obtidos com a avaliação genotípica vêm a corroborar com os dados obtidos na avaliação de eficiência relativa de fixação de nitrogênio (Figura 4), sugerindo que eles podem ser isolamentos de um mesmo rizóbio, todos isolados de amostra de solo de Porto Alegre.

Entre os isolados que apresentaram índice de eficiência relativa acima de 70% (Figura 4), o isolado UFRGS Ls1 foi o único que apresentou similaridade de 85% com o isolado UFRGS Ls14, ambos oriundos de Mostardas. Os demais isolados apresentaram similaridade inferior a 40%.

O método de extração do DNA cromossômico sem utilização de fenol (Sá, 2001) se mostrou eficiente e ambientalmente correto devido a não utilização de uma substância tóxica, usada para purificação de DNA, que teria que ser descartada.

Os fragmentos de DNA obtidos com oligonucleotídeos iniciadores como o BOX, ERIC e REP em seus produtos obtidos pela PCR, permitem a diferenciação das estirpes de rizóbios (Versalovic *et al.*, 1991, 1994; de Bruijn, 1992; Selenska-Pobell *et al.*, 1995; Hungria *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 1999; Sá, 2001; Mostasso *et al.*, 2002; Giongo, 2003), ou até variantes de estirpes (Chueire *et al.*, 2000b, Carvalho, 2003). Neste trabalho a referida técnica se mostrou eficiente na avaliação da diversidade genética dos rizóbios autóctones capazes de estabelecer relação com espécies de *Lotus*.

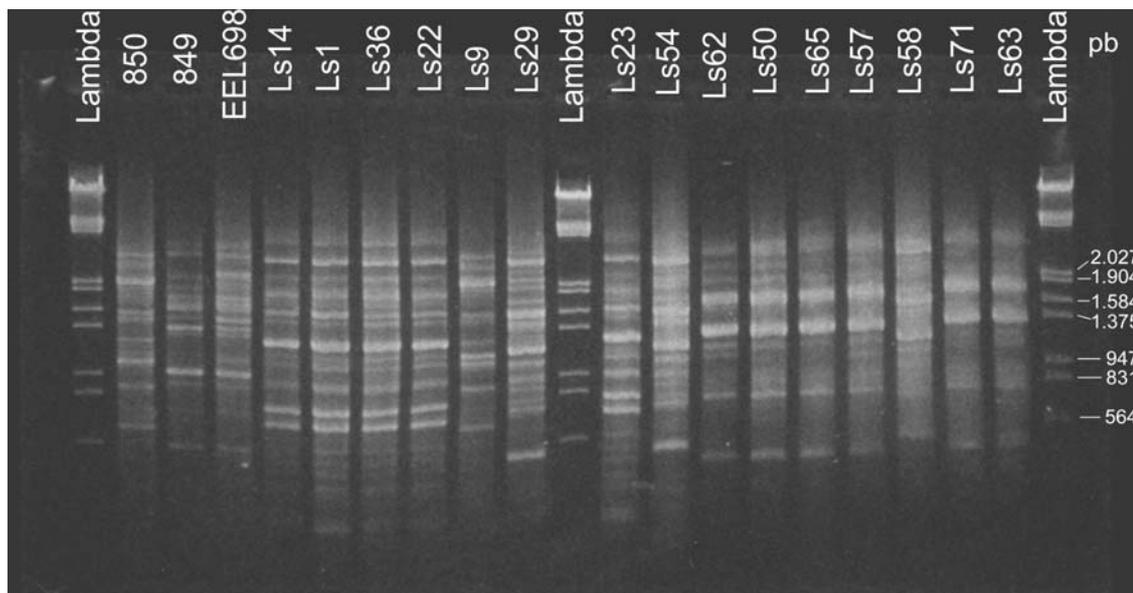


Figura 8: Perfil eletroforético obtido com a amplificação do DNA genômico com o primer BOX A1 dos isolados em *L. subbiflorus* e as estirpes SEMIA 849 e SEMIA 849. Gel de agarose 1,5% corado com Brometo de etídio

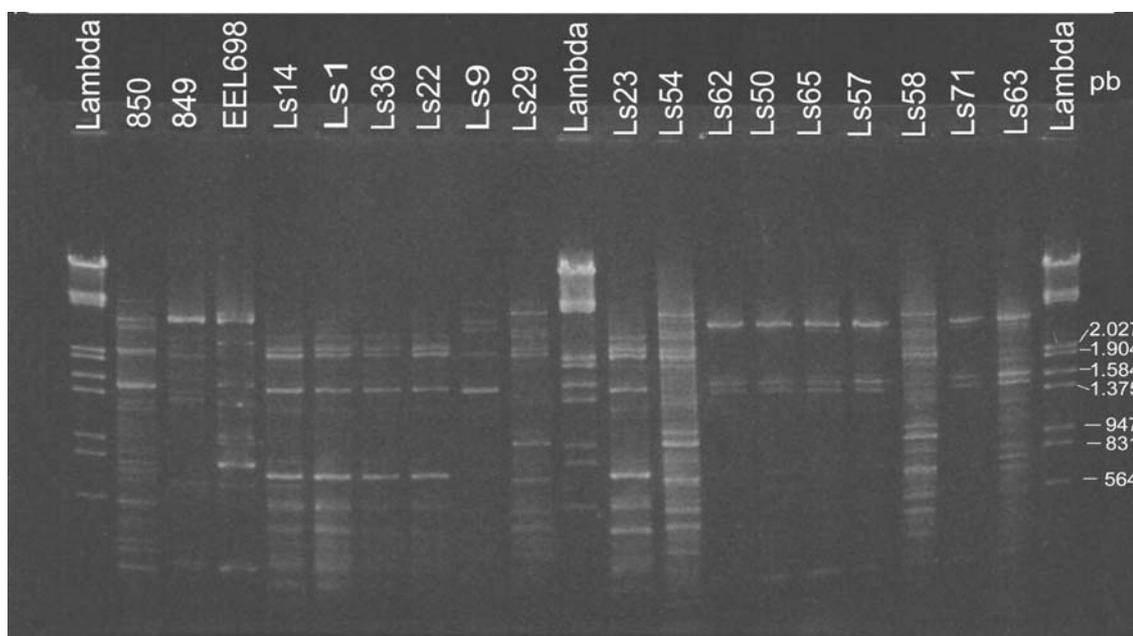


Figura 9: Perfil eletroforético obtido com a amplificação do DNA genômico com o primer ERIC dos isolados em *L. subbiflorus* e as estirpes SEMIA 849 e SEMIA 849. Gel de agarose 1,5% corado com Brometo de etídio

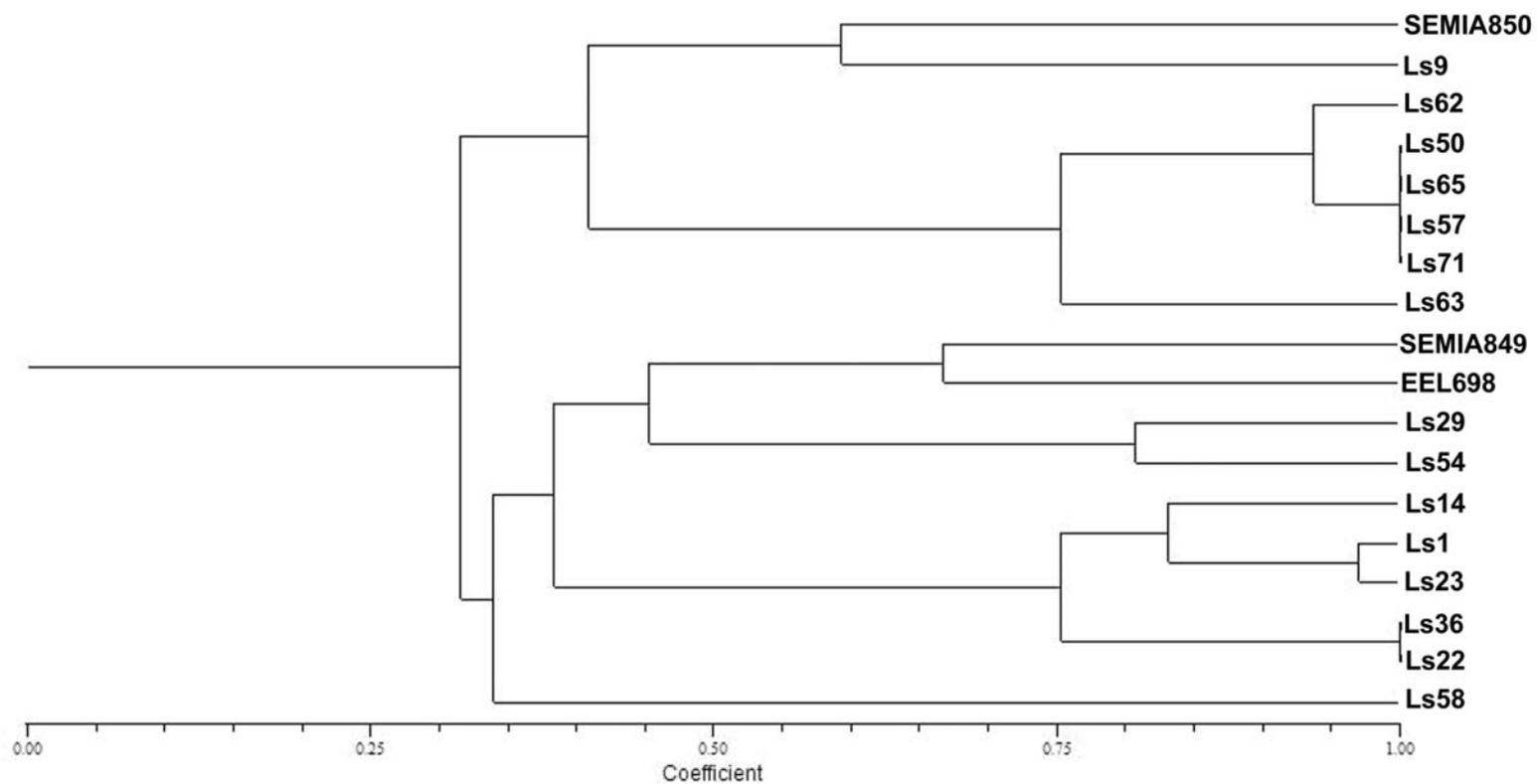


Figura 10: Dendrograma de genotipagem dos isolados para *L. subbiflorus*. Agrupamento obtido por UPGMA, utilizando o coeficiente de Jaccard, para perfil de bandas obtido a partir de PCR com os oligonucleotídeos ERIC e BOX.

#### 4.5.3 Índice de diversidade de Shannon

Para os isolados em *L. glaber* avaliados quanto ao perfil eletroforético da PCR obtidos com os oligonucleotídeos BOXA1 e ERIC, o índice de Shannon-Weaver foi calculado como sendo de 2,098 e para os isolados em *L. subbiflorus* de 2,053.

Estes dados demonstram menor índice de diversidade quando comparados com os obtidos com os rizóbios isolados de *L. corniculatus* e *L. uliginosus* estudados por Frizzo (dados não publicados) e que apresentaram índices de 2,56 e 2,79, respectivamente.

Resultados semelhantes foram obtidos por Mostasso *et al* (2002) com rizóbios isolados de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) em três áreas distintas do cerrado (com leguminosas, sem leguminosas e não cultivadas). Estes isolados apresentaram para o perfil de amplificação com o oligonucleotídeo ERIC uma diversidade de 1,120, 1,754 e 1,936, respectivamente. Para o oligonucleotídeo BOX, estes isolados apresentaram índices de 1,855, 2,231 e 3,090.

Neste trabalho consideramos que nove isolados em *L. glaber* e sete isolados em *L. subbiflorus* foram eficientes quando comparados com o controle não inoculado e com adição de nitrogênio. Além disso, também se observa que estes foram superiores às estirpes da coleção SEMIA, atualmente recomendadas para estas espécies de *Lotus* no Brasil e à estirpe uruguaia U510, destacando-se o isolado de *L. glaber*, UFRGS Lg 30, e o isolado de *L. subbiflorus*, UFRGS Ls36 que apresentaram índices de eficiência relativa maior que o dobro obtido com as estirpes mencionadas.

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho permitem concluir que:

a) Nos solos do Rio Grande do Sul existem rizóbios nativos capazes de formar nódulos e fixar nitrogênio em *Lotus glaber* e *Lotus subbiflorus*.

b) Existem rizóbios nativos mais eficientes na fixação simbiótica de nitrogênio em *Lotus glaber* do que a estirpe recomendada SEMIA 830, sendo eles os isolados UFRGS Lg30, UFRGS Lg19, UFRGS Lg149, UFRGS Lg108, UFRGS Lg121, UFRGS Lg9, UFRGS Lg4, UFRGS Lg166 e UFRGS Lg144.

c) Existem rizóbios nativos mais eficientes na fixação simbiótica de nitrogênio em *Lotus subbiflorus* do que as estirpes recomendadas SEMIA 849 e SEMIA 850, sendo eles os isolados UFRGS Ls36 e UFRGS Ls23.

d) Os isolados de rizóbios para *Lotus glaber* estudados diferem da estirpe SEMIA 830, usada na produção de inoculantes para esta leguminosa. A caracterização genotípica mostra que estes apresentam 35% de similaridade com a estirpe recomendada.

e) Os isolados de rizóbios para *Lotus subbiflorus* estudados diferem das estirpes usadas para a produção de inoculantes para esta leguminosa. A caracterização genotípica mostra que estes apresentam 50% de similaridade com a estirpe 849 e 60% com a SEMIA 850.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARORA, N. K; KANG, S. C. e MAHESHWARI, D. K. Isolation of siderophore-producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. **Current Science**, Bangalore, v. 81, n. 6, 25 p.673-677, 2001.

ANDRADE, D.S.; MURPHY, P.J.; GILLER, K.E. Effects of liming and legume/cereal cropping on populations of indigenous rhizobia in an acid Brazilian Oxisol. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 34, p.477-485, 2002.

BARAIBAR A.; FRIONI L.; GUEDES M. E.; LJUNGGREN H. Symbiotic Effectiveness And Ecological Characterization Of Indigenous Rhizobium Loti Populations In Uruguay **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.6, p.1011-1017, jun. 1999.

BARBERI, A.; CARNEIRO, M.A.C.; MOREIRA, F.M.S. ; SIQUEIRA, J.O. Nodulação em Leguminosas Florestais em Viveiros No Sul de Minas Gerais **Cerne**, Lavras, v.4, n.1, p.145-153, 1998.

BARRIENTOS, L.; HIGUERA, M.; ACUÑA, H.; GUERRERO, J.; ORTEGA, F. ; SEGUEL, I. Efectividad Simbiótica de Cepas Naturalizadas de *Mesorhizobium loti* y *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) en Plantas de três Espécies del Gênero *Lotus*. **Agricultura Técnica**, Temuco, v. 62 , n.2, p. 226-236, abril 2002.

BARSONOMIAN, G. D.; URZAINQUI, A.; LOHMAN, K.; WALKER, G. C. *Rhizobium meliloti* mutants unable to synthesize anthranilate display a novel symbiotic phenotype. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.174, p. 4416-4426, 1992.

BLISS, F.A. Host plant control of symbiotic N<sub>2</sub> fixation in grain legumes. In: GABELMAN, H.W.; LOUGHMAN, B.C. (Eds.). **Genetic aspects of plant mineral nutrition**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1987. p.479-493.

BLUMENTHAL M. J. ; MCGRAW R.L. Lotus adaptation, use and management. In: BEUSELINCK P. R. **Trefoil: The Science and Technology of Lotus**, Madison, 1999, v. 28.

BORTHAKUR, D. *et al.* Identification of two classes of *Rhizobium phaseoli* genes required for melanin synthesis, one of which is required for nitrogen fixation and activates the transcription of the other. **Molecular and General Genetics**, New York, v.207, p.155-160, 1987.

BROSE, E. Avaliação de rizóbio em cornichão em solo ácido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, n.9, p.1237-1242, 1992.(a)

BROSE E. Seleção de Rizóbio Para Lotus Pedunculatus Em Solo Ácido **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.27, n.3, p. 409-415, 1992.(b)

CARVALHO, F. G. **Variabilidade de isolados de estirpes de *Bradirhizobium* spp. recomendadas para a cultura da soja.** 2003. 77f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

CASSÁN, F.; LUNA, V. e RUÍZ, O. A. Physiological studies of tolerance to saline stress in *Lotus glaber* and their correlation with the establishment and efficiency of the symbiotic association with *Mesorhizobium loti*. **Lotus Newsletter**, Missouri, v. 35, n.1, p. 19-20, 2005.

CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E.; FERREIRA, M. C.; GRANGE, L.; CAMPO, R. J.; MOSTASSO, F. L.; ANDRADE, D. S.; PEDROSA, F. O.; HUNGRIA, M. **Classificação taxonômica, baseada na caracterização molecular, das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro.** Londrina: Embrapa- CNPSo, 2000a. 32 p. (Boletim de Pesquisa, 3).

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

CILIUTI, J.; ARRIVILLAGA, S.; GERMÁN, S.; STEWART, S.; REBUFFO, M. & HERNÁNDEZ, S. Studies of rust fungi on *Lotus subbiflorus* and *L. uliginosus*. **Lotus Newsletter**, Missouri, v. 33, p.18-24, 2003.

CLUA, A.; BARRAGAN, M.; TACALITI, M.S.; GIMENEZ, D.; CASTRO, A. M. Assisted and traditional assessment of saline stress tolerance in *Lotus glaber*. **Lotus Newsletter**, Missouri, v. 35, n.1, p.13-14, 2005.

CUBO, M.T.; BUENDIA-CLAVERIA, A.M.; BERINGER, J.E.; RUIZ-SAINZ, J.E. Melanin productions by *Rhizobium* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, n.7, p.1812-1817, 1988.

CUBO, M.T. *et al.* Expression of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* *melA* gene in other rhizobia does not require the presence of the *nifA* gene. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 24, p.195-203, 1997.

CURLEY, R.L.; BURTON, J.C. Compatibility of *Rhizobium japonicum* with chemical seed protectants. **Agronomy Journal**, Madison, v.67, p.807-808, 1975.

de BRUIJN, F.J. Use of repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.2180-2187, 1992.

BRASIL. DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO - seção 1, n.58, 24 de março de 2006  
Secretaria de Defesa Agropecuária, Instrução Normativa n.10, de 21 de março de 2006.

DILWORTH, M.J. *et al.* *Rhizobium leguminosarum* bv. *Viciae* produces a novel cyclin trihydroxamate siderophore, vicibactin. **Microbiology**, Reading, v.144, p.781-791, 1998.

DUDA, G.P. **Conteúdo de fósforo microbiano, orgânico e biodisponível em diferentes classes de solo**. 2000. 158p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Seropédica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2000.

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

FERREIRA, D. F.; MUNIZ, J. A.; AQUINO L. H. Comparações múltiplas em experimentos com grande número de tratamentos - Utilização do teste de Scott – Knott. **Ciência e Agrotécologia**, Lavras, v.23, n.3, p.745-752, jul./set., 1999.

FOX, T.R; COMERFORD, N.B. Rhizosphere phosphatase activity and phosphatase hydrolyzable organic phosphorus In two forested spodosols. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v.24, p.579-583, 1992.

GAO, X.; BORTHAKUR, D. Short communication: discrete differences between strains of different *Rhizobium* spp. for competitive nodule occupancy on beans. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.11, p.681-682, 1995.

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. The road map to the manual. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 2001. p. 119-154.

GIONGO, A. **Diversidade de rizóbios nativos que nodulam feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) isolados de áreas de campo nativo sob diferentes adubações.** 2003. 83f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

GUERINOT, M.L.; MEIDL, E.J.; PLESSNER, O. Citrate as a siderophore in *Bradyrhizobium japonicum*. **Journal of Bacteriology**, Washington, p.3298-3303, jun. 1990.

GRAHAM, P. Stress tolerance in Rhizobium and Bradyrhizobium and nodulation under adverse soil conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.38, p.475-484, 1992.

GREENWOOD, R., M. Pasture establishment on a podsolised soil in Northland. III. Studies on Rhizobia populations and the effect of inoculation. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, 1961, v.4, p. 375-389.

HAWKINS, F.K.L.; JOHNSTON, A.W.B. Transcription of a Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli gene needed for melanin synthesis is activated by nifA of Rhizobium and Klebsiella pneumoniae. **Molecular Microbiology**, Manchester, v.2, p. 331-337, 1988.

HUNGRIA, M.; BODDEY, L. H.; SANTOS, M. A.; VARGAS, M. A. T. Nitrogen fixation capacity and nodule occupancy by *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 27, p. 393-399, 1998.

HUNGRIA, M. *et al.* Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soyabean nodules in Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.33, p.1349-1361, 2001.

Hynes MF, Krucksch K, Priefer U. Melanin production encoded by a cryptic plasmid in a *Rhizobium leguminosarum* strain. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 150, p. 326–332, 1988.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2003. **Utilização das terras.** Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/43/>. Acesso em: 08 fev. 2007.

IRISARRI, E ; MILNITSKY F.; MONZA I. J.; BEDMAR E.J. Characterization of rhizobia nodulating *Lotus subbiflorus* from Uruguayan soils. **Plant and Soil**, Netherlands, v 180, p. 39-47, 1996.

INSAUSTI, P. Substitution of *Lotus glaber* for the dicots of natural grassland in the flooding Pampa of Argentina. **Lotus Newsletter**, Missouri, v.34, p.34-37, 2004.

JARVIS, B.D. W.; van BERKUM P; CHEN, W. X.; NOUR, S.M.; FERNANDEZ, M. P.; CLEYET-MAREL, J.C.; GILLIS, M. Transfer of *Rhizobium loti*, *R. huakuii*, *R. huakuii*, *R. ciceri*, *R. mediterraneum* e *R. tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.47, p. 895-898, 1997.

JORDAN, D. C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchananm 1980 to *Bradyrhizobium japonicum* gen. Nov., a genus of slow growing root nodule bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 32, p.378-380, 1982.

KEYSER, H.H.; BOHLOOL, B.B.; HU, T.S.; WEBER, D.F. Fast-growing rhizobia isolated from root nodules of soybean. **Science**, Washington, v.215, p.1631-1632, 1982.

KOLLING, J.; SCHOLLES, D.; SELBACH, P.A. Seleção de estirpes de *Rhizobium* para trevo branco subterrâneo, alfafa e cornichão. **Agronomia Sulriograndense**, Porto Alegre, v.19, n. 2, p. 103-111, 1983.

LABANDERA, C. **Colección Nacional de Cepas de Rhizobium spp.** Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca Departamento de Microbiología de Suelos Montevideo – Uruguay, 2004. Disponível em: <http://www.chasque.net/microlab/LMSCI/catalogo/catalogo.doc>. Acesso em: 12 fev. 2007.

LABANDERA, C. **Metodologías aplicadas a la evaluación de Rhizobios para inoculantes para leguminosas forrajeras en Uruguay. Trabajos Técnicos.** Departamento de Microbiología de Suelos, 2007. Disponível em: <http://www.chasque.net/microlab/LMSCI/TraTe/metaplic.htm>. Acesso em: 12 fev. 2007.

LAGUERRE, G.; MAVINGUI, P.; ALLARD, M. R.; CHARNAY, M. P.; LOUVRIER, P.; MAZURIER, S. I.; RIGOTTIER-GOIS, L.; AMARGER, N. Typing of rhizobia by PCR-DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: Application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 2029-2036, 1996.

LAGUERRE, G.; LOUVRIER, P; ALLARD, M.R.; AMARGER, N. Compatibility of Rhizobial Genotypes within Natural Populations of *Rhizobium leguminosarum* Biovar viciae for Nodulation of Host Legumes **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 4, p. 2276–2283, abr. 2003.

LAMB, J.W.; HOMBRECHER, G.; JOHNSTON, A.W.B. Plasmid-determined nodulation and nitrogen-fixation abilities in *Rhizobium phaseoli*. **Molecular and General Genetics**, New York, v.186, p.449-452, 1982.

LOWTHER, W.L.; HAY, R.J.M.; RYAN, D.L. Effect of strain of rhizobia, lime and phosphorus on dry matter yield of three lotus species in differing environments in Otago and Southland. **New Zealand Journal of Experimental Agriculture**, Wellington, v.15, p.135-142, 1987.

MAÂTALLAH, J.; BERRAHO, B.; SANJUAN, J.; LLUCH, C. Phenotypic characterization of rhizobia isolated from chickpea (*Cicer arietinum*) growing in Moroccan soils, **Agronomie**, Avignon, v. 22, p. 321–329, 2002.

MONTES, L. Lotus tenuis. **Revista Argentina de Producción Animal**, Balcarce, v. 8, p. 367-376, 1988.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 1 ed. Lavras: Editora UFLA, 2002, 626p.: il.

MOSTASSO, L. *et al.* Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.73, p.121-132, 2002.

MUJICA M.M.; RUMI C. P. Effects of salinity on the germination of Lotus glaber Mill.(= Lotus tenuis Waldst. et Kit. ex Wild.), **Lotus Newsletter**, Missouri, v.30, 1999.

MUELLER, J.G.; SKIPPER, H.D.; SHIPE, E.R.; GRIMES, L.W.; WAGNER, S.C. Intrinsic antibiotic resistance in Bradyrhizobium japonicum. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.20, p.879-882, 1988.

MUNEVAR, F.; WOLLUM II, A.G. Growth of Rhizobium japonicum strains in temperature above 27°C. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.42, p.272-276, 1981.

MUNNS, D.N.; KEYSER, H.H. Responses of Rhizobium strains to acid and aluminium stress. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.13, p.115-118, 1981.

NORRIS, D.O., DATE, R.A. Legume bacteriology. In: SHAW, N.H., BRYAN, W.W. (Eds.) *Tropical pasture research - principles and methods*. Brisbane: CAB. , 1976, p.134-173.

OLIVEIRA, L.A.; MAGALHÃES, H.P. Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 30, p. 203-208, 1999.

PAIM, N. R.; RIBOLDI, J. Comparação entre espécie e cultivares do gênero *Lotus*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.26, n.10, p.1699-1704, out 1991.

PANKHURST, C.E.; HOPCROFT, D.H.; JONES, W.T. Comparative morphology and flavolan content of *Rhizobium-loti* induced effective and ineffective root-nodules on *Lotus* species, *Leuceana leucocephala*, *Carmichaelia flagelliformis*, *Ornithopus sativus*, and *Clianthus puniceus*. **Canadian Journal of Botany- Revue Canadienne de Botanique**, Ottawa, v. 65, n. 12, p. 2676-2685, 1987.

PÉRES, E. **Metodologías aplicadas a la evaluación de Rhizobios para inoculantes para leguminosas forrajeras en Uruguay**. Artículos de Difusión. [Montevideo] Departamento de Microbiología de Suelos, 2007. Disponible em: <<http://www.chasque.net/microlab/LMSCI/Difusion/nuevoinoc.htm> >. Acceso em: 12 fev. 2007.

PERSMARK, M., PITTMAN, P., BUYER, J. S., SCHWYN, B., GILL, P. R.; NEILANDS, J. B. Isolation and structure of rhizobactin 1021, a siderophore from alfalfa symbiont *Rhizobium meliloti* 1021. **Journal American Chemistry Society**, Columbus, v. 115, p. 3950-3956, 1993.

RODRIGUES, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, Cambridge, v.17, n 4-5, p. 319-339, 1999.

PLONKA P. M.; GRABACKA M. Melanin synthesis in microorganisms — biotechnological and medical aspects **Acta Biochimica Polonica**, Varsovia, v. 53, p. 429–443, 2006.

RODRIGUEZ-NAVARRO, D.N. *et al.* Characterization of *Rhizobium* spp. bean isolates from South West Spain. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.32, p.1601-1613, 2000.

Romero-Martinez R, Wheeler MH, Guerrero-Plata A, Rico G, Torres-Guerrero H Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. **Infect Immun** v. 68, p. 3696–3703, 2000.

ROY, N., BHATTACHARYYA, P.; CHAKRABARTTY, P. K. Iron acquisition during growth in an iron deficient medium by *Rhizobium* sp. isolated from *Cicer arietinum*. **Microbiology**, Spencers Wood, v. 140, p. 2811-2820, 1994.

RUPELA, O.P.; SUDARSHANA, M.R. Displacement of native rhizobia nodulating chick pea (*Cicer arietinum* L.) by an inoculant strain through soil solarization. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.10, p.207-212, 1990.

SCHWINGHAMER, E.A.; BROCKWELL, J. Competitive advantage of bacteriocin and phage producing strains of *Rhizobium trifolii* in mixed culture. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.10, p.383-387, 1978.

SÁ, E.L.S. de. **Diversidade fenotípica e genética de rizóbios isolados de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) em solos ácidos de Cunha - SP.**, 2001. 109f. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Ciência – Energia Nuclear na Agricultura, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

SANTOS, M. A.; VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Characterization of soybean bradyrhizobia strains adapted to the Brazilian cerrados region. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 30, p. 261-272, 1999.

SCHEFFER-BASSO, S.M.; VOSS, M.; JACQUES, A. V. A. Nodulação e Fixação Biológica de Nitrogênio de *Adesmia latifolia* e *Lotus corniculatus* em Vasos de Leonard. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n.3, p. 687-693, 2001.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, p. 507 - 512, Sept. 1974.

SELENSKA-POBELL, S.; GIGOVA, L.; PETROVA, N. Strain-specific fingerprints of *Rhizobium galegae* generated by PCR with arbitrary and repetitive primers. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 79, p. 425-431, 1995.

SHANNON, C. E.; WEAVER, W. The Mathematical Theory Of Communication. **Bell Sys. Tech. J.**, Illinois, v. 27, p. 379-423, 1948.

SILVA, E. C. **Avaliação do poder e taxas de erro tipo I do teste Scott - Knott por meio do método de Monte Carlo.** 1998. 54p. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Estatística e Experimentação Agropecuária, Faculdade de Matemática, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.

SOUZA, J. A. de; MALUF, W. R.; GOMES, L. A. A. Produtividade e qualidade de frutos de cultivares de polinização aberta e híbridos F1 de berinjela (*Solanum melongena* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 21, n. 3, p. 334-342, jul./set., 1997.

STRIKER, G. G. Comparative responses between *Lotus glaber* and *Paspalum dilatatum* to the flooding-grazing interaction. **Lotus Newsletter**, Missouri, v.35, n.1, p. 25-26, 2005.

TAN, Z.; HUREK, T.; VINUESA, P.; MULLER, P.; LADHA, J. K.; REINHOLD-HUREK, B. Specific detection of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* strains colonizing rice (*Oryza sativa*) roots by 16s-23s ribosomal DNA intergenic spacer-targeted PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p. 3655-3664, 2001.

TEDESCO, M.J. *et al.* **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2 ed. Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS, 1995.174 p.

TEREFEWOR, Z.; NICK, G.; SUOMALAINEN, S.; PAULIN, L.; LINDSTRÖM, K. Phylogeny of *Rhizobium galegae* with respect to other rhizobia and agrobacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 48, p. 349-356, 1998.

TESFAYE, M.; HOLL, F. B. Group-specific differentiation of *Rhizobium* from clover species by PCR amplification of 23S rDNA sequences. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 44, p. 1102-1105, 1998.

THIEN, S.J.; MYERS, R. Determination of bioavailable phosphorus. **Soil Science of America Journal**, Madison, v.56, p.814-818, 1992.

VANCE, C.P.; GRAHAM, P.H. Nitrogen fixation in agriculture: application and perspectives. In: TIKHONOVICH, I.A.; PROVOROV, N.A.; ROMANOV, V.I.; NEWTON, W.E. (Eds.). **Nitrogen fixation: Fundamentals and applications**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995. p.77-86.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 19, p. 6823-6831, 1991.

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

VIGNOLIO, O. R.; FERNÁNDEZ, O. N.; MACEIRA O. N. Flooding tolerance in five populations of *Lotus glaber* Mill. (Syn. *Lotus tenuis* Waldst. et. Kit.) **Australian Journal of Agricultural Research**, Collingwood, v. 50, n.4, p.555–560, 1999.

VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 200 p. (IBP Handbook, 15).

VINUESA, P.; RADEMAKER, J. L. W.; DE BRUIJN, F. J.; WERNER, D. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, p. 2096-2104, 1998.

VLASSAK K. M.; VANDERLEYDEN J. Factors influencing nodule occupancy by inoculant rhizobia. **Critical Review Plant Science**, Philadelphia, v 16, p 163–229, 1997.

VON PINHO, R. G.; VON PINHO, E. V. R.; FRAGA, A. C.; MACHADO, J. da C. Avaliação de fontes de resistência à ramulose do algodoeiro causada por *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 21, n. 3, p. 253 - 259, jul./set., 1997.

WANG, T.; KAN, F.L.; TAN, Z.Y., TOLEDO, I; CHEN, W.X.; MARTINEZ-ROMERO, E. Diverse Mesorhizobium plurifarium populations native to Mexican soils **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 180, p. 444-54, 2003.

WOOD, M.; COOPER, J.E. Screening clover and *Lotus* rhizobia for tolerance of acidity and aluminum. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.17, p.493-497, 1985.

YOUNG, J. P. W.; DOWNER, H. L.; EARDLY, B. D. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAi1 by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 73, p. 2271-2277, 1991.

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

ZAKHIA, F. e DE LAJUDIE, F. Taxonomy of rhizobia. **Agronomie**, Avignon, v.21, p. 569–576, 2001.

## **7 - APÊNDICES**

**APÊNDICE 1. - Meio extrato de levedura-manitol - LM (Vincent, 1970).**

Manitol.....	10,0 g
K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,2 g
NaCl.....	0,1 g
Extrato de levedura.....	0,5 g
Água destilada.....	1000 mL

Obs.: Para elaboração de meio sólido, acrescentar 15 g de ágar por litro de meio. Ajustar pH para 6,8.

\* Para formular o meio extrato de levedura-manitol-vermelho congo (LMV), adicionar 10 mL de vermelho congo (solução de 250 mg de vermelho congo em 100 mL de água destilada) em 1 L de meio LM.

**APÊNDICE 2.** - Meio extrato de levedura-triptona (TY) (Somasegaram & Hoben, 1994).

Triptona.....	5,0 g
Extrato de levedura.....	3,0 g
CaCl <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O.....	0,87g
Água destilada.....	1000 mL

Obs.: Ajustar pH para 6,8.

**APÊNDICE 3. - Solução Nutritiva (Sarruge, 1974).**

<b>Macronutrientes</b>	<b>Estoque (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Solução dos vasos (mL)</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,1	1
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	246,4	2
CaCl <sub>2</sub>	111,1	5
KCl	74,6	5
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	80	1
Fe EDTA	1M	10
<b>Micronutrientes</b>		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86	1
ZnCl <sub>2</sub>	0,10	1
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,04	1
Na <sub>2</sub> Mo <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0,02	1

Obs.: O nitrogênio é adicionado usando-se uma solução de 20 g de NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> por litro.

O componente CuCl<sub>2</sub> foi alterado para CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, preservando -se a proporção do elemento Cobre.

Retirou-se MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, pois a areia utilizada nos vasos Leonard contém Mn.

Componentes com Potássio devem ser adicionados por último, para evitar precipitação.

O pH da solução foi ajustado em torno de 6,0.

Para elaboração de meio semi-sólido, acrescentar 7 g de ágar por litro de meio.

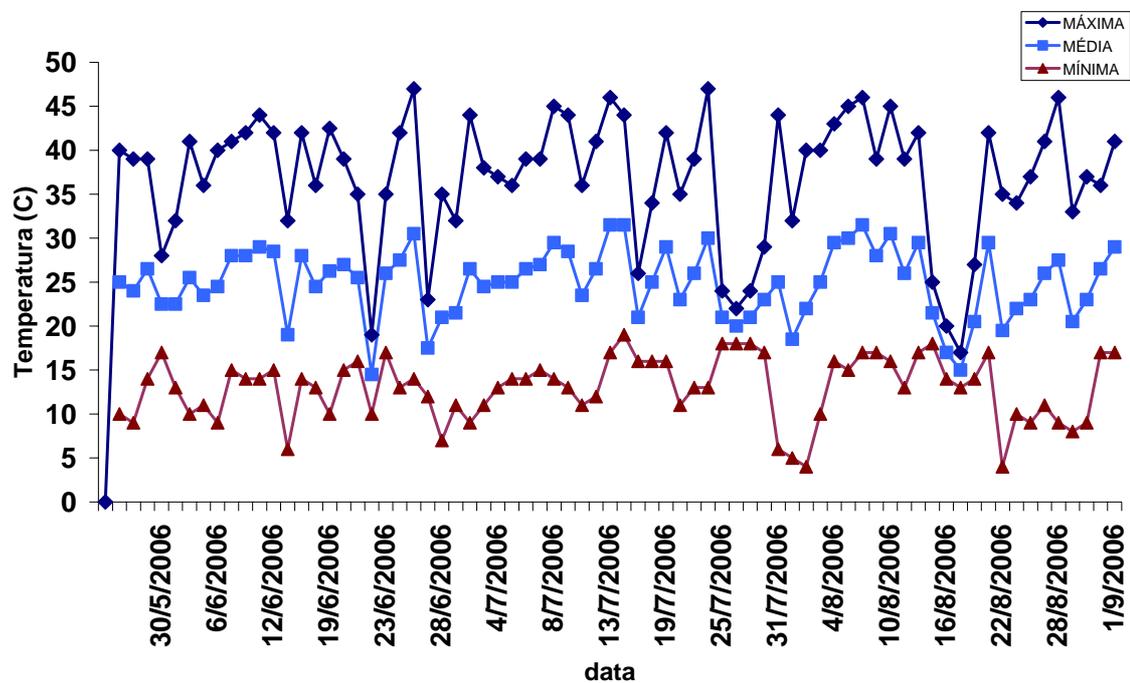
**APÊNDICE 4.** – Composição da mistura (*master mix*) para as reações de PCR

<b>Componentes</b>	<b>ERIC1-R + ERIC-2 / BOX</b>
tampão 10 x *	1x
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 mM
dNTP's (10mM)	200 µM
Taq polimerase (5U/µl)	1 U
Oligonucleotídeo	10 p moles
DMSO	1µL
H <sub>2</sub> O ultrapura**	

(\*) Tampão 10 x (500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris-HCl, pH 9,0);

(\*\*) água ultrapura estéril em quantidade suficiente para completar o volume de 25 µL/tubo.

**APÊNDICE 5.** - Gráfico da variação da temperatura ambiente na casa de vegetação observada durante os 97 dias após a inoculação nos vasos de cultivo.



**APÊNDICE 6** - Características dos isolados de rizóbios obtidos em *Lotus glaber* Mill.(=*Lotus tenuis* Waldst. et Kit. ex Wild.).

isolado	origem	Detecção de nodulação (dias)	Morfologia colonial			
			tamanho (mm)	borda	superfície	densidade ótica
UFRGS Lg1	Rio Pardo	14	5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg2	Rio Pardo	14	5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg3	Rio Pardo	18				
UFRGS Lg4	Rio Pardo	18	>10	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg5	Rio Pardo	18	>5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg6	Rio Pardo	18	>5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg7	Rio Pardo	18	>5	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg8	Rio Pardo	18	5	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg9	Rio Pardo	18	5	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg10	Rio Pardo	18	>10	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg11	Rio Pardo	18	5	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg12	Rio Pardo	18	5	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg13	Rio Pardo	20	>10	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg14	Rio Pardo	20	5	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg15	Rio Pardo	20	>5	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg16	Rio Pardo	25	>5	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg17	Rio Pardo	25	5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg18	Rio Pardo	25	5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg19	Rio Pardo	25	>5	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg20	Rio Pardo	28	>5	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg21	Rio Pardo	28	>5	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg22	Rio Pardo	32	5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg23	Rio Pardo	32	5	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg24	Rio Pardo	32	5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg25	Rio Pardo	32	5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg26	Rio Pardo	32	5	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg27	Rio Pardo	32	>5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg28	Rio Pardo	32	>5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg29	Rio Pardo	34	>10	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg30	Rio Pardo	34	2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg31	Rio Pardo	34	5	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg32	Rio Pardo	41	5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg33	Rio Pardo	41	>5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg34	Rio Pardo	41	5	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg35	Rio Pardo	53	5	lisa	granulosa	translúcida

## APÊNDICE 6. Continuação...

isolado	origem	Detecção de nodulação (dias)	Morfologia colonial			
			tamanho (mm)	borda	superfície	densidade ótica
UFRGS Lg36	Rio Pardo		5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg37	Rio Pardo		6	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg38	Rio Pardo		5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg39	Rio Pardo	60				
UFRGS Lg40	Rio Pardo		5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg41	Rio Pardo		10	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg42	Rio Pardo		10	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg43	Rio Pardo		>5	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg44	Rio Pardo		5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg45	Rio Pardo		5	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg46	Rio Pardo		5	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg47	Rio Pardo		>5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg48	Rio Pardo		>5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg49	Rio Pardo		2		granulosa	translúcida
UFRGS Lg50	Rio Pardo		3		granulosa	opaca
UFRGS Lg51	Rio Pardo		2		granulosa	opaca
UFRGS Lg52	Rio Pardo		2	irregular	granulosa	translúcida
UFRGS Lg53	Rio Pardo		>3		granulosa	translúcida
UFRGS Lg54	Rio Pardo		2		granulosa	translúcida
UFRGS Lg55	Rio Pardo		<2		granulosa	translúcida
UFRGS Lg56	Rio Pardo		4			translúcida
UFRGS Lg57	Rio Pardo		<2			translúcida
UFRGS Lg58	Rio Pardo		3		granulosa	opaca
UFRGS Lg59	Rio Pardo		2		granulosa	opaca
UFRGS Lg60	Rio Pardo		1		granulosa	translúcida
UFRGS Lg61	Rio Pardo		3		granulosa	translúcida
UFRGS Lg62	Rio Pardo		2		granulosa	translúcida
UFRGS Lg63	Rio Pardo		2		granulosa	translúcida
UFRGS Lg64	Rio Pardo		2		granulosa	translúcida
UFRGS Lg65	Rio Pardo		2		granulosa	translúcida
UFRGS Lg66	Rio Pardo		2		granulosa	translúcida
UFRGS Lg67	Rio Pardo		2		granulosa	translúcida
UFRGS Lg68	Rio Pardo		2		granulosa	translúcida
UFRGS Lg69	Rio Pardo		<2		granulosa	translúcida
UFRGS Lg70	Rio Pardo		2		granulosa	translúcida

### APÊNDICE 6. Continuação...

isolado	origem	Detecção de nodulação (dias)	Morfologia colonial			
			tamanho (mm)	borda	superfície	densidade ótica
UFRGS Lg71	Bagé		>8		granulosa	translúcida
UFRGS Lg72	Bagé		6		granulosa	translúcida
UFRGS Lg73	Bagé		6		granulosa	translúcida
UFRGS Lg74	Bagé		>8		granulosa	translúcida
UFRGS Lg75	Bagé		6		granulosa	translúcida
UFRGS Lg76	Bagé		7		granulosa	translúcida
UFRGS Lg77	Bagé		5		granulosa	translúcida
UFRGS Lg78	Bagé		5		granulosa	translúcida
UFRGS Lg79	Bagé		5		granulosa	translúcida
UFRGS Lg80	Bagé		5		granulosa	translúcida
UFRGS Lg81	Bagé		8		granulosa	translúcida
UFRGS Lg82	Bagé		6		granulosa	translúcida
UFRGS Lg83	Bagé		>8		granulosa	translúcida
UFRGS Lg84	Bagé		6		granulosa	translúcida
UFRGS Lg85	Bagé		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lg86	Bagé	28	8		granulosa	translúcida
UFRGS Lg87	Bagé		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lg88	Bagé		5		granulosa	translúcida
UFRGS Lg89	Bagé		<2			opaca
UFRGS Lg90	Bagé		5		granulosa	translúcida
UFRGS Lg91	Bagé		2		granulosa	translúcida
UFRGS Lg92	Bagé		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lg93	Bagé		3		granulosa	translúcida
UFRGS Lg94	Bagé		5		granulosa	translúcida
UFRGS Lg95	Bagé		2		granulosa	translúcida
UFRGS Lg96	Bagé		3		granulosa	translúcida
UFRGS Lg97	Bagé		3		granulosa	translúcida
UFRGS Lg98	Bagé		5		granulosa	translúcida
UFRGS Lg99	Bagé		5		granulosa	translúcida
UFRGS Lg100	Bagé		2		granulosa	translúcida
UFRGS Lg101	Bagé		2		granulosa	translúcida
UFRGS Lg102	Bagé		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lg103	Bagé		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lg104	Bagé		5		granulosa	translúcida
UFRGS Lg105	Bagé		4		granulosa	translúcida

## APÊNDICE 6. Continuação...

isolado	origem	Detecção de nodulação (dias)	Morfologia colonial			
			tamanho (mm)	borda	superfície	densidade ótica
UFRGS Lg106	Porto Alegre		6			translúcida
UFRGS Lg107	Porto Alegre		4			translúcida
UFRGS Lg108	Porto Alegre	44	6			translúcida
UFRGS Lg109	Porto Alegre	50	5			translúcida
UFRGS Lg110	Porto Alegre	50	<2			translúcida
UFRGS Lg111	Porto Alegre	9	3			translúcida
UFRGS Lg112	Porto Alegre		<2			translúcida
UFRGS Lg113	Porto Alegre	28	6			translúcida
UFRGS Lg114	Porto Alegre	22	6			translúcida
UFRGS Lg115	Porto Alegre		4			translúcida
UFRGS Lg116	Porto Alegre		6			translúcida
UFRGS Lg117	Porto Alegre		9			translúcida
UFRGS Lg118	Porto Alegre	44	5			translúcida
UFRGS Lg119	Porto Alegre	28	4			translúcida
UFRGS Lg120	Porto Alegre		4			translúcida
UFRGS Lg121	Porto Alegre	15	2			translúcida
UFRGS Lg122	Porto Alegre	22	1			translúcida
UFRGS Lg123	Porto Alegre		7			translúcida
UFRGS Lg124	Porto Alegre	13	9			translúcida
UFRGS Lg125	Porto Alegre	15	5		granulosa	translúcida
UFRGS Lg126	Porto Alegre	50	9			translúcida
UFRGS Lg127	Porto Alegre		1	irregular		translúcida
UFRGS Lg128	Porto Alegre	22	1	irregular		translúcida
UFRGS Lg129	Porto Alegre		1	irregular		translúcida
UFRGS Lg130	Porto Alegre		4	lisa		translúcida
UFRGS Lg131	Porto Alegre		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg132	Porto Alegre		10	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg133	Porto Alegre		4	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg134	Porto Alegre		5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg135	Passo Fundo	36	2			opaca
UFRGS Lg136	Passo Fundo		2			opaca
UFRGS Lg137	Passo Fundo		2			opaca
UFRGS Lg138	Passo Fundo	13	2			opaca
UFRGS Lg139	Passo Fundo		2			opaca
UFRGS Lg140	Passo Fundo		2			opaca
UFRGS Lg141	Passo Fundo		2			opaca

## APÊNDICE 6. Continuação...

isolado	origem	Detecção de nodulação (dias)	Morfologia colonial			
			tamanho (mm)	borda	superfície	densidade ótica
UFRGS Lg142	Passo Fundo		2			opaca
UFRGS Lg143	Passo Fundo		1			opaca
UFRGS Lg144	Passo Fundo	28	>10	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg145	Passo Fundo	90	>10	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg146	Passo Fundo		6	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg147	Passo Fundo		5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg148	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg149	Passo Fundo	28	6	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg150	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg151	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg152	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg153	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg154	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg155	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg156	Passo Fundo	28	8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg157	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg158	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg159	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg160	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg161	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg162	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg163	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg164	Passo Fundo		6	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg165	Passo Fundo		5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg166	Passo Fundo	36	6	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg167	Passo Fundo		5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg168	Passo Fundo		5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg169	Passo Fundo		5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg170	Passo Fundo	28	6	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg171	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg172	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg173	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg174	Passo Fundo		3	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg175	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg176	Passo Fundo		8	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg177	Passo Fundo		8	lisa	granulosa	translúcida

## APÊNDICE 6. Continuação...

isolado	origem	Detecção de nodulação (dias)	Morfologia colonial			
			tamanho (mm)	borda	superfície	densidade ótica
UFRGS Lg178	Passo Fundo		6	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg179	Passo Fundo		7	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg180	Passo Fundo		7	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg181	Passo Fundo		7	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg182	Passo Fundo		6	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg183	Passo Fundo		7	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg184	Passo Fundo		5	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg185	Passo Fundo		7	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg186	Passo Fundo		6	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg187	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg188	Passo Fundo		7	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg189	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg190	Passo Fundo		5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg191	Passo Fundo		6	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg192	Passo Fundo		6	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg193	Passo Fundo		6	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lg194	Passo Fundo		5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg195	Passo Fundo		4	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg196	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg197	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg198	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg199	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg200	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg201	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg202	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg203	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg204	Passo Fundo		5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg205	Passo Fundo		5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg206	Passo Fundo		4	irregular	lisa	translúcida
UFRGS Lg207	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg208	Passo Fundo		5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg209	Passo Fundo		4	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg210	Passo Fundo		5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg211	Passo Fundo		5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg212	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg213	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida

### APÊNDICE 6. Continuação...

isolado	origem	Detecção de nodulação (dias)	Morfologia colonial			
			tamanho (mm)	borda	superfície	densidade ótica
UFRGS Lg214	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg215	Passo Fundo		6	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg216	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg217	Passo Fundo		5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg218	Passo Fundo		5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg219	Passo Fundo		5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg220	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg221	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg222	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg223	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg224	Passo Fundo		5	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lg225	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg226	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg227	Passo Fundo		6	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg228	Passo Fundo		6	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg229	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg230	Passo Fundo		6	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg231	Passo Fundo		6	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg232	Passo Fundo		6	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg233	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg234	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg235	Passo Fundo		6	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg236	Passo Fundo		4	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg237	Passo Fundo		6	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg238	Passo Fundo		6	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg239	Passo Fundo		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg240	Passo Fundo		6	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg241	Passo Fundo		6	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg242	Eldorado do Sul		4	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg243	Eldorado do Sul		2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg244	Eldorado do Sul		4	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg245	Eldorado do Sul		4	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg246	Eldorado do Sul		4	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg247	Eldorado do Sul		4	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lg248	Eldorado do Sul		5		granulosa	translúcida
UFRGS Lg249	Eldorado do Sul		>10			translúcida

### APÊNDICE 6. Continuação...

isolado	origem	Detecção de nodulação (dias)	Morfologia colonial			
			tamanho (mm)	borda	superfície	densidade ótica
UFRGS Lg250	Eldorado do Sul		4			translúcida
UFRGS Lg251	Eldorado do Sul		4			translúcida
UFRGS Lg252	Eldorado do Sul		4			translúcida
UFRGS Lg253	Eldorado do Sul		>10			translúcida
UFRGS Lg254	Eldorado do Sul		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lg255	Eldorado do Sul		5			translúcida
UFRGS Lg256	Eldorado do Sul		4		granulosa	opaca
UFRGS Lg257	Eldorado do Sul		5			translúcida
UFRGS Lg258	Eldorado do Sul		4		granulosa	opaca
UFRGS Lg259	Eldorado do Sul		6		granulosa	translúcida

**APÊNDICE 7.** - Características dos isolados de rizóbios obtidos em *Lotus subbiflorus* Lag. (syn. *Lotus hispidus* Desf.).

isolado	origem	Detecção de nodulação (dias)	Morfologia colonial			
			tamanho (mm)	borda	superfície	densidade ótica
UFRGS Ls1	Mostardas	31	2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Ls2	Mostardas		2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Ls3	Mostardas		2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Ls4	Mostardas		2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Ls5	Mostardas		2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Ls6	Mostardas	31	2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Ls7	Mostardas		2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Ls8	Mostardas	31	2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Ls9	Mostardas	15	1,5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Ls10	Mostardas	31	2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Ls11	Mostardas	31	2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Ls12	Mostardas		2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Ls13	Mostardas		2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Ls14	Mostardas	13	1	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Ls15	Mostardas		1,5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Ls16	Mostardas		2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Ls17	Mostardas		2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Ls18	Mostardas		4	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Ls19	Mostardas		2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Ls20	Mostardas		2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Ls21	Mostardas	31	2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Ls22	Mostardas	13	2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Ls23	Mostardas	31	1	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Ls24	Mostardas		4	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Ls25	Mostardas		4	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Ls26	Mostardas		2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Ls27	Mostardas		4	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Ls28	Mostardas		2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Ls29	Mostardas	31	<1	lisa	lisa	opaca
UFRGS Ls30	Mostardas		4	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Ls31	Mostardas		2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Ls32	Mostardas		2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Ls33	Mostardas		2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Ls34	Mostardas		2	lisa	lisa	translúcida

**APÊNDICE 7** Continuação...

isolado	origem	Detecção de nodulação (dias)	Morfologia colonial			
			tamanho (mm)	borda	superfície	densidade ótica
UFRGS Ls35	Mostardas		7		granular	translúcida
UFRGS Ls36	Mostardas	16	2			translúcida
UFRGS Ls37	Mostardas		3	lisa	lisa	
UFRGS Ls38	Mostardas		5	lisa	lisa	opaca
UFRGS Ls39	Mostardas		1	lisa	lisa	
UFRGS Ls40	Mostardas		1	lisa	lisa	
UFRGS Ls41	Mostardas		3	irregular	lisa	
UFRGS Ls42	Mostardas		1	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Ls43	Mostardas		5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Ls44	Mostardas		6	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Ls45	Mostardas		<1	lisa		translúcida
UFRGS Ls46	Mostardas		<1	lisa		translúcida
UFRGS Ls47	Mostardas		<1	lisa		translúcida
UFRGS Ls48	Mostardas		4			opaca
UFRGS Ls49	Porto Alegre		7			opaca
UFRGS Ls50	Porto Alegre	14	1			opaca
UFRGS Ls51	Porto Alegre	31	1			opaca
UFRGS Ls52	Porto Alegre	31	1			opaca
UFRGS Ls53	Porto Alegre		<1			opaca
UFRGS Ls54	Porto Alegre	14	<1			opaca
UFRGS Ls55	Porto Alegre		1			translúcida
UFRGS Ls56	Porto Alegre	41	1			opaca
UFRGS Ls57	Porto Alegre	31	2			opaca
UFRGS Ls58	Porto Alegre	14	<1			opaca
UFRGS Ls59	Porto Alegre	31	<2			opaca
UFRGS Ls60	Porto Alegre		1			opaca
UFRGS Ls61	Porto Alegre		1			translúcida
UFRGS Ls62	Porto Alegre	11	1			translúcida
UFRGS Ls63	Porto Alegre	31	2			opaca
UFRGS Ls64	Porto Alegre		1			translúcida
UFRGS Ls65	Porto Alegre	14	1			opaca
UFRGS Ls66	Porto Alegre	31	1			opaca
UFRGS Ls67	Porto Alegre		1			opaca
UFRGS Ls68	Porto Alegre		1			opaca
UFRGS Ls69	Porto Alegre		1			translúcida
UFRGS Ls70	Porto Alegre	16	6			translúcida
UFRGS Ls71	Porto Alegre	31	1			opaca
UFRGS Ls72	Porto Alegre		1	irregular		translúcida

**APÊNDICE 7** Continuação...

isolado	origem	Detecção de nodulação (dias)	Morfologia colonial			
			tamanho (mm)	borda	superfície	densidade ótica
UFRGS Ls73	Porto Alegre		2		granular	opaca
UFRGS Ls74	Porto Alegre		<1			opaca
UFRGS Ls75	Porto Alegre		<1			opaca
UFRGS Ls76	Porto Alegre		2			opaca