

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DE SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**COMPATIBILIDADE SIMBIÓTICA E CARACTERIZAÇÃO DE RIZÓBIOS DE  
*Lotus spp.*, ISOLADOS DE SOLOS DO RIO GRANDE DO SUL.**

Brenda Cristye Tonon  
Dissertação

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DE SUL  
FACULDADE DE AGRONOMIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**COMPATIBILIDADE SIMBIÓTICA E CARACTERIZAÇÃO DE RIZÓBIOS DE  
*Lotus spp.*, ISOLADOS DE SOLOS DO RIO GRANDE DO SUL.**

Brenda Cristye Tonon  
Engenheiro-Agrônomo (UEL)

Dissertação apresentada como  
um dos requisitos à obtenção do  
Grau de Mestre em Ciência do solo

Porto Alegre (RS) Brasil  
Junho de 2008

Aos meus pais, Oriverto e Audinir,  
e a minha irmã Bárbara

Ofereço.

Ao Henrique, meu noivo  
amor da minha vida  
Dedico

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por ter me concedido vida, saúde e disposição. Sem Ele nada seria possível.

À minha família, sempre presente com suas orações. Aos meus pais, Oriverto e Audinir Tonon, e minha irmã Bárbara que sempre me deram amor, exemplo de vida e por todo o amor dado a mim nesse período, e por compreender a minha ausência.

Ao meu orientador Prof. Enilson L. Saccol de Sá, não só pela amizade, mas também pelos conhecimentos transmitidos e pela compreensão diante das minhas dificuldades e limitações, por ter confiado em mim, mas também por ser um exemplo de dedicação profissional, competência e entusiasmo pelo que faz. Nunca esqueceu que estudante de pós-graduação é, antes de mais nada, colega de profissão, tratando a todos com respeito.

A UFRGS e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, pela oportunidade de cursar o mestrado. Aos professores que colaboraram para a minha formação.

Ao CNPq, pela bolsa de estudos ao Projeto LOTASSA por possibilitar a realização desse trabalho.

Ao amor da minha vida, Henrique Debiasi. Você é o que tenho de mais precioso nessa vida. Só sua presença já seria uma grande ajuda para a elaboração dessa dissertação. Mas você foi mais longe... Obrigado pelo amor, apoio e compreensão mesmo nos momentos mais difíceis dessa caminhada, pela força, pelas orações e por compreender a minha ausência.

A todos os colegas e amigos do PPGCS, principalmente àqueles com quem convivi mais diretamente: Benjamim Osório Filho, Andressa Silveira, Christina Venzke, Andréa Scaramal, Edicarlos Damacena, Adriana Giongo, Marcos Stroschein, Andréia Binz, Alano, Mariel Bizarro, Ricardo Fontoura,

Márcio Frizzo, Jackson Brilhante, Andressa e Marcelo.

Aos meus amigos Anorival Jr. e Andressa pela amizade incondicional, pelo carinho, apoio, pela ajuda nos momentos difíceis, e também pelas longas conversas e desabafos.

Ao funcionário e amigo Márcio Silveira pela grande ajuda nas análises de laboratório e principalmente pela amizade. E aos funcionários Adão (Laboratório de Química), e Antônio (Laboratório de Biogeoquímica Ambiental), pela grande ajuda nas análises e determinações laboratoriais. Também ao secretário do PPGCS, Jader Amaro, pela competência e dedicação e o Sr. José (Zé) pela ajuda no experimento de casa de vegetação.

Ao pesquisador da FEPAGRO Luciano Kayser Vargas, pela colaboração na execução do trabalho.

Ao professor Miguel Dall' Agnol, do Departamento de Plantas Forrageiras, pela concessão das sementes e pelo auxílio.

Quero agradecer aos meus velhos amigos, que de longe ou perto nunca abandonaram meus pensamentos: Julia Tufino, Eduardo Guerzoni, Deoclécio Garbuglio, Caroline Menara, Cristiane Pierolli, Flávia Narduci, Kalícia Dessunti e Dáfila Santos.

A todos aqueles que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado

# COMPATIBILIDADE SIMBIÓTICA E CARACTERIZAÇÃO DE RIZÓBIOS DE *Lotus spp.*, ISOLADOS DE SOLOS DO RIO GRANDE DO SUL.<sup>1/</sup>

Autor: Brenda Cristye Tonon

Orientador: Prof. Dr. Enilson L. Saccol de Sá

## RESUMO

Espécies do gênero *Lotus* têm sido utilizadas como plantas forrageiras no Estado do Rio Grande do Sul (RS). No entanto, tem sido observada certa especificidade hospedeira na simbiose rizóbio-*Lotus* quando se utiliza *L. corniculatus* em substituição a *L. subbiflorus*, na implantação de pastagens com essas leguminosas, e vice versa. Sendo assim, a hipótese deste trabalho é que, nos solos do estado, existem rizóbios nativos que formam diferentes grupos de compatibilidade simbiótica com espécies de *Lotus*. Para avaliação da compatibilidade simbiótica entre rizóbios nativos, isolados de solos do RS, e plantas de *L. corniculatus*, *L. uliginosus*, *L. subbiflorus* e *L. glaber*, foram realizadas a avaliação da inoculação cruzada em tubos de ensaio, em lampadário, e em vasos tipo “Leonard”, em casa de vegetação. Também se avaliou a compatibilidade simbiótica, em tubos de ensaio, de 159 rizóbios obtidos de *L. corniculatus*, *L. uliginosus*, *L. glaber* e *L. subbiflorus* que foram inoculados em plantas das quatro espécies de *Lotus*, avaliando-se a nodulação e a fixação de nitrogênio (N<sub>2</sub>). No experimento em casa de vegetação, com vasos “Leonard”, avaliaram-se quatro isolados de rizóbios nativos quanto à eficiência na fixação simbiótica de N<sub>2</sub> em plantas das quatro espécies de *Lotus*. Estes rizóbios também foram 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. Os isolados de rizóbios nativos UFRGS Lg5, Lg109 e Lg111, obtidos de *L. glaber*, foram ineficientes na simbiose com plantas de *L. subbiflorus* e *L. uliginosus* sendo eficientes apenas em plantas de *L. corniculatus* e *L. glaber*. No entanto, as estirpes EEL698, U512 e o isolado Lc340 foram capazes de induzir a formação de nódulos e de fixar N<sub>2</sub> em simbiose com todas as espécies de *Lotus* estudadas. Isto evidencia a existência, nas amostras de solo das localidades estudadas no RS, de rizóbios nativos eficientes em plantas de ambos os grupos de compatibilidade simbiótica, com potencial para serem usados em inoculantes funcionais para espécies de *Lotus*. Observou-se também que existem rizóbios potencialmente parasitas tanto para plantas das espécies *L. corniculatus* e *L. glaber* como para *L. uliginosus*.

<sup>1/</sup> Dissertação de mestrado em Ciência do Solo. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. (66p.). Junho, 2008. Trabalho realizado com apoio financeiro do CNPq e Projeto LOTASSA.

# SYMBIOTIC COMPATIBILITY AND CHARACTERIZATION OF NATIVE RHIZOBIA FOR *Lotus spp.*, ISOLATED FROM SOILS OF RIO GRANDE DO SUL

Author: Brenda Cristye Tonon  
Adviser: Enilson L. Saccol de Sá

## ABSTRACT

*Lotus sp.* species have great potential to be cultivated as forage plants in Rio Grande do Sul State (RS), Brazil. However, some symbiotic specificity has been observed in the Rhizobia-*Lotus* symbiosis when *L. corniculatus* is replaced by *L. subbiflorus* and *vice versa*. So, this work's hypothesis is that in the soils of RS there are native Rhizobia that form different groups with *Lotus* species. To evaluate the symbiotic compatibility among native Rhizobia, isolated from RS soils, and plants of *L. corniculatus*, *L. uliginosus*, *L. subbiflorus* and *L. glaber*, were made the evaluation of the cross-inoculation in tubes, under laboratory conditions, as well as in Leonard Jars under greenhouse conditions. In tubes, the symbiotic compatibility of 159 rhizobia, obtained from of *L. corniculatus*, *L. uliginosus*, *L. glaber* and *L. subbiflorus* plants, that were inoculated on plants of these four *Lotus* species and evaluated on their capacity to form nodules and fixing N<sub>2</sub>. In the green house experiments, whit Leonard jars, four native rhizobia isolates were evaluated regarding to the efficiency of symbiotic nitrogen fixation in association with plants of the four *Lotus* species studied. Those rhizobia also were genetically characterized by PCR fingerprinting of genomic DNA using primers BOX and ERIC. Native Rhizobia isolates obtained from *L. glaber* (UFRGS Lg5, Lg109 e Lg111) didn't establish an effective symbiosis with *L. subbiflorus* and *L. uliginosus*, being efficient only when inoculated on *L. corniculatus* and *L. glaber* plants. However, the strains EEL 698 and U512 as well as the isolate Lc 340 were able to induce nodulation and fixing N<sub>2</sub> in symbiosis with all the studied *Lotus* species. This find points to the existence, in the state's soil samples, of native Rhizobia efficient in plants of both symbiotic compatibility groups, whit potential to be used as inoculant for those *Lotus* species. It was observed that there are some native Rhizobia potentially parasitic with *L. corniculatus* and *L. glaber* and also *L. uliginosus*.

<sup>1/</sup> M. Sc. dissertation in Soil Science. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. (66 p.). June 2008. Financial support by CNPq and LOTASSA Project.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
2.1 Características das espécies de <i>Lotus</i> .....	3
2.2 Compatibilidade simbiótica entre rizóbio e <i>Lotus</i> spp.....	6
2.3 Caracterização genética dos rizóbios de <i>Lotus</i> .....	8
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	10
3.1 Autenticação dos isolados .....	11
3.2 Determinação dos grupos de compatibilidade simbiótica.....	11
3.2.1 Avaliação da compatibilidade simbiótica dos isolados de rizóbios nativos inoculados em plantas de <i>Lotus</i> em tubos em laboratório .....	12
3.2.2 Avaliação da compatibilidade simbiótica dos isolados de rizóbios nativos inoculados em plantas de <i>Lotus</i> em casa de vegetação.....	12
3.3 Caracterização genética dos isolados de rizóbios.....	14
3.3.1 Extração do DNA genômico dos isolados de <i>Lotus</i> .....	15
3.3.2 Amplificação do DNA genômico por oligonucleotídeos iniciadores .....	16
3.3.3 Análise dos produtos da amplificação .....	17



<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	19
4.1 Autenticações dos rizóbios isolados de solos do RS para espécies de <i>Lotus</i> .....	19
4.2 Determinação dos grupos de compatibilidade simbiótica.....	20
4.2.1 Avaliação da compatibilidade simbiótica em plantas de <i>L. uliginosus</i> dos isolados de rizóbios obtidos de plantas de <i>L. corniculatus</i> .....	20
4.2.2 Avaliação da compatibilidade simbiótica, em plantas de <i>L. uliginosus</i> , dos isolados de rizóbios obtidos de plantas de <i>L. glaber</i> .....	23
4.2.3 Avaliação da compatibilidade simbiótica, em plantas de <i>L. uliginosus</i> , dos isolados de rizóbios obtidos de plantas de <i>L. subbiflorus</i> .....	25
4.2.4 Avaliação da compatibilidade simbiótica, em plantas de <i>L. uliginosus</i> , <i>L. subbiflorus</i> , <i>L. corniculatus</i> e <i>L. glaber</i> , dos rizóbios de <i>L. uliginosus</i> .....	26
4.2.5 Avaliação da compatibilidade simbiótica, em plantas de <i>L. uliginosus</i> , <i>L. subbiflorus</i> , <i>L. corniculatus</i> e <i>L. glaber</i> , dos rizóbios obtidos de <i>L. subbiflorus</i> e <i>L. glaber</i> .....	29
4.3 Avaliação da compatibilidade simbiótica dos isolados de rizóbios nativos inoculados em plantas de <i>Lotus</i> em casa de vegetação.....	31
4.3.1 Avaliação da compatibilidade simbiótica dos isolados de rizóbios nativos inoculados em plantas de <i>L. corniculatus</i> em casa de vegetação .....	32
4.3.2 Avaliação da compatibilidade simbiótica dos isolados de rizóbios nativos inoculados em plantas de <i>L. glaber</i> em casa de vegetação.....	35

4.3.3 Avaliação da compatibilidade simbiótica dos isolados de rizóbios nativos inoculados em plantas de <i>L. subbiflorus</i> em casa de vegetação.....	38
4.3.4 Avaliação da compatibilidade simbiótica dos isolados de rizóbios nativos inoculados em plantas de <i>L. uliginosus</i> em casa de vegetação.....	41
4.3.5 Comparação da compatibilidade simbiótica dos isolados de rizóbios nativos com plantas das espécies de <i>L. corniculatus</i> , <i>L. glaber</i> , <i>L. subbiflorus</i> e <i>L. uliginosus</i> em casa de vegetação .....	45
4.4 Caracterização genotípica dos rizóbios isolados obtidos de plantas de <i>Lotus</i> .....	48
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>53</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>54</b>
<b>7 APÊNDICES .....</b>	<b>61</b>

## RELAÇÃO DE TABELAS

1. Análise das características químicas das amostras de solo das localidades estudadas .....	10
2. Estirpes de bactérias fixadoras de N recomendadas para produção de inoculante para <i>Lotus</i> com respectiva planta hospedeira, origem e outras designações .....	13
3. Composição das misturas para as reações de PCR para cada oligonucleotídeo iniciador .....	17
4. Programa dos ciclos utilizados na amplificação do DNA genômico para cada oligonucleotídeo iniciador.....	17
5. Autenticação em experimento em tubos, em lampadário, dos isolados de rizóbios obtidos de plantas de <i>L. uliginosus</i> e origem da amostra de solo.....	20
6. Número de isolados de rizóbios nativos dos solos do Rio Grande do Sul, obtidos de <i>Lotus corniculatus</i> , <i>L. glaber</i> e <i>L. subbiflorus</i> , capazes de induzir a nodulação e fixar nitrogênio em plantas de <i>L. uliginosus</i> .....	21
7. Rizóbios obtidos de nódulos de plantas de <i>L. corniculatus</i> capazes de induzir a nodulação e fixar nitrogênio em simbiose com plantas de <i>L. corniculatus</i> e <i>L. uliginosus</i> sob condições de crescimento em tubos de ensaio em lampadário. ....	22
8. Rizóbios obtidos de nódulos de plantas de <i>L. glaber</i> capazes de induzir a nodulação e fixar nitrogênio em simbiose com plantas de <i>L. glaber</i> e <i>L. uliginosus</i> sob condições de crescimento em tubos de ensaio em lampadário.....	24
9. Rizóbios obtidos de nódulos de plantas de <i>L. subbiflorus</i> capazes de induzir a nodulação e fixar nitrogênio em simbiose com plantas de <i>L. subbiflorus</i> e <i>L. uliginosus</i> sob condições de crescimento em tubos de ensaio em lampadário .....	26
10. Isolados de rizóbios obtidos de raízes de <i>L. uliginosus</i> capazes de induzir a nodulação e fixar nitrogênio em simbiose com plantas de <i>L. uliginosus</i> , <i>L. subbiflorus</i> , <i>L. corniculatus</i> e <i>L. glaber</i> sob condições de crescimento em tubos de ensaio em lampadário .....	27
11. Isolados de rizóbios obtidos de raízes de <i>L. subbiflorus</i> e <i>L. glaber</i> capazes de induzir a nodulação e fixar nitrogênio em simbiose com	

plantas de <i>L. subbiflorus</i> , <i>L. corniculatus</i> e <i>L. glaber</i> sob condições de crescimento em tubos de ensaio em lampadário .....	29
<b>12.</b> Número e massa seca de nódulos e massa seca e quantidade de nitrogênio acumulado na parte aérea de plantas de <i>Lotus corniculatus</i> , inoculadas com isolados de rizóbios e estirpes, em experimento conduzido em casa de vegetação .....	33
<b>13.</b> Número e massa seca de nódulos, massa seca e quantidade de nitrogênio acumulado na parte aérea de plantas de <i>Lotus glaber</i> inoculadas com isolados e estirpes de rizóbios, em experimento conduzido em casa de vegetação.....	36
<b>14.</b> Número e massa seca de nódulos, massa seca e quantidade de nitrogênio acumulado na parte aérea de plantas de <i>L. subbiflorus</i> inoculadas com isolados e estirpes de rizóbios em experimento conduzido em casa de vegetação .....	39
<b>15.</b> Número e massa seca de nódulos, massa seca e quantidade de nitrogênio acumulado na parte aérea de plantas de <i>Lotus uliginosus</i> inoculadas com isolados e estirpes de rizóbios em experimento conduzido em casa de vegetação.....	42
<b>16.</b> Número de nódulos e quantidade de nitrogênio total (mg planta <sup>-1</sup> ) obtido nas plantas das espécies de <i>L. corniculatus</i> , <i>L. glaber</i> , <i>L. subbiflorus</i> e <i>L. uliginosus</i> inoculadas com isolados e estirpes de rizóbios em experimento conduzido em casa de vegetação.....	46

## RELAÇÃO DE FIGURAS

1. Índice de eficiência relativa de fixação biológica de nitrogênio (%) em comparação à estirpe U510, das estirpes e isolados de rizóbios inoculados em plantas de *Lotus corniculatus*, em experimento conduzido em casa de vegetação .....34
2. Índice de eficiência relativa de fixação biológica de nitrogênio (%) em comparação à estirpe SEMIA 830, das estirpes e isolados de rizóbios inoculados em plantas de *L. glaber*, em experimento conduzido em casa de vegetação .....37
3. Índice de eficiência relativa da fixação biológica do nitrogênio (%) em comparação a estirpe SEMIA 850, dos isolados e estirpes de rizóbios inoculados em plantas de *L. subbiflorus*, em experimento conduzido em casa de vegetação .....41
4. Eficiência relativa da fixação simbiótica de nitrogênio (%) em comparação a estirpe SEMIA 839 dos rizóbios de *Lotus* isolados dos solos do RS inoculados em plantas de *L. uliginosus*, em experimento conduzido em casa de vegetação .....44
5. Perfil de bandas obtidas com amplificação do DNA genômico com os oligonucleotídeos iniciadores ERIC1-R e ERIC-2. Lambda= marcador de peso molecular Lambda Eco RI + Hind III. A foto é apresentada em negativo para melhor visualização das bandas.....49
6. Perfil de bandas obtidas com amplificação do DNA genômico com o oligonucleotídeo iniciador BOX A1. Lambda= marcador de peso molecular Lambda Eco RI + Hind III. A foto é apresentada em negativo para melhor visualização das bandas .....50
7. Dendrograma de genotipagem de estirpes e isolados de rizóbios para *L. corniculatus*, *L. glaber*, *L. subbiflorus* e *L. uliginosus*. Agrupamento obtido por UPGMA, utilizando-se o coeficiente de Jaccard, para perfil de bandas obtido a partir da PCR com os oligonucleotídeos iniciadores BOX A1-R + ERIC1-R e ERIC -2 .....51

## RELAÇÃO DE APÊNDICES

1. Solução Nutritiva (Sarruge, 1975).....	62
2. Meio extrato de levedura-manitol - LM (Vincent, 1970). ....	63
3. Rizóbios isolados de plantas de <i>L. uliginosus</i> e <i>L. corniculatus</i> autenticados por Frizzo (2007) quanto a nodulação e fixação simbiótica de nitrogênio em experimento em tubos mantidos sob condições de lampadário.....	64
4. Rizóbios isolados de plantas de <i>L. subbiflorus</i> e <i>L. glaber</i> autenticados por Fontoura (2007) quanto à nodulação e fixação simbiótica de nitrogênio em experimento em tubos mantidos sob condições de lampadário.....	66

## 1 INTRODUÇÃO

O estudo da simbiose entre leguminosas forrageiras e bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>) é de grande importância para o desenvolvimento de tecnologias que aumentem a produtividade, com o mínimo risco de degradação do solo e do ambiente. Ao mesmo tempo, o emprego de espécies de leguminosas forrageiras representa uma excelente fonte de proteína para os animais, além da possibilidade de ser utilizada como cobertura vegetal, na rotação com outras espécies, em sistema de semeadura direta.

As leguminosas forrageiras do gênero *Lotus* encontram-se amplamente distribuídas no mundo. As espécies *Lotus corniculatus* L., *L. uliginosus* Schkuhr, *L. subbiflorus* Lag. e *L. glaber* Mill (*Syn. L. tenuis* Waldst. & Kit.) (Kirkbride, 2006) têm sido mais utilizadas devido a sua capacidade de adaptação em regiões de clima temperado e subtropical, tolerância à acidez e à baixa fertilidade do solo e pelo seu valor como planta forrageira. Além disso, uma das principais justificativas para o uso de leguminosas em pastagens é a sua capacidade de fixar o N<sub>2</sub> pela simbiose com rizóbios nativos do solo. Posteriormente, uma maior quantidade desse nutriente poderá ser incorporado no solo e ser transferido às gramíneas.

No Rio Grande do Sul, *L. corniculatus* (cv. São Gabriel) e *L. subbiflorus* (cv. él Rincón) são as espécies de *Lotus* mais utilizadas como plantas forrageiras em pastagens cultivadas. No entanto, dificuldades para a implantação de *L. subbiflorus* em substituição a cultivares de *L. corniculatus*, e vice-versa, têm sido observadas. Um dos fatores que podem explicar a ocorrência desse problema é a existência de especificidade hospedeira na simbiose *Rhizobium-Lotus*, representada pela habilidade de uma estirpe de rizóbio em induzir a nodulação e/ou fixar nitrogênio atmosférico quando

associada às espécies do hospedeiro específico, sendo por isso uma importante característica a ser considerada em programas de seleção de novas estirpes. A especificidade hospedeira resulta na formação de grupos de compatibilidade simbiótica, onde *L. corniculatus* e *L. glaber* formam um grupo simbiótico efetivo com estirpes de crescimento intermediário, como *Mesorhizobium loti*, enquanto que *L. subbiflorus* e *L. uliginosus* formam um outro grupo simbiótico com estirpes de bactérias de crescimento lento do gênero *Bradyrhizobium* sp. É importante destacar que bactérias de um grupo simbiótico podem induzir a nodulação em plantas do outro grupo. Entretanto, os nódulos formados podem ser inefetivos ou, de outro modo, a relação estabelecida pode ser de parasitismo. Além disso, existe no Brasil um pequeno número de estirpes disponíveis na coleção oficial, recomendadas para a produção de inoculantes para *Lotus*: duas para *L. corniculatus*; uma para *L. uliginosus*, três para *L. subbiflorus* e uma para *L. glaber*. Diante disso, estudos que buscam o isolamento, caracterização e seleção destes microrganismos são importantes para a manutenção desses recursos e desenvolvimento de inoculantes mais eficientes para estas espécies.

Neste contexto, nos solos do estado, é possível a existência de rizóbios nativos que realizem simbiose eficiente tanto em plantas da espécie *L. corniculatus*, *L. glaber*, *L. uliginosus* como em *L. subbiflorus*, de modo que encontrem rizóbios eficientes para as quatro espécies. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a compatibilidade simbiótica entre os isolados de rizóbios nativos e as espécies de *Lotus* estudadas, e caracterizar genotipicamente os isolados de rizóbios nativos do Rio Grande do Sul eficientes na simbiose com estas espécies de *Lotus*.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Características das espécies de *Lotus*

Espécies leguminosas com potencialidade forrageira vêm sendo empregadas em diversas regiões pecuárias do Brasil, tanto em cultivo monofítico como consorciadas com gramíneas (Jacob Jr. et al., 2004). Além do alto valor nutritivo apresentado pelas leguminosas, uma das principais justificativas para o uso das mesmas em pastagens é a sua capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico que, posteriormente, será transferido às gramíneas (Scheffer-Basso et al., 2001), visando melhorar a qualidade da pastagem (Brose, 1992a).

As espécies perenes do gênero *Lotus* [*L. corniculatus* L., *Lotus uliginosus* Schkuhr (syn. *L. pedunculatus* Cav.), *L. subbiflorus* Lag. (syn. *L. hispidus* Desf.) e *L. glaber* Mill. (syn. *Lotus tenuis* Waldst. Et Kit. Ex Wild.)] têm sido mais difundidas devido à sua capacidade de adaptação em regiões de clima temperado e subtropical e pelo seu valor como planta forrageira (Paim e Riboldi, 1991). Essas leguminosas se destacam por sua capacidade de fixação biológica de nitrogênio (FBN), tolerância à acidez e à baixa fertilidade do solo e seu alto conteúdo de taninos, não provocando timpanismo nos animais (Langer, 1990; Soster et al., 2004a). O excelente valor nutritivo destas espécies deve-se principalmente aos seus elevados teores de proteína, podendo alcançar até 24% de proteína bruta e 86% de digestibilidade (López et al., 1966).

As espécies de *Lotus* foram introduzidas no sul do Brasil na década de 1940 (Paim, 1991). O cornichão (*L. corniculatus*) é uma leguminosa forrageira de grande importância em diversos países, especialmente no Uruguai, onde é utilizado no melhoramento de extensas áreas de pastagens

naturais (Maroso & Scheffer-Basso, 2007). É uma espécie perene, hiberno - primaveril, de origem européia e mediterrânea (Soster et al., 2004b), com excelente adaptação no sul do Brasil, Uruguai, Argentina e Chile (Paim & Riboldi, 1991). No Rio Grande do Sul, a cultivar de *L. corniculatus*, “São Gabriel”, foi desenvolvido a partir de pesquisas entre 1955 e 1965 na Estação Experimental do município de São Gabriel, RS (Paim, 1988). Esse cultivar é caracterizado pelo rápido estabelecimento inicial, grande vigor vegetativo, boa produtividade, elevada qualidade de forragem e boa ressemeadura natural, mas apresenta problemas de persistência, devido ao hábito de crescimento ereto, não suportando pastejo intenso (Paim & Riboldi, 1991). Esse é provavelmente o principal fator responsável pela pouca expansão dessa leguminosa no Sul do Brasil (Maroso & Scheffer-Basso, 2007).

Em comparação com outros sete cultivares testados no Rio Grande do Sul, Paim e Riboldi (1991) observaram que o cultivar São Gabriel de *Lotus corniculatus* foi o mais produtivo em todos os cortes ao longo do experimento de 2 anos de duração, com produção de forragem no primeiro ano de 3.262 Kg/ha de massa seca. Resultados semelhantes foram observados por Rocha et al. (2007) na avaliação da produção de forragem de espécies e cultivares forrageiros de inverno na Região da Depressão Central do RS, onde o cultivar São Gabriel de *L. corniculatus* se destacou como maior produtor de massa vegetal apresentando uma produção de MS de 6.627 Kg/ha.

*L. uliginosus* (cultivar tetraplóide Maku), denominado vulgarmente de “cornichão dos banhados” e “cornichão dos campos úmidos” (Maroso & Scheffer-Basso, 2007), é uma espécie leguminosa perene estival, rizomatosa, originária do Mediterrâneo. É uma espécie que se caracteriza por apresentar maior tolerância a solos ácidos e deficientes em fósforo em relação às outras espécies de *Lotus*, com elevada capacidade de estabelecimento em áreas úmidas (Paim & Riboldi, 1991; Brose, 1992b). Ao contrário de *L. corniculatus*, as plantas de *L. uliginosus* são bastante tolerantes ao alagamento e se adaptam bem em solos pobres e mal-drenados (Justin & Armstrong, 1987), suportando também pastejos intensos (Ayala et al., 2003). Paim & Riboldi (1991) relataram que, apesar dessa espécie apresentar boa qualidade da forragem produzida e adaptação a solos pobres e mal drenados, os produtores ainda fazem restrições ao uso desta devido ao lento estabelecimento, baixa

produção de sementes e difícil colheita das mesmas. Segundo Ayala et al. (2003), os muitos anos de pesquisa e a crescente expansão em nível comercial permitem afirmar que essa forrageira vem se constituindo, de maneira lenta, mas segura, em um novo aporte para melhorar a base forrageira dos rebanhos uruguaios.

Quanto à população de rizóbios no solo para *L. uliginosus*, nas condições do Planalto de Santa Catarina, Brose (1992b) constatou que as estirpes ocorrem com muito menos freqüência que em solos da Nova Zelândia e menos distribuídas do que as de cornichão (*L. corniculatus*). De acordo com o referido autor, isso pode estar relacionado ao fato de o uso de *L. uliginosus* pelos produtores do Planalto de Santa Catarina ser menos freqüente do que na Nova Zelândia.

Em relação à espécie *L. subbiflorus*, de acordo com Paim & Riboldi (1991), não há relatos de quando foi introduzida no Rio Grande do Sul, encontrando-se de forma espontânea em áreas de antigas coleções. É uma leguminosa de inverno, de hábito ereto a decumbente. Pode se comportar como planta bianual ou perene em áreas sem restrições hídricas. Demonstra ser adaptada a solos ácidos, de baixa fertilidade e drenagem deficiente (Lowther et al., 1987). Essa espécie possui um sistema radicular pouco profundo, mas abundante. A cultivar *el Rincón* é de procedência uruguaia e está em estudo na estação experimental La Estanzuela (Paim & Riboldi, 1991).

A espécie *L. glaber* é uma forrageira perene, de crescimento prostrado e que se ajusta bem em ambientes úmidos de clima temperado (Beuselinck, 1999). Esta espécie cresce no outono e na primavera, mas tolera baixas temperaturas e cobertura de gelo (Vignuolo et al., 1999). Também se adapta a ambientes de muita salinidade. Mujica & Rumi (1999) constataram boa resistência à salinidade na germinação de duas estirpes de *L. glaber* oriundas da bacia do Rio Salado, Argentina, região também conhecida por apresentarem solos com pH muito alto. Tem por distribuição primária o noroeste europeu, bacia do mediterrâneo e sudoeste asiático e posteriormente foi dispersa na Argentina e partes dos EUA (Blumenthal & McGraw, 1999), além do Chile. Cresce em solos com pH 5,8 a 6,0. No Chile, esta espécie é encontrada de forma espontânea nas áreas arroseiras.

## 2.2 Compatibilidade simbiótica entre rizóbio e *Lotus* spp.

O processo de nodulação que ocorre durante a associação simbiótica é controlado, em grande parte, pela troca de sinais entre os rizóbios e a planta hospedeira (Hirsch et al., 2003). Devido à diversidade de compostos e metabólitos secundários que compõem os exsudatos radiculares, plantas podem enviar um número bem diverso de sinais. Nas interações entre comunidades microbianas no solo e o sistema radicular das plantas, muitos dos compostos fenólicos e flavonóides são liberados pelas plantas como moléculas sinalizadoras para os simbiontes microbianos (Hirsch et al., 2003; Sullivan, 2004; Gage, 2004). Tais sinais são altamente específicos entre o hospedeiro e o simbionte, pois diferem consideravelmente entre as leguminosas, e esta especificidade possibilita que os rizóbios simbiontes identifiquem seus próprios hospedeiros (Bais et al., 2004).

O fator Nod é essencial para que se estabeleça uma relação simbiótica, e, na maioria dos casos, suficiente para induzir precocemente respostas na planta hospedeira (Limpens & Bisseling, 2003), entretanto, não é o único sinal bacteriano requerido para o sucesso da simbiose. Exopolissacarídeos (EPSs) e lipopolissacarídeos (LPSs) são importantes para a simbiose, tanto como componentes estruturais, quanto como moléculas sinalizadoras, pois estão ligados ao desenvolvimento nodular (Mathis et al., 2004). Além do reconhecimento entre o rizóbio e a planta hospedeira via troca de sinais bioquímicos, o estabelecimento da simbiose depende também de fatores abióticos (Lieven-Antoniou & Whittan, 1997), que podem influenciar diretamente a população de rizóbio e diminuir sua eficiência, como temperatura, umidade, fertilidade natural e acidez do solo (Hartwig, 1998; Andrade et al., 2000; Moreira & Siqueira, 2005). Além disso, as estirpes dependem, em parte, da capacidade de persistir no solo e competir com a microflora nativa já estabelecida (Giongo, 2007). Os rizóbios nativos e ineficientes podem competir com os rizóbios eficientes por sítios de infecção na planta hospedeira, sendo este outro fator limitante para o estabelecimento da simbiose (Moreira & Siqueira, 2005).

O estabelecimento da interação simbiótica exige o prévio e mútuo reconhecimento entre a bactéria e a planta hospedeira, o que ocorre mediante

a troca de sinais bioquímicos específicos e geneticamente codificados. Diante disso, Lieven-Antoniou & Whittan (1997) mencionam a compatibilidade genética e a conseqüente especificidade hospedeira entre a planta e o microsimbionte como um dos principais requisitos para o desenvolvimento da relação simbiótica. No caso específico das leguminosas pertencentes ao gênero *Lotus*, a simbiose pode ocorrer tanto com estirpes de bactérias de crescimento intermediário (*Mesorhizobium loti*), quanto de crescimento lento (*Bradyrhizobium sp.*) (Jarvis et al., 1997; Barrientos et al., 2002). No entanto, parece existir certa especificidade hospedeira entre determinadas espécies de *Lotus* e certos rizóbios. Nesse contexto, Hernández et al. (2005) supõem a existência de dois grupos simbióticos na interação rizóbio-*Lotus*, caracterizados pela compatibilidade simbiótica entre o hospedeiro e o microssimbionte. Um deles seria constituído por *L. corniculatus* e *L. glaber*, simbioticamente compatíveis com estirpes de rizóbio de crescimento rápido, como *Rhizobium loti*, atualmente denominado *Mesorhizobium loti* (Jarvis et al., 1997). Já *L. subbiflorus* e *L. glaber* formariam outro grupo simbiótico, relacionando-se efetivamente com estirpes de bactérias de crescimento lento pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*. Em outras palavras, as bactérias que produzem nódulos nas espécies de *L. corniculatus* e *L. glaber* não seriam capazes de induzir a nodulação em *L. uliginosus* e *L. subbiflorus* Lag., e vice-versa, formando assim grupos de incompatibilidade simbiótica. No entanto, bactérias de um grupo simbiótico podem induzir a nodulação em plantas do outro grupo, porém sendo simbioticamente ineficiente, ou então estabelecendo uma relação de parasitismo (Baraibar et al., 1999). Tal constatação é reforçada por Hernández et al. (2005), que salientam que os rizóbios eficientes em um grupo de especificidade comportam-se como parasitas no outro.

Desta forma, a especificidade hospedeira observada dentro dos grupos simbióticos se constitui, provavelmente, em uma das principais justificativas para os problemas de estabelecimento e desenvolvimento das plantas de *L. subbiflorus* e *L. uliginosus* quando as mesmas são implantadas em solos anteriormente cultivados com *L. corniculatus* e *L. glaber*, ou vice-versa, o que vêm sendo observado no Uruguai (Irisarri et al., 1996). Portanto, a especificidade hospedeira é uma importante característica a ser considerada em programas de seleção de novas estirpes (Peres et al., 1993; Carvalho,

2003), de forma a viabilizar a obtenção e seleção de isolados capazes de induzir a nodulação e fixar nitrogênio atmosférico de maneira eficiente nas quatro espécies de *Lotus*, sem que haja essa separação em dois grupos simbióticos. Estudos conduzidos por Baraibar et al. (1999) evidenciaram que esse objetivo pode ser alcançado. Estes autores, avaliando a efetividade simbiótica de populações nativas de *Mesorhizobium loti* nos solos do Uruguai, em três espécies de *Lotus* (*L. corniculatus*, *L. uliginosus* e *L. subbiflorus*), relataram uma baixa especificidade hospedeira, pela análise do índice de eficiência relativa (Brockwell et al., 1966).

### **2.3 Caracterização genética dos rizóbios de *Lotus***

Estudos de taxonomia e diversidade de rizóbio vêm tendo consideráveis avanços através do emprego de técnicas de biologia molecular, as quais permitem a identificação e classificação mais rápida e precisa de grande número de indivíduos (Grange, 2001; Stralioto, 2005). Entre essas técnicas, destaca-se a análise da reação em cadeia da polimerase (PCR - *Polymerase Chain Reaction*), que permite a amplificação de seqüências definidas da molécula de DNA (Laguerre et al., 1994; Chueire et al., 2000a). Vários são os relatos sobre a utilização da tecnologia da reação da PCR nos estudos de ecologia, genética e taxonomia de rizóbio (de Bruijn, 1992; Judd et al., 1993; Agius et al., 1997; Laguerre et al., 1997; Santos et al., 1999; Grange & Hungria, 2004; Giongo et al., 2007; Stroschein, 2007), e tem sido utilizada para determinar relações genéticas entre estirpes de *Rhizobium* (Laguerre et al., 1994) e *Bradyrhizobium* (Vinuesa et al., 1998).

Nos estudos de diversidade genética de rizóbios, a reação em cadeia da polimerase (PCR) com o uso de oligonucleotídeos iniciadores específicos, como BOX (Enterobacterial Repetitive Sequences), ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) e REP (Repetitive Extragenic Palindromic Sequences), que amplificam seqüências repetidas do DNA (Versalovic et al., 1994), permitem a diferenciação das estirpes estudadas (de Bruijn, 1992; Selenska-Pobell et al., 1995; Hungria et al., 1998; Santos et al., 1999; Chueire et al., 2000b; Mostasso et al., 2002). A reação da PCR tem apresentado bons resultados em estudos de diversidade e agrupamento por

similaridade. Grange (2001), avaliando a diversidade de rizóbio capaz de nodular o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), analisou rizóbios isolados de solos da região nordeste e da região sul do Brasil empregando as técnicas de PCR com o oligonucleotídeo específico ERIC, PCR-RFLP da região do DNA que codifica para o gene 16S rRNA com cinco enzimas de restrição e sequenciamento parcial ou total da região 16S rRNA. Os resultados obtidos neste estudo revelaram elevado grau de diversidade genética entre os isolados. Resultados semelhantes também foram obtidos por Fernandes et al. (2003). Neste trabalho foram analisados 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. E ainda, com base nestes resultados, confirmam que a análise por BOX-PCR é eficiente para discriminá-las, embora nem sempre tenha sido adequada nas avaliações filogenéticas, como já relatado por outros autores (Laguerre *et al.*, 1997; Chueire *et al.*, 2000b).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os rizóbios nativos estudados foram isolados por Frizzo (2007) e Fontoura (2007) a partir de amostras de solo e plantas de *L. corniculatus* L., *L. uliginosus* Schkuhr, *L. subbiflorus* lag. e *L. glaber*. Procurou-se realizar a coleta em áreas com histórico de cultivo dessas espécies de oito localidades do Estado do Rio Grande do Sul (Figura 1). Nas amostras de solo coletadas em Arroio dos Ratos e Porto Alegre não foram realizadas as análises das características químicas.

Tabela 1. Análise das características químicas das amostras de solo das localidades estudadas

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

Obs.: Análise realizada no laboratório de Análise de Solos da Faculdade de Agronomia da UFRGS (Tedesco et al., 1995).

A caracterização genotípica dos rizóbios foram realizadas nos Laboratórios de Microbiologia do Solo e de Biologia Molecular e os experimentos com plantas de *Lotus* foram conduzidos em casa de vegetação do Departamento de Solos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).



### 3.1 Autenticação dos isolados

Para a autenticação dos isolados de rizóbios obtidos, foram utilizados tubos de ensaio de 25cm de comprimento e 2,4cm de diâmetro, com solução nutritiva isenta de nitrogênio (Sarruge, 1975) (Apêndice 1), os quais foram esterilizados em autoclave por 15 minutos. Após, colocou-se uma semente pré-germinada, de cada espécie estudada (*L. corniculatus*, *L. glaber*, *L. subbiflorus* e *L. uliginosus*). As sementes foram cedidas pelo Dr. Miguel Dall'agnol, Departamento de Plantas Forrageiras – UFRGS. Estas sementes foram previamente escarificadas com lixa nº120 por 2 minutos, e desinfestadas por imersão sucessiva em álcool 70% por 30 segundos, hipoclorito de sódio (5%) por 1 minuto e lavadas diversas vezes com água desionizada, esterilizada em autoclave por 20 minutos. Após foram incubadas a 28°C por dois dias. Após quatro dias da colocação das plântulas nos tubos, estes foram inoculados com suspensão de células do cultivo de cada isolado de rizóbio, obtido de nódulos de *L. corniculatus*, *L. uliginosus*, *L. glaber* e *L. subbiflorus*, crescidos por 48 horas em meio levedura-manitol (Apêndice 2) líquido sob agitação a 120 rpm e a 28°C. Os tubos foram mantidos em lampadário com fotoperíodo de 12 horas diárias de luz. A avaliação visual da nodulação foi realizada aos 45 dias após a inoculação, sendo descartados os isolados que não formaram nódulos e considerados como rizóbios os que formaram nódulos. A fixação biológica de nitrogênio atmosférico também foi avaliada visualmente, observando-se o desenvolvimento e a coloração da parte aérea das plantas. A coloração esverdeada acentuada observada na área foliar foi considerada como indicativo da fixação simbiótica de nitrogênio.

### 3.2 Determinação dos grupos de compatibilidade simbiótica

Foram avaliados 159 rizóbios obtidos de plantas de *L. corniculatus*, *L. glaber*, *L. subbiflorus* e *L. uliginosus* (Frizzo, 2007; Fontoura, 2007) para determinação dos grupos de compatibilidade simbiótica desses isolados com as plantas das espécies de *Lotus* em estudo.

### **3.2.1 Avaliação da compatibilidade simbiótica dos isolados de rizóbios nativos inoculados em plantas de *Lotus* em tubos em laboratório**

Os rizóbios isolados das espécies *L. corniculatus*, *L. glaber*, *L. subbiflorus* e *L. uliginosus*, foram avaliados quanto à capacidade para produzir nódulos e fixar nitrogênio em outras espécies de *Lotus* que não a de onde foram isolados, indicando a compatibilidade simbiótica entre esses rizóbios e essas espécies de *Lotus*. O experimento foi realizado utilizando-se tubos de ensaio contendo gel formado com solução nutritiva (Sarruge, 1975), isenta de nitrogênio, e 7,5 g L<sup>-1</sup> de ágar. Posteriormente esta metodologia foi simplificada substituindo-se o gel por tira de 15 por 2 cm, de papel toalha, colocado no interior do tubo para servir de suporte à planta. Foram utilizadas sementes das quatro espécies de *Lotus* em estudo. As sementes foram escarificadas, desinfestadas e pré-germinadas conforme descrito no item 3.1. Após quatro dias do plantio das sementes pré-germinadas, realizou-se a inoculação do caldo dos rizóbios crescidos em meio levedura-manitol por 48 horas a 28°C com agitação a 120 rpm. Foram inoculadas alíquotas de 100 µL da suspensão de células de cada isolado em plântulas das quatro espécies de *Lotus* estudadas, separadamente e com duas repetições. Os tubos foram mantidos em lampadário com 12 horas diárias de luz em condições de temperatura ambiente por 50 dias.

Os experimentos foram conduzidos por 45 dias após o plantio e avaliados visualmente quanto ao número de nódulos formados, coloração dos nódulos e avaliação da fixação simbiótica de nitrogênio pela observação do crescimento das plantas e coloração das folhas.

### **3.2.2 Avaliação da compatibilidade simbiótica dos isolados de rizóbios nativos inoculados em plantas de *Lotus* em casa de vegetação**

Foram escolhidos para este estudo os seguintes isolados de rizóbios: um isolado de *L. corniculatus*, UFRGS Lc340, três isolados de *L. glaber*, UFRGS Lg5, Lg109 e Lg111 (Frizzo, 2007; Fontoura, 2007). Também foram escolhidas as estirpes EEL698, de *L. subbiflorus*, e EEL8084, de *L. uliginosus*, cedidas pelo Dr. Elemar Brose, da coleção da Estação Experimental de Lages – SC (EEL). Os rizóbios foram avaliados quanto à eficiência na

fixação simbiótica de nitrogênio em experimentos realizados em casa de vegetação, em vasos de “Leonard” (Vincent, 1970). Os vasos continham uma mistura de vermiculita e areia (proporção de 2:1), na parte superior e foram esterilizados em autoclave por 90 minutos a 1 atm e a 120°C. No momento do plantio, adicionou-se na parte inferior do vaso cerca de 400 mL de solução nutritiva (Sarruge, 1975) isenta de nitrogênio, diluída a 25% e esterilizada. Em cada vaso, foram plantados cinco sementes da mesma espécie de *Lotus*, desinfestadas e pré-germinadas. Os rizóbios foram inoculados nas plantas de *L. corniculatus*, *L. glaber*, *L. subbiflorus* e *L. uliginosus*, utilizando-se em cada vaso, uma alíquota de 1 mL do caldo de cada isolado crescidos em meio líquido LM, incubados por 48 horas a 28°C, sob agitação constante a 120 rpm, aproximadamente  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Após 15 dias, fez-se o desbaste deixando-se duas plantas por vaso.

Foram utilizadas para comparação as estirpes SEMIA 839, recomendada comercialmente como inoculante para *L. uliginosus*, SEMIA 830, recomendada como inoculante para *L. glaber*, e a estirpe SEMIA 850, recomendada para produção de inoculantes para *L. subbiflorus* no Brasil, fornecidas pela Coleção de Culturas de Rizóbios da Fundação de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul (FEPAGRO) (Tabela 2).

Tabela 2. Estirpes de bactérias fixadoras de N recomendadas para produção de inoculante para *Lotus* com respectiva planta hospedeira, origem e outras designações

<b>SEMIA</b>	<b>Planta Hospedeira</b>	<b>Origem</b>	<b>Outras designações</b>
830	<i>L. glaber</i>	Desconhecida	--
839	<i>L. uliginosus</i>	USA	NZP2021, CC829, TAL 925
850	<i>L. subbiflorus</i>	Uruguai	U-531

As estirpes U510, recomendada para produção de inoculantes para *L. corniculatus*, e U512, em estudos para a produção de inoculante no Uruguai, foram cedidas pelo Dr. Carlos Labandera do Ministerio de Ganaderia, Agricultura y Pesca do Uruguai (MGAP). Além dos tratamentos inoculados, foi conduzido um tratamento controle para cada espécie, sem inoculação e sem adição de nitrogênio. O experimento foi conduzido em casa de vegetação por 97 dias, com um delineamento inteiramente ao acaso com quatro repetições

por tratamento. Ao final do período, coletou-se a parte aérea das plantas que foi acondicionada em sacos de papel e seca em estufa a 65°C, até apresentar peso constante, e posteriormente pesado para determinação da massa seca produzida. Os nódulos radiculares foram destacados, contados e colocados em estufa a 65°C, durante três dias, para secagem. Também se determinou o teor de nitrogênio total na parte aérea, segundo metodologia descrita por Tedesco et al. (1995). Os dados referentes ao número e massa seca de nódulos, massa seca e N-Total da parte aérea foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo programa estatístico SISVAR (2003), e as médias foram comparadas pelo teste de Scot Knott ao nível de 5% de probabilidade. Foi determinado o índice de eficiência relativa, que mede a acumulação de nitrogênio fixado em relação aos tratamentos controles, segundo Brockwell et al., (1966). Para o cálculo foi utilizado como parâmetro de comparação o Ntotal da estirpe recomendada referente a cada espécie de *Lotus*. O índice de eficiência relativa da fixação de nitrogênio em relação ao N fixado pela estirpe foi calculado através da fórmula descrita abaixo.

$$\text{IER} = \frac{\text{Ntotal tratamento} - \text{Ntotal T-N}}{\text{Ntotal ER.} - \text{Ntotal T-N}} \times 100$$

onde:

Ntotal tratamento = nitrogênio total da planta do tratamento inoculado;

Ntotal T-N = nitrogênio total do controle não inoculado e sem nitrogênio;

Ntotal ER = nitrogênio total do controle inoculado com estirpe recomendada

### 3.3 Caracterização genética dos isolados de rizóbios

Os isolados de rizóbios testados quanto à eficiência na fixação de nitrogênio foram caracterizados geneticamente pelo método de amplificação do DNA genômico utilizando-se a técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase), comparando-se os perfis eletroforéticos das estirpes estudadas utilizando os oligonucleotídeos iniciadores BOX A1 e ERIC.

### 3.3.1 Extração do DNA genômico dos isolados de *Lotus*

O DNA genômico dos isolados de rizóbios e das estirpes recomendadas foi extraído pelo método de extração com sílica. A extração do DNA foi realizada a partir de uma cultura de células multiplicadas em meio LM e incubadas a 28°C durante 48 horas em agitação constante de 120 rpm. A partir do caldo de cultura, foram transferidas alíquotas de 1,5 mL para tubos de microcentrífuga esterilizados, para submetê-los a lavagens com soluções salinas (NaCl 1%), para a retirada dos polissacarídeos e resíduos de meio de cultura. Foram adicionados aos tubos 200 µL de solução EDTA salina (10 mM de EDTA pH 8 e 150mM de NaCl em água ultrapura), invertendo-os várias vezes para homogeneização. Foram adicionados aos tubos 100 µL de SDS 20% (Dodecil Sulfato de Sódio diluído em água ultrapura) homogeneizando-se cuidadosamente. Em seguida, os tubos foram colocados em banho-maria a 60°C por quinze minutos, sendo periodicamente homogeneizados por inversão. Após, adicionou-se 50 µL de perclorato de sódio (5M), cuidadosamente, gota a gota, seguido de inversão do tubo após a adição de cada gota. Adicionou-se 500 µL da mistura de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1), homogeneizando gentilmente por inversão até a formação de emulsão no tubo. Centrifugou-se por 5 minutos a 10.000 rpm e, em seguida, coletou-se o sobrenadante com cuidado, transferindo-o com auxílio de um micropipetador para um novo tubo de microcentrífuga. Adicionou-se 250 µL de NaCl 4 M, correspondente ao dobro do volume da amostra. Em seguida, adicionou-se 20 µL de dióxido de sílica (0,5g de dióxido de sílica, lavado previamente em tampão fosfato salina (PBS) em 45 mL de NaCl 4 M, mantida refrigerada e no escuro), previamente suspenso no vórtex, para que ocorresse a precipitação do DNA. Os tubos foram homogeneizados e deixados em banho-maria a 50°C por 5 minutos. Após rápido pulso em microcentrífuga, descartou-se o sobrenadante e o precipitado foi lavado duas vezes com 250 µL de solução G (NaCl 50 mM, Tris pH 7,5 10 mM, EDTA 2,5 mM, em etanol 50%, mantida sob refrigeração). Em cada lavagem, o tubo foi invertido 5 a 6 vezes, seguido de um rápido pulso em microcentrífuga e descartado o sobrenadante. Logo após a lavagem, os tubos contendo o precipitado foram colocados abertos para secar a temperatura ambiente por 1 hora. O precipitado foi ressuspenso em 60 µL de água ultrapura esterilizada, homogeneizando cuidadosamente com a ajuda de um

micropipetador, succionado com a ponteira 5 a 10 vezes, e colocando-se, em seguida, em banho-maria a 40°C por 10 minutos. Após, os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 3 minutos, transferindo-se o sobrenadante, contendo o DNA, para novos tubos de microcentrífuga esterilizados, conservando-os congelados a -20°C.

### **3.3.2 Amplificação do DNA genômico por oligonucleotídeos iniciadores**

Os DNAs genômicos dos isolados de rizóbios e das estirpes recomendadas foram caracterizados pela técnica de PCR, com a utilização de seqüências repetidas ERIC e BOX. A reação de amplificação foi realizada usando-se os seguintes nucleotídeos iniciadores:

1. ERIC - corresponde à 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').

A reação de amplificação do DNA genômico com o primer BOX foi realizada de acordo com o protocolo de Versalovic et al. (1994) modificado (Tabela 3), sendo a reação de amplificação utilizando o primer ERIC realizada segundo protocolo descrito por de Bruijn (1992) modificado (Tabela 3). As condições empregadas para a programação do termociclador são descritas na Tabela 4.

Em todas as reações de amplificação do DNA genômico utilizou-se como controle negativo uma reação contendo 20 µL de cada mistura e 5 µL de água ultrapura esterilizada. A concentração de DNA genômico usada nas

amplificações foi verificada em gel de agarose (1%), utilizando-se o DNA de fago lambda clivado com as enzimas de restrição Eco R-I e Hind III (Invitrogen) como padrão.

Tabela 3. Composição das misturas para as reações de PCR para cada oligonucleotídeo iniciador

Componentes	Oligonucleotídeos iniciadores	
	BOX A 1-R	ERIC1-R + ERIC-2
Tampão 10x *	1x	1x
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1 mM	1,5 mM
dNTP (10mM)	200 µM	200 µM
Taq pol (5 U µL <sup>-1</sup> )	1 U	1 U
DMSO	1 µL	1 µL
Oligonucleotídeo iniciador	10 pM	10 pM
Água ultra pura **		

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

(\*\*) Água ultrapura esterilizada em quantidade suficiente para completar o volume de 25 µL por tubo.

Tabela 4. Programa dos ciclos utilizados na amplificação do DNA genômico para cada oligonucleotídeo iniciador

Ciclo	n° de vezes	oligonucleotídeos iniciadores	
		BOX A 1-R	ERIC1-R + ERIC-2
1	1	95 °C - 7 min	95 °C - 7 min
2	30	94 °C - 1 min	94 °C - 1 min
		53 °C - 1 min	51 °C - 1 min
		65 °C - 8 min	65 °C - 8 min
3	1	65 °C - 16 min	65 °C - 16 min
4		4 °C - ∞	4 °C - ∞

### 3.3.3 Análise dos produtos da amplificação

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em cuba horizontal com tampão TBE 0,5X (Sambrook et al., 2001) durante 90 minutos a 80 V. Como padrão de peso molecular foi utilizado o DNA do fago lambda na primeira e última canaletas dos géis. Os géis foram corados durante 10 minutos em solução de brometo de etídio (1 µg mL<sup>-1</sup>) e, em seguida, imersos em água desionizada por 10 minutos. A visualização dos

fragmentos amplificados foi realizada com transluminador com luz ultravioleta e documentada com equipamento de fotografia digital.

O perfil de bandas no gel foi transformado em uma matriz binária bidimensional, utilizando-se o 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 Jaccard ( $i, j$ ) que não considera as similaridades negativas. As matrizes foram analisadas em conjunto pelo programa PAST (Hammer et al., 2007) e os dendrogramas obtidos pelo método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages*).



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Autenticações dos rizóbios isolados de solos do RS para espécies de *Lotus*

Entre os 159 isolados de rizóbios estudados, 15 foram autenticados neste trabalho e estão relacionados na Tabela 5, sendo todos isolados de plantas de *L. uliginosus*. No experimento para autenticação observou-se que todos foram capazes de induzir a nodulação nas plantas de *L. uliginosus*, espécie de onde foram isolados, sendo, por isso, autenticados como rizóbios. No entanto, apenas os isolados UFRGS Lu14, Lu23, Lu35a, Lu35b, Lu36, Lu49, e Lu55 foram capazes de fixar nitrogênio simbioticamente (Tabela 5).

Entre os demais isolados de rizóbios nativos estudados neste trabalho, 92 foram autenticados por Frizzo (2007) e apresentavam capacidade em induzir a nodulação, mas 80 fixavam nitrogênio simbioticamente (Apêndice 3). Os demais 52 isolados de rizóbios foram autenticados por Fontoura (2007) sendo todos capazes de induzir a nodulação, mas 36 foram capazes de fixar nitrogênio nas plantas de onde foram isolados (Apêndice 4).

Os resultados de autenticação de isolados de rizóbios obtidos neste trabalho (Tabela 5) e os obtidos por outros autores (Frizzo, 2007; Fontoura, 2007) mostram que é comum o isolamento de rizóbios que, apesar de induzirem a formação de nódulos na planta, não são capazes de fixar nitrogênio simbioticamente.

Tabela 5. Autenticação em experimento em tubos, em lampadário, dos isolados de rizóbios obtidos de plantas de *L. uliginosus* e origem da amostra de solo

Isolados*	<i>L. uliginosus</i>		Local
	Nodulação	Fixação N	
Lu14	+	+	Mostardas
Lu23	+	+	Mostardas
Lu35a	+	+	Eldorado do Sul
Lu35b	+	+	Eldorado do Sul
Lu36	+	+	Eldorado do Sul
Lu37	+	-	Eldorado do Sul
Lu45	+	-	Eldorado do Sul
Lu49	+	+	Eldorado do Sul
Lu53	+	-	Hulha Negra
Lu55	+	+	Hulha Negra
Lu58	+	-	Hulha Negra
Lu60	+	-	Hulha Negra
Lu61	+	-	Hulha Negra
Lu64	+	-	Hulha Negra
Lu65	+	-	Hulha Negra

\* isolados da coleção da UFRGS. Legenda: += positiva; -=negativa

## 4.2 Determinação dos grupos de compatibilidade simbiótica

Nesses experimentos, avaliou-se a capacidade em formar nódulos e fixar nitrogênio de 159 isolados de rizóbios, obtidos de plantas das espécies *L. corniculatus*, *L. glaber*, *L. subbiflorus* e *L. uliginosus*, quando inoculados em plantas de outras espécies de *Lotus* que não a de onde foram obtidos. Observou-se a existência de grupos de rizóbios capazes de formar nódulos e fixar nitrogênio simbioticamente tanto em plantas de *L. corniculatus* e *L. glaber* como também em plantas de *L. uliginosus*.

### 4.2.1 Avaliação da compatibilidade simbiótica em plantas de *L. uliginosus* dos isolados de rizóbios obtidos de plantas de *L. corniculatus*

Dos 59 isolados de rizóbios nativos obtidos de raízes de plantas de *L. corniculatus* inoculados em plantas de *L. uliginosus*, apenas os isolados UFRGS Lc336 e UFRGS Lc340 foram capazes de formar nódulos e fixar nitrogênio em simbiose com plantas de *L. uliginosus* (Tabela 6 e 7), nas condições do experimento em tubos de ensaio em lampadário. Os rizóbios

isolados de *L. corniculatus* UFRGS Lc336 e Lc340 são provenientes de amostras de solo de Hulha Negra. Segundo Frizzo (2007), observou que, conforme as características coloniais desses isolados, poderiam pertencer ao gênero *Mesorhizobium*.

Tabela 6. Número de isolados de rizóbios nativos dos solos do Rio Grande do Sul, obtidos de *Lotus corniculatus*, *L. glaber* e *L. subbiflorus*, capazes de induzir a nodulação e fixar nitrogênio em plantas de *L. uliginosus*

Isolados de	Nº de isolados	<i>L. uliginosus</i>	
		Nodulantes	Fixação de N
<i>L. corniculatus</i>	59	30	2
<i>L. glaber</i>	30	28	4
<i>L. subbiflorus</i>	5	3	1

Dados observados visualmente em experimento em tubos realizado em lampadário até 45 dias após a inoculação

Observa-se que 49% dos rizóbios isolados de *L. corniculatus*, estudados nesse trabalho, não induziram a formação de nódulos nas plantas de *L. uliginosus*. Observa-se que apenas 30 dentre 59 rizóbios obtidos de *L. corniculatus* foram capazes de nodular as plantas de *L. uliginosus* (Tabela 6), indicando compatibilidade nodular. Frizzo (2007), em seu trabalho de seleção e caracterização de rizóbios nativos dos solos do RS para *L. corniculatus* e *L. uliginosus*, encontrou rizóbios obtidos de *L. corniculatus* com colônias de 5 mm de diâmetro e gomosas em oito dias de crescimento em placas com meio LMA. Segundo o autor, essas características indicariam que os rizóbios obtidos de *L. corniculatus*, poderiam pertencer ao gênero *Mesorhizobium*, bactérias de crescimento intermediário. Esses rizóbios de *L. corniculatus* foram capazes de induzir a nodulação em plantas de *L. uliginosus*, indicando que plantas dessa espécie podem ser noduladas também por *Mesorhizobium loti*, além de *Bradyrhizobium* sp. (Estrella, 1997). Como exemplo, pode-se citar a estirpe NZP 2037 (Beltsville *Rhizobium* Culture Collection), caracterizada como *Mesorhizobium loti* e que apresenta capacidade em formar nódulos em plantas de *L. uliginosus* (Hotter & Scott, 1991). Por outro lado, existem autores que constataram especificidade hospedeira entre bactérias do gênero *Bradyrhizobium* e plantas de *Lotus uliginosus* (Brose, 1992b; Gault et al., 1994). Isso evidencia que especificidade entre os rizóbios dessas espécies não está bem definida nas plantas do gênero *Lotus*, fato já assinalado por Baraibar (1999).

Tabela 7. Rizóbios obtidos de nódulos de plantas de *L. corniculatus* capazes de induzir a nodulação e fixar nitrogênio em simbiose com plantas de *L. corniculatus* e *L. uliginosus* sob condições de crescimento em tubos de ensaio em lampadário.

Rizóbios de <i>L. corniculatus</i>	Inoculação em plantas de				Local
	<i>L. corniculatus</i>		<i>L. uliginosus</i>		
	Nod <sup>+</sup>	Fix <sup>+</sup>	Nod <sup>+</sup>	Fix <sup>+</sup>	
Lc 8	+	+	+	-	HN
Lc 11	+	+	-	-	HN
Lc 13	+	+	+	-	ES
Lc 14	+	+	-	-	ES
Lc 15	+	+	-	-	ES
Lc 18	+	+	+	-	ES
Lc 21	+	+	-	-	ES
Lc 22	+	+	-	-	ES
Lc 24	+	+	-	-	ES
Lc 25	+	+	+	-	ES
Lc 26	+	+	-	-	ES
Lc 27	+	+	-	-	ES
Lc 30	+	+	+	-	ES
Lc 32	+	+	-	-	ES
Lc 33	+	+	+	-	ES
Lc 34	+	+	+	-	ES
Lc 36	+	+	+	-	ES
Lc 38	+	+	-	-	ES
Lc 41	+	+	+	-	ES
Lc 44	+	+	+	-	ES
Lc 45	+	+	-	-	ES
Lc 46	+	+	-	-	ES
Lc 47	+	+	-	-	ES
Lc 48	+	+	+	-	ES
Lc 49	+	+	-	-	ES
Lc 50	+	+	+	-	ES
Lc 54	+	+	+	-	ES
Lc 55	+	+	-	-	ES
Lc 57	+	+	+	-	ES
Lc 58	+	+	-	-	ES
Lc 235	+	+	+	-	PA
Lc 240	+	+	-	-	PA
Lc 241	+	+	-	-	PA
Lc 242	+	+	-	-	PA
Lc 247	+	+	+	-	PA
Lc 250	+	+	+	-	PA

Legenda: Nod<sup>+</sup>= nodulação positiva; Fix<sup>+</sup>= fixação de N positiva; += positiva; - =negativo; HN = Hulha Negra; ES = Eldorado do Sul; PA = Porto Alegre; AR = Arroio dos Ratos - RS.

Tabela 7. Continuação...

Lc 252	+	+	-	-	PA
Lc 253	+	+	-	-	PA
Lc 254	+	+	+	-	PA
Lc 256	+	+	-	-	PA
Lc 270	+	+	-	-	PA
Lc 324	+	+	+	-	HN
Lc 327	+	+	-	-	HN
Lc 328	+	+	-	-	HN
Lc 331	+	+	+	-	HN
Lc 336	+	+	+	+	HN
Lc 338	+	+	-	-	HN
Lc 339	+	+	-	-	HN
Lc 340	+	+	+	+	HN
Lc 341	+	+	+	-	HN
Lc 343	+	+	+	-	HN
Lc 345	+	+	+	-	HN
Lc 346	+	-	-	-	HN
Lc 347	+	+	+	-	HN
Lc 348	+	+	+	-	HN
Lc 354	+	+	+	-	HN
Lc 386	+	+	+	-	AR
Lc 389	+	+	-	-	AR
Lc 392	+	+	+	-	AR

Legenda: Nod<sup>+</sup>= nodulação positiva; Fix<sup>+</sup>= fixação de N positiva; += positiva; - =negativo; HN = Hulha Negra; ES = Eldorado do Sul; PA = Porto Alegre; AR = Arroio dos Ratos/RS.

#### 4.2.2 Avaliação da compatibilidade simbiótica, em plantas de *L. uliginosus*, dos isolados de rizóbios obtidos de plantas de *L. glaber*

Entre os 30 isolados de rizóbios obtidos de plantas de *L. glaber*, 28 foram capazes de formar nódulos em plantas de *L. uliginosus* (Tabela 6) e apenas dois isolados não induziram a nodulação (Tabela 6 e 8). Entre estes, somente quatro isolados, UFRGS Lg5, Lg18, Lg109 e Lg111, foram capazes de fixar nitrogênio em simbiose com plantas de *L. uliginosus* (Tabela 8). Os resultados obtidos mostram que a maioria dos rizóbios isolados de *L. glaber* foi capaz de formar nódulos em plantas de *L. uliginosus* (Tabela 6 e 8), apresentando compatibilidade nodular, porém não foram capazes de fixar nitrogênio simbioticamente, o que concorda com as observações realizadas em estudo conduzido com rizóbios obtidos desta espécie (Estrella et al., 1997) e que indicou a existência de um grupo simbiótico característico. Os resultados obtidos neste trabalho indicam a existência de rizóbios potencialmente

parasitas para plantas da espécie *L. uliginosus* nas amostras de solos das localidades estudadas no estado.

Tabela 8. Rizóbios obtidos de nódulos de plantas de *L. glaber* capazes de induzir a nodulação e fixar nitrogênio em simbiose com plantas de *L. glaber* e *L. uliginosus* sob condições de crescimento em tubos de ensaio em lampadário

Rizóbios de <i>L. glaber</i>	Inoculação em plantas de				Local
	<i>L. glaber</i>		<i>L. uliginosus</i>		
	Nod <sup>+</sup>	Fix <sup>+</sup>	Nod <sup>+</sup>	Fix <sup>+</sup>	
Lg2	+	+	+	-	RP
Lg5	+	+	+	+	RP
Lg6	+	+	+	-	RP
Lg7	+	+	+	-	RP
Lg8	+	+	+	-	RP
Lg10	+	+	+	-	RP
Lg11	+	+	+	-	RP
Lg12	+	+	-	-	RP
Lg14	+	+	+	-	RP
Lg15	+	+	+	-	RP
Lg16	+	+	+	-	RP
Lg17	+	+	+	-	RP
Lg18	+	+	+	+	RP
Lg22	+	+	+	-	RP
Lg23	+	+	+	-	RP
Lg24	+	+	+	-	RP
Lg25	+	+	-	-	RP
Lg26	+	+	+	-	RP
Lg27	+	+	+	-	RP
Lg31	+	+	+	-	RP
Lg32	+	+	+	-	RP
Lg33	+	+	+	-	RP
Lg34	+	+	+	-	RP
Lg86	+	-	+	-	BG
Lg109	+	+	+	+	PA
Lg111	+	+	+	+	PA
Lg122	+	+	+	-	PA
Lg125	+	+	+	-	PA
Lg126	+	+	+	-	PA
Lg254	+	-	+	-	ES

Legenda: Nod<sup>+</sup>= nodulação positiva; Fix<sup>+</sup>= fixação de N positiva; += positiva; - = negativo; RP = Rio Pardo; BG = Bagé; PA = Porto Alegre; ES = Eldorado do Sul/RS

Observa-se que 90% dos rizóbios isolados de *L. glaber* induziram a formação de nódulos em plantas de *L. uliginosus* crescidas em tubos de ensaio em lampadário, indicando a existência de compatibilidade nodular entre os rizóbios de *L. glaber* em plantas de *L. uliginosus*. Apenas os isolados UFRGS

Lg12 e Lg25 não foram capazes de nodular as plantas dessa espécie. Observa-se que há a existência de compatibilidade simbiótica dos isolados de *L. glaber* UFRGS Lg5, Lg18, Lg109 e Lg111 com as plantas de *L. uliginosus*. Fontoura (2007), em seu trabalho de caracterização morfológica de isolados de rizóbios isolados de plantas de *L. glaber* a partir de amostras de solo de diversas regiões do Estado do Rio Grande do Sul, observou que, conforme as características coloniais desses isolados, poderiam pertencer ao gênero *Mesorhizobium*. De acordo com as observações feitas por Fontoura, pode-se inferir que as plantas de *L. uliginosus* podem ser noduladas por esses rizóbios isolados de *L. glaber*, pertencentes ao gênero *Mesorhizobium*. O que contraria alguns autores (Baraibar et al., 1999), que relatam que plantas de *L. uliginosus* são noduladas por rizóbios do gênero *Bradyrhizobium*.

#### **4.2.3 Avaliação da compatibilidade simbiótica, em plantas de *L. uliginosus*, dos isolados de rizóbios obtidos de plantas de *L. subbiflorus***

Entre os cinco isolados de rizóbios obtidos de plantas de *L. subbiflorus*, três foram capazes de formar nódulos em plantas de *L. uliginosus*, UFRGS Ls9, Ls51 e Ls59, mas somente o isolado UFRGS Ls9 foi capaz de fixar nitrogênio simbioticamente tanto em *L. subbiflorus* como em *L. uliginosus* (Tabela 6 e 9). Observa-se que os rizóbios Ls51, Ls52, Ls59 e Ls70, isolados de amostras de Porto Alegre, não foram capazes de estabelecer simbiose eficiente, pois não fixaram nitrogênio (Tabela 9). Fontoura (2007) salientou 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 capazes de induzir a nodulação em plantas de *L. subbiflorus* podem não ser originados de população autóctone e sim de população de rizóbios introduzida, adaptadas às condições de tais solos.

Tabela 9. Rizóbios obtidos de nódulos de plantas de *L. subbiflorus* capazes de induzir a nodulação e fixar nitrogênio em simbiose com plantas de *L. subbiflorus* e *L. uliginosus* sob condições de crescimento em tubos de ensaio em lampadário

Rizóbios de <i>L. subbiflorus</i>	Inoculação em plantas de				Local
	<i>L. subbiflorus</i>		<i>L. uliginosus</i>		
	Nod <sup>+</sup>	Fix <sup>+</sup>	Nod <sup>+</sup>	Fix <sup>+</sup>	
Ls9	+	+	+	+	MO
Ls51	+	-	+	-	PA
Ls52	+	-	-	-	PA
Ls59	+	-	+	-	PA
Ls70	+	-	-	-	PA

Legenda: Nod<sup>+</sup>= nodulação positiva; Fix<sup>+</sup>= fixação de N positiva; += positiva; - = negativo; MO = Mostardas; PA = Porto Alegre/RS

#### 4.2.4 Avaliação da compatibilidade simbiótica, em plantas de *L. uliginosus*, *L. subbiflorus*, *L. corniculatus* e *L. glaber*, dos rizóbios de *L. uliginosus*

Os 48 isolados de rizóbios nativos obtidos de plantas de *L. uliginosus* foram avaliados quanto à capacidade de nodulação e fixação de nitrogênio em *L. uliginosus*, espécie de onde foram isolados, bem como em plantas de *L. subbiflorus*, *L. corniculatus* e *L. glaber* (Tabela 10). Embora todos tenham induzido a formação de nódulos, 29 isolados (60%) foram capazes de fixar nitrogênio em simbiose com plantas de *L. uliginosus* (Tabela 10).

Quando inoculados em plantas de *L. subbiflorus*, dos 47 isolados de rizóbio estudados 37 apresentaram capacidade em induzir a formação de nódulos e 10 (21% dos isolados) não foram capazes de formar nódulos nesta espécie (Tabela 10).

Dentre os 47 isolados de *L. uliginosus* estudados em *L. subbiflorus*, 19 foram capazes de formar nódulos e fixar nitrogênio simbioticamente tanto em plantas de *L. uliginosus* como em *L. subbiflorus*, sendo estes os isolados Lu5, Lu8, Lu9, Lu11, Lu13, Lu14, Lu18, Lu19, Lu20, Lu22b, Lu23, Lu24, Lu25, Lu30, Lu35a, Lu35b, Lu36, Lu39 e Lu40 (Tabela 10).

Quando inoculados em plantas de *L. corniculatus*, observou-se que 35 dos isolados de rizóbios obtidos de *L. uliginosus* foram capazes de induzir a formação de nódulos (Tabela 10) e 12 destes, os isolados UFRGS Lu2, Lu13, Lu20, Lu25, Lu32, Lu37, Lu45, Lu53, Lu54, Lu57, Lu61 e Lu65 fixaram N simbioticamente nas condições do experimento.



Tabela 10. Isolados de rizóbios obtidos de raízes de *L. uliginosus* capazes de induzir a nodulação e fixar nitrogênio em simbiose com plantas de *L. uliginosus*, *L. subbiflorus*, *L. corniculatus* e *L. glaber* sob condições de crescimento em tubos de ensaio em lampadário

Rizóbios de <i>Lotus</i> <i>uliginosus</i>	Inoculação em plantas de								Local
	<i>L.uliginosus</i>		<i>L.subbiflorus</i>		<i>L.corniculatus</i>		<i>L.glaber</i>		
	Nod <sup>+</sup>	Fix <sup>+</sup>	Nod <sup>+</sup>	Fix <sup>+</sup>	Nod <sup>+</sup>	Fix <sup>+</sup>	Nod <sup>+</sup>	Fix <sup>+</sup>	
Lu2	+	-	+	-	+	+	+	-	MO
Lu4	+	+	-	-	+	-	-	-	MO
Lu5	+	+	+	+	+	-	-	-	MO
Lu7	+	-	+	+	-	-	+	-	MO
Lu8	+	+	+	+	+	-	-	-	MO
Lu9	+	+	+	+	+	-	+	-	MO
Lu10	+	-	+	+	+	-	+	-	MO
Lu11	+	+	+	+	-	-	-	-	MO
Lu12	+	-	+	+	+	-	-	-	MO
Lu13	+	+	+	+	+	+	+	-	MO
Lu14	+	+	+	+	+	-	-	-	MO
Lu15	+	+	-	-	-	-	-	-	MO
Lu16	+	+	+	-	+	-	+	-	MO
Lu17	+	-	+	+	+	-	-	-	MO
Lu18	+	+	+	+	+	-	-	-	MO
Lu19	+	+	+	+	+	-	-	-	MO
Lu20	+	+	+	+	+	+	-	-	MO
Lu21	+	-	+	+	-	-	+	-	MO
Lu22b	+	+	+	+	+	-	-	-	MO
Lu23	+	+	+	+	+	-	-	-	MO
Lu24	+	+	+	+	+	-	+	-	MO
Lu25	+	+	+	+	+	+	-	-	MO
Lu26	+	+	+	-	-	-	-	-	MO
Lu28	+	-	+	-	-	-	-	-	MO
Lu30	+	+	+	+	+	-	+	-	MO
Lu31	+	+	+	+	+	-	+	-	MO
Lu32	+	+	+	-	+	+	-	-	ES
Lu33	+	+	-	-	+	-	-	-	ES
Lu35a	+	+	+	+	-	-	+	+	ES
Lu35b	+	+	+	+	-	-	-	-	ES
Lu36	+	+	+	+	+	-	+	-	ES
Lu37	+	-	+	+	+	+	+	-	ES
Lu38	+	+	+	-	-	-	+	+	ES
Lu39	+	+	+	+	-	-	+	-	ES
Lu40	+	+	+	+	-	-	-	-	ES
Lu45	+	-	+	-	+	+	+	-	ES
Lu47	+	-	+	-	+	-	+	-	ES
Lu49	+	+	-	-	-	-	-	-	ES
Lu53	+	-	-	-	+	+	+	-	HN
Lu54	+	-	NA	NA	+	+	NA	NA	HN

Legenda: Nod<sup>+</sup>= nodulação positiva; Fix<sup>+</sup>= fixação de N positiva; += positiva; -=negativo; NA= não avaliado; MO= Mostardas; ES= Eldorado do Sul; HN= Hulha Negra – RS

Tabela 10. Continuação...

Lu55	+	+	-	-	+	-	+	+	HN
Lu57	+	-	-	-	+	+	+	+	HN
Lu58	+	-	+	-	+	-	+	-	HN
Lu60	+	-	-	-	+	-	+	-	HN
Lu61	+	-	-	-	+	+	+	-	HN
Lu62	+	-	-	-	+	-	+	+	HN
Lu64	+	-	+	+	-	-	+	-	HN
Lu65	+	-	+	-	+	+	+	+	HN

Legenda: Nod<sup>+</sup>= nodulação positiva; Fix<sup>+</sup>= fixação de N positiva; += positiva; - = negativo; NA= não avaliado; MO= Mostardas; ES= Eldorado do Sul; HN= Hulha Negra/RS.

Os isolados Lu13, Lu20 e Lu25 além de estabelecer simbiose eficiente com as plantas de *L. uliginosus*, também foram eficientes nas plantas de *L. subbiflorus* e *L. corniculatus* (Tabela 10), indicando compatibilidade simbiótica desses isolados com estas espécies de *Lotus*. Observa-se que 27% dos rizóbios isolados de *L. uliginosus*, estudados nesse trabalho, não induziram a formação de nódulos em plantas de *L. corniculatus* (Tabela 10), mas formaram nódulos e 19% fixaram nitrogênio em plantas de *L. uliginosus*. O fato de rizóbios de *L. uliginosus* terem sido capazes de induzir a nodulação em plantas de *L. corniculatus* indica que plantas dessa espécie podem ser noduladas não só por *Mesorhizobium*, mas também por *Bradyrhizobium*. Esses dados confirmam as observações realizadas por Jarvis et al. (1997), de que plantas da espécie *L. corniculatus* são capazes de formar nódulos em simbiose com *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium*. Os isolados de *L. uliginosus*, utilizados neste estudo, foram caracterizados como de crescimento lento, indicando ser pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*. (Frizzo, 2007).

Quando o estudo foi realizado com plantas de *L. glaber*, observou-se que dentre os 47 rizóbios de *L. uliginosus* estudados, 25 (55%) apresentaram capacidade em induzir nodulação (Tabela 10), mas apenas os isolados UFRGS Lu35a, Lu38, Lu55, Lu57, Lu62 e Lu65 foram capazes de fixar nitrogênio em simbiose com as plantas de *L. glaber* sob as mesmas condições do experimento em lampadário. Observa-se também que 45% dos rizóbios isolados de *L. uliginosus*, estudados nesse trabalho, não induziram a formação de nódulos em plantas de *L. glaber*. Observações semelhantes foram relatadas por Fulchieri et al. (2001), para rizóbios nativos isolados de *L. glaber* que foram capazes de induzir a nodulação em plantas da espécie *L. uliginosus*. Esses

isolados também foram caracterizados como sendo de crescimento lento, assim como os isolados de *L. uliginosus* caracterizados por Frizzo (2007) e utilizado neste estudo. Barrientos et al. (2002), avaliando a eficiência simbiótica de estirpes naturalizadas de *Mesorhizobium loti* e *Bradyrhizobium sp.* (*Lotus*), provenientes de solos da região centro-sul do Chile, em plantas de três espécies do gênero *Lotus*, também observou que dos 68 isolados inoculados em plantas de *L. glaber*, apenas 11 induziram a formação de nódulos. Esses isolados de rizóbios corresponderiam a *Bradyrhizobium sp.* e *Mesorhizobium loti*, obtidos de plantas de *L. uliginosus* e *L. glaber*, respectivamente.

#### 4.2.5 Avaliação da compatibilidade simbiótica, em plantas de *L. uliginosus*, *L. subbiflorus*, *L. corniculatus* e *L. glaber*, dos rizóbios obtidos de *L. subbiflorus* e *L. glaber*

Os 10 isolados de rizóbios nativos obtidos de raízes de *L. subbiflorus* foram avaliados quanto à capacidade de nodulação e fixação de N em *L. subbiflorus*, espécie de onde foram isolados, bem como em plantas de *L. glaber* e *L. corniculatus* (Tabela 11).

Tabela 11. Isolados de rizóbios obtidos de raízes de *L. subbiflorus* e *L. glaber* capazes de induzir a nodulação e fixar nitrogênio em simbiose com plantas de *L. subbiflorus*, *L. corniculatus* e *L. glaber* sob condições de crescimento em tubos de ensaio em lampadário

Rizóbios	Inoculação em plantas de						Local
	<i>L.subbiflorus</i>		<i>L.corniculatus</i>		<i>L. glaber</i>		
	Nod <sup>+</sup>	Fix <sup>+</sup>	Nod <sup>+</sup>	Fix <sup>+</sup>	Nod <sup>+</sup>	Fix <sup>+</sup>	
<b><i>L. subbiflorus</i></b>							
Ls1	+	+	+	+	-	-	MO
Ls22	+	+	+	-	-	-	MO
Ls23	+	-	+	-	-	-	MO
Ls29	+	+	+	-	+	-	MO
Ls36	+	-	+	-	+	-	MO
Ls50	+	+	+	-	-	-	PA
Ls54	+	-	+	-	-	-	PA
Ls57	+	+	+	-	+	-	PA
Ls62	+	+	+	-	+	-	PA
Ls65	+	+	+	-	+	-	PA
EEL698	+	+	+	-	-	-	LG

Isolados da coleção da UFRGS; estirpe da coleção da Estação Experimental de Lages; Legenda: Nod<sup>+</sup>= nodulação positiva; Fix<sup>+</sup>= fixação de N positiva; += positiva; -=negativo; MO= Mostardas; PA= Porto Alegre; PF= Passo Fundo; RP= Rio Pardo - RS; LG= Lages - SC.

Tabela 11. Continuação...

<i>L. glaber</i>							
Lg4	-	-	+	+	+	+	RP
Lg13	-	-	+	+	+	+	RP
Lg29	+	+	+	+	+	+	RP
Lg108	-	-	+	+	+	+	PA
Lg121	-	-	+	+	+	+	PA
Lg149	-	-	+	+	+	+	PF
Lg156	-	-	+	+	+	+	PF

Isolados da coleção da UFRGS; estirpe da coleção da Estação Experimental de Lages; Legenda: Nod<sup>+</sup>= nodulação positiva; Fix<sup>+</sup>= fixação de N positiva; += positiva; -=negativo; MO= Mostardas; PA= Porto Alegre; PF= Passo Fundo; RP= Rio Pardo - RS; LG= Lages - SC.

Todos os isolados de rizóbios nativos obtidos de plantas de *L. subbiflorus* UFRGS Ls1, Ls22, Ls23, Ls29, Ls36, Ls50, Ls54, Ls57, Ls62 e Ls65, foram capazes de induzir a nodulação quando inoculados em plantas de *L. corniculatus* (Tabela 11). E destes, somente o isolado UFRGS Ls1 fixou nitrogênio em simbiose com plantas de *L. corniculatus* (Tabela 11). Fontoura (2007) avaliou a eficiência relativa da fixação de N do isolado UFRGS Ls1, em experimento com plantas de *L. subbiflorus* em casa de vegetação, e observou índice de eficiência relativa acima de 70%, em comparação ao tratamento controle sem inoculação com adição de nitrogênio mineral, sendo também superior ao obtido nas plantas inoculadas com a estirpe SEMIA 849, que é recomendada como inoculante comercial para essa espécie no Brasil, e que apresentou índice de eficiência relativa de apenas 20%.

Quando esses mesmos 10 isolados foram inoculados em plantas de *L. glaber*, verificou-se que apenas os isolados UFRGS Ls29, Ls36, Ls57, Ls62 e Ls65 apresentaram capacidade de induzir a formação de nódulos, mas não de fixar N simbioticamente nessa espécie de *Lotus* (Tabela 11).

Os isolados de rizóbios nativos obtidos de plantas de *L. glaber* UFRGS Lg4, Lg13, Lg29, Lg108, Lg121, Lg149 e Lg156 foram avaliados quanto à capacidade de nodulação e fixação de nitrogênio em *L. glaber*, espécie de onde foram isolados, bem como em *L. corniculatus* e *L. subbiflorus* (Tabela 11). Todos esses sete isolados apresentaram capacidade em induzir a nodulação e fixar N simbioticamente nas plantas de *L. glaber*, espécie de onde foram isolados e em *L. corniculatus*. O isolado UFRGS Lg29 também foi capaz

de induzir a nodulação e fixar nitrogênio em simbiose também com plantas de *L. subbiflorus*, indicando a compatibilidade simbiótica deste isolado com esta espécie de *Lotus*.

Observou-se que, em média, 65% dos rizóbios obtidos de plantas de *L. corniculatus* e *L. glaber* foram capazes de induzir e fixar N em plantas de *L. uliginosus*. No entanto, apenas 13% dos isolados de *L. uliginosus* e *L. subbiflorus* foram capazes de induzir a nodulação em *L. corniculatus* e *L. glaber*. Portanto, muitos dos rizóbios estudados são capazes de induzir a nodulação em outras espécies de *Lotus* que não a de onde foram obtidos, contrariando as observações de Hernández et al. (2005) da existência de grupos simbióticos entre espécies de *Lotus* e algumas estirpes de rizóbios e de que esses grupos não são compatíveis entre si. Os resultados deste trabalho mostram que existem rizóbios capazes de realizar simbiose eficiente em espécies diferentes de *Lotus*, sendo mais promíscuos e constituindo-se em grupo promissor para futuros estudos, sendo os rizóbios UFRGS Lu13, Lu20, Lu25, Lg29 os que apresentaram capacidade de estabelecer simbiose eficiente em experimento em tubos em outras espécies de *Lotus*, conforme já discutido anteriormente nos itens 4.2.4 e 4.2.5.

### **4.3 Avaliação da compatibilidade simbiótica dos isolados de rizóbios nativos inoculados em plantas de *Lotus* em casa de vegetação**

Para estes experimentos, foram escolhidos os isolados UFRGS Lc340, obtido de *L. corniculatus* e estudado por Frizzo (2007) e Lg5, Lg109, Lg111, obtidos de *L. glaber* e estudados por Fontoura (2007). Estes isolados foram escolhidos para a avaliação por terem induzido a formação de nódulos eficientes em plantas da espécie de onde foram obtidos, e em outras espécies de *Lotus* quando avaliados em tubos (Tabelas 7 e 8). Além destes isolados, também foram estudadas as estirpes SEMIA 830, para *L. glaber*, SEMIA 839, para *L. uliginosus*, que são recomendadas para a produção de inoculantes no Brasil, e SEMIA 850, recomendada para *L. subbiflorus* no Brasil, as estirpes EEL698, para *L. subbiflorus*, EEL8084, para *L. uliginosus*, e as estirpes U510, recomendada no Uruguai para cornichão (*L. corniculatus*), e U512 (em estudo no Uruguai -MGAP).

Cabe destacar que para fins de comparações de eficiência simbiótica, foram utilizados os resultados obtidos nos tratamentos inoculados com as estirpes recomendadas para a espécie de *Lotus* estudada em cada experimento.

#### **4.3.1 Avaliação da compatibilidade simbiótica dos isolados de rizóbios nativos inoculados em plantas de *L. corniculatus* em casa de vegetação**

Na Tabela 12, são mostrados os valores médios do número e massa seca de nódulos, bem como da massa seca e quantidade de nitrogênio total da parte aérea, produzidos nas plantas de *L. corniculatus* dos tratamentos inoculados com as estirpes e com os isolados de rizóbios. O tratamento inoculado com a estirpe U510, recomendada para produção de inoculantes para *L. corniculatus* no Uruguai, foi utilizado para comparação com os resultados obtidos nos demais tratamentos.

O número de nódulos por planta em *L. corniculatus* variou de 133 a 261 (Tabela 12). As plantas de todos os tratamentos inoculados apresentaram nódulos radiculares não sendo observada nenhuma diferença no número de nódulos por planta nem na massa seca de nódulos (Tabela 12). Estes resultados mostram que, em termos de capacidade para nodulação, todos os rizóbios estudados apresentaram elevada capacidade para induzir a formação de nódulos em plantas de *L. corniculatus*, cultivar São Gabriel, apesar do fato de esta não ser a espécie para a qual são recomendados.

Neste trabalho, as plantas de *L. corniculatus* inoculadas com rizóbios obtidos de outras espécies e de *L. corniculatus* (isolado UFRGS Lc340) apresentaram número médio de nódulos maior do que o observado por Frizzo (2007), com rizóbios obtidos de *L. corniculatus* e inoculados nas plantas da mesma espécie (em média, 81 nódulos por planta) e também superaram os valores observados por Barrientos et al. (2002), em trabalho com estirpes nativas dos solos chilenos, obtidos de *L. glaber*, que também foram capazes de formar poucos nódulos em plantas de *L. corniculatus*, em média um nódulo por planta.

Tabela 12. Número e massa seca de nódulos e massa seca e quantidade de nitrogênio acumulado na parte aérea de plantas de *Lotus corniculatus*, inoculadas com isolados de rizóbios e estirpes, em experimento conduzido em casa de vegetação

Tratamento	N° de nódulos planta <sup>-1</sup> *	Massa seca de nódulos	Massa seca da parte aérea	
			Quantidade de nitrogênio	
			-----mg planta <sup>-1</sup> -----	
EEL698	169 a	99,7 a	1286,5 a	46,6 a
U510	179 a	87,5 a	1053,7 b	40,7 a
U512	133 a	81,2 a	955,7 c	39,8 a
UFRGS Lg111	168 a	74,2 a	928,5 c	38,1 a
UFRGS Lg109	172 a	94,0 a	870,7 c	34,9 a
EEL8084	261 a	94,5 a	961,5 c	31,4 b
UFRGS Lg5	195 a	83,5 a	659,5 d	26,7 b
UFRGS Lc340	229 a	90,5 a	751,0 d	25,7 b
T-N	-	-	28,0 e	0,2 c
CV (%)	23	16,9	16,6	17,2

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5%. Médias de quatro repetições. \*Dados transformados por  $(x+1)^{1/2}$

Analisando-se a produção de massa seca (Tabela 12) verifica-se que a maior produção foi obtida nas plantas inoculadas com a estirpe EEL698, para *L. subbiflorus*. A segunda maior produção de massa seca foi obtida nas plantas inoculadas com a estirpe U510, para *L. corniculatus*, sendo superior à obtida nas plantas dos demais tratamentos. Já em relação à quantidade de nitrogênio total acumulado na parte aérea das plantas inoculadas, observa-se que todos os rizóbios foram capazes de fornecer nitrogênio às plantas via simbiose (Tabela 12). No entanto, as maiores quantidades de nitrogênio total foram obtidos nas plantas inoculadas com as estirpes EEL698, U510 e U512 e com os isolados UFRGS Lg111 e Lg 109. Destes rizóbios, apenas a estirpe U510 é para *L. corniculatus*, porém os demais não diferiram na eficiência na fixação de nitrogênio em relação a esta estirpe (Figura 1). Observa-se também que entre os rizóbios mais eficientes na fixação de nitrogênio, exceto a estirpe EEL698, os demais são rizóbios para *L. glaber* e que teriam compatibilidade simbiótica com *L. corniculatus*. Resultados semelhantes foram obtidos por Barrientos et al. (2002), que observaram que em *L. corniculatus* três dos oito isolados obtidos de plantas de *L. glaber* foram capazes de induzir a nodulação e que esses isolados corresponderiam a *Mesorhizobium loti*. Ao contrário do

que se observou no presente trabalho e também por Barrientos et al. (2002), a compatibilidade simbiótica entre as espécies de *L. glaber* e *L. corniculatus* não foi observada por Estrella et al. (1997), uma vez que a estirpe de *L. glaber* 1-INTECH induziu a formação de nódulos em *L. corniculatus*, porém não foram eficientes na fixação de nitrogênio.

No entanto, chama a atenção o fato de que a estirpe EEL698, para *L. subbiflorus*, tenha tido eficiência relativa na fixação de nitrogênio similar à observada para a estirpe U510, para *L. corniculatus*. Também a estirpe EEL8084, para *L. uliginosus*, foi capaz de fixar nitrogênio em simbiose com plantas de *L. corniculatus*, embora tenha apresentado apenas 77% de eficiência em relação à estirpe U510 (Figura 1). Estes resultados indicam a existência de rizóbios eficientes em plantas de outras espécies de *Lotus*, que não a de onde foram isolados, indicando compatibilidade simbiótica e mostrando potencial para serem usados em inoculantes funcionais para espécies de *Lotus*.

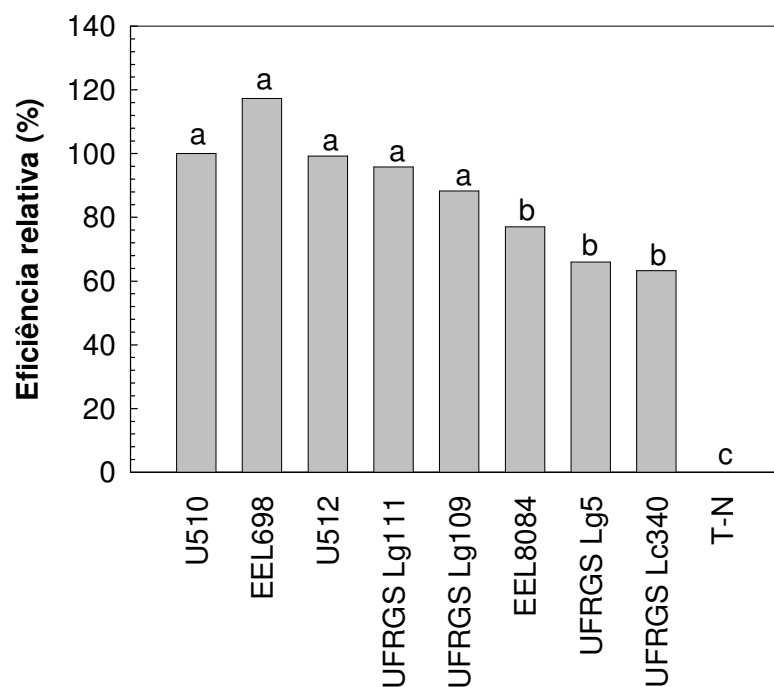


Figura 1. Índice de eficiência relativa de fixação biológica de nitrogênio (%) em comparação à estirpe U510, das estirpes e isolados de rizóbios inoculados em plantas de *Lotus corniculatus*, em experimento conduzido em casa de vegetação



#### 4.3.2 Avaliação da compatibilidade simbiótica dos isolados de rizóbios nativos inoculados em plantas de *L. glaber* em casa de vegetação

Os valores médios de número e massa seca de nódulos e também massa seca e quantidade de N acumulado na parte aérea das plantas de *L. glaber* são mostrados na Tabela 13. Neste experimento, o número de nódulos por planta em *L. glaber* variou de 46 a 233 (Tabela 13). Salienta-se que a estirpe SEMIA 830 é atualmente recomendada para produção de inoculantes para *L. glaber* (syn. *L. tenuis*) no Brasil. No entanto, pode-se observar na Tabela 13 que esta estirpe produziu baixo número de nódulos e se mostrou ineficiente na fixação simbiótica de nitrogênio nas plantas inoculadas. Observa-se que a quantidade de nitrogênio total acumulado nas plantas inoculadas com esta estirpe não diferiu do obtido nas plantas do tratamento controle não inoculado e sem adição de nitrogênio (Tabela 13).

Os isolados de rizóbios nativos UFRGS Lg109 e Lg5, obtidos de *L. glaber*, induziram a formação de maior número de nódulos radiculares do que os demais (Tabela 13). As plantas inoculadas com as estirpes EEL 8084, para *L. uliginosus*, e EEL698, para *L. subbiflorus*, apresentaram número de nódulos intermediário, mas superior ao produzido nas plantas inoculadas pelos isolados UFRGS Lg111, Lc340 e pelas estirpes U512 e a SEMIA 830, que produziu em média 87 nódulos por planta. Resultados semelhantes foram encontrados por Fontoura (2007), que observou que plantas de *L. glaber* inoculadas com a estirpe SEMIA 830 produziram poucos nódulos (em média 98 nódulos por planta) em relação às inoculadas com outros isolados obtidos de *L. glaber*, em experimento em casa de vegetação.

Em relação à produção de massa seca de nódulos formados nas plantas de *L. glaber* dos tratamentos inoculados com o isolado UFRGS Lg109 e a estirpe EEL698 foram superiores aos demais tratamentos que não diferiram da massa de nódulos formada nas plantas inoculadas com a estirpe SEMIA 830 (Tabela 13). Os isolados estudados neste trabalho apresentaram capacidade em induzir maior número de nódulos em plantas de *L. glaber*, principalmente dos rizóbios que não foram isolados dessa espécie, quando comparados aos resultados obtidos por Barrientos et al. (2002) com rizóbios

isolados dos solos da região do Chile, onde a maior nodulação foi de 2 nódulos por planta.

Tabela 13. Número e massa seca de nódulos, massa seca e quantidade de nitrogênio acumulado na parte aérea de plantas de *Lotus glaber* inoculadas com isolados e estirpes de rizóbios, em experimento conduzido em casa de vegetação

Tratamento	N° de nódulos planta <sup>-1</sup> *	Massa seca de nódulos	Massa seca da parte aérea	Quantidade de nitrogênio
UFRGS Lg109	233 a	115,7 a	1249,7 a	44,3 a
EEL8084	118 b	61,5 b	802,2 b	27,4 b
U512	77 c	70,5 b	732,7 b	23,6 b
EEL698	138 b	86,7 a	716,5 b	23,6 b
UFRGS Lg111	79 c	68,0 b	659,0 b	21,3 b
UFRGS Lg5	181 a	60,2 b	575,2 b	17,6 b
UFRGS Lc340	46 c	52,2 b	354,2 c	9,1 c
SEMIA 830	87 c	32,0 b	218,7 c	8,2 c
T-N	0	0	31,2 c	0,4 c
CV (%)	18,61	31,21	41,4	40,7

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5%. Médias de quatro repetições. \*Dados transformados por  $(x+1)^{1/2}$ .

Avaliando-se a produção de massa seca da parte aérea (Tabela 13), observa-se que as plantas de *L. glaber* inoculadas com o isolado UFRGS Lg109 produziram maior massa e também de maior acúmulo de nitrogênio total na parte aérea do que as inoculadas nos demais tratamentos. As plantas inoculadas com os isolados UFRGS Lg111, Lg5 e com as estirpes EEL8084, EEL698, e U512 apresentaram produção de massa seca da parte aérea intermediária, sendo superiores aos tratamentos inoculados com o isolado UFRGS Lc340, a estirpe SEMIA 830 e o controle não inoculado e sem adição de N. Apesar destes isolados terem induzido a formação de poucos nódulos, esses tratamentos apresentaram boa produção de massa seca da parte aérea, indicando que esses rizóbios foram eficientes na fixação de nitrogênio, pois foram capazes de suprir o nitrogênio requerido pela planta.

As plantas de *L. glaber* do tratamento inoculado com o isolado UFRGS Lg109 acumularam os maiores teores de N fixado, sendo superiores aos demais tratamentos e principalmente ao tratamento inoculado com a

estirpe SEMIA 830 (Tabela 13), atualmente recomendada para essa espécie no Brasil. O isolado Lg109 apresentou índice de eficiência relativa na fixação de N de 600% em relação à estirpe SEMIA 830 (Figura 2).

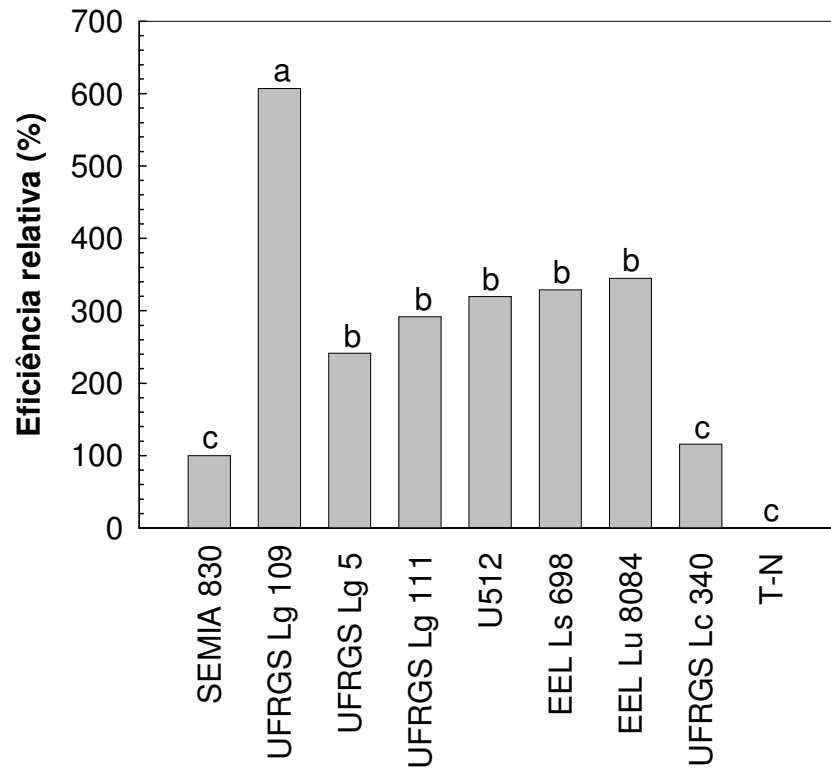


Figura 2. Índice de eficiência relativa de fixação biológica de nitrogênio (%) em comparação à estirpe SEMIA 830, das estirpes e isolados de rizóbios inoculados em plantas de *L. glaber*, em experimento conduzido em casa de vegetação.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a estirpe SEMIA 830 apresenta problemas de eficiência na fixação simbiótica de N em plantas de *L. glaber* (Tabela 13). Resultados semelhantes foram obtidos por Fontoura (2007), que observou baixa eficiência relativa na fixação simbiótica de nitrogênio dessa estirpe. Perdas de eficiência em estirpes de rizóbios já foram observadas anteriormente. Brose (1992b), em um estudo de seleção de rizóbio para *L. pedunculatus* (*syn. L. uliginosus*) em solo ácido, observou que duas estirpes de *Rhizobium* EEL40 (de mesma origem da estirpe USDA 3469) e a USDA 3470 (Beltsville *Rhizobium* Culture Collection, Estados Unidos) que apresentaram boa nodulação, no entanto, foram ineficientes na fixação biológica do nitrogênio.

Já as plantas inoculadas com o isolado UFRGS Lc340, obtido de *L. corniculatus*, apresentaram baixo acúmulo de nitrogênio fixado, em relação aos demais isolados deste estudo, não diferindo das plantas inoculadas com a estirpe SEMIA 830 e do tratamento controle não inoculado e sem adição de N (Tabela 13). Observa-se que esse isolado, embora tenha sido obtido de *L. corniculatus*, espécie do mesmo grupo de compatibilidade simbiótica de *L. glaber* proposto por Hernández et al. (2005), foi ineficiente na fixação simbiótica de nitrogênio, apesar de ter apresentado 100% na eficiência relativa na fixação de N em relação à estirpe SEMIA 830 (Figura 2).

#### **4.3.3 Avaliação da compatibilidade simbiótica dos isolados de rizóbios nativos inoculados em plantas de *L. subbiflorus* em casa de vegetação**

Os valores médios de número e massa seca de nódulos bem como a massa seca e a quantidade de N acumulado na parte aérea de plantas de *L. subbiflorus* são mostrados na Tabela 14. O tratamento inoculado com a estirpe SEMIA 850, recomendada para produção de inoculantes para *L. subbiflorus* no Brasil, foi utilizado para comparação com os resultados obtidos nos demais tratamentos.

Na Tabela 14, observa-se que as plantas inoculadas com o isolado UFRGS Lc340 e as estirpes EEL698, SEMIA 850 e U512, apresentaram os maiores números de nódulos formados. Embora o isolado UFRGS Lc340 e a estirpe U510 sejam rizóbios para *L. corniculatus*, o número de nódulos induzidos por estes não diferiu do produzido pelas plantas inoculadas com as estirpes SEMIA 850 e EEL 698 que são para *L. subbiflorus*. Apesar de não haver diferença estatística entre os resultados de número de nódulos nas plantas inoculadas com estes rizóbios, pode-se observar que o isolado UFRGS Lc340 induziu mais do que o dobro do número de nódulos radiculares da estirpe U510 em plantas de *L. subbiflorus* (Tabela 14).

Por outro lado, os isolados de rizóbio UFRGS Lg111 e Lg109, obtidos de plantas de *L. glaber*, e a estirpe EEL8084, para *L. uliginosus*, não foram capazes de estabelecer simbiose com plantas de *L. subbiflorus* em condições de casa de vegetação (Tabela 14). Observou-se a formação de

baixo número de nódulos nas raízes das plantas inoculadas com o isolado UFRGS Lg109 e a com estirpe EEL8084, e nódulos muito pequenos e ineficientes (primórdios nodulares) naquelas inoculadas com o isolado UFRGS Lg111. Fenômeno semelhante foi relatado por Baraibar et al. (1999), em um estudo com 50 isolados de rizóbios, provenientes de dez solos do Uruguai, onde a formação de nódulos pequenos e ineficientes foi observada quando esses isolados foram inoculados em plantas de *L. subbiflorus* e *L. uliginosus*. Esses resultados podem indicar a existência de incompatibilidade simbiótica entre alguns rizóbios como os isolados UFRGS LG109 e Lg111, para *L. glaber*, e estirpes como a EEL8084, para *L. uliginosus*, e plantas da espécie *L. subbiflorus*.

Tabela 14 Número e massa seca de nódulos, massa seca e quantidade de nitrogênio acumulado na parte aérea de plantas de *L. subbiflorus* inoculadas com isolados e estirpes de rizóbios em experimento conduzido em casa de vegetação

Tratamento	N° de nódulos planta <sup>-1</sup> *	Massa seca de nódulos	Massa seca da parte aérea	Quantidade de nitrogênio
			-----mg planta <sup>-1</sup> -----	
UFRGS Lc340	212 a	69,0 a	1462,2 a	53,6 a
SEMIA 850	149 a	72,7 a	1423,0 a	50,5 a
EEL698	141 a	61,7 a	615,5 b	18,8 b
U512	94 a	30,0 b	389,7 b	12,7 b
EEL8084	8 b	1,0 c	68,7 c	0,5 c
UFRGS Lg109	8 b	2,5 c	56,0 c	0,5 c
UFRGS Lg111	0	0	57,7 c	0,3 c
T-N	0	0	57,5 c	0,3 c
CV (%)	24,4	38,2	30,9	34,1

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5%. Médias de quatro repetições. \*Dados transformados por  $(x+1)^{1/2}$

A massa seca dos nódulos formados nas plantas de *L. subbiflorus* dos tratamentos inoculados com o isolado UFRGS Lc340, e com as estirpes EEL698 e SEMIA 850, recomendada para inoculante comercial para *L. subbiflorus* no Brasil, foi superior aos demais tratamentos (Tabela 14).

Já os isolados UFRGS Lg109, Lg111, para *L. glaber*, e a estirpe EEL8084, para *L. uliginosus*, não foram capazes de estabelecer simbiose

eficiente com plantas de *L. subbiflorus*, que não diferiram em relação à massa seca da parte aérea e teor de N fixado das plantas do tratamento controle sem inoculação e sem adição de N. Estes resultados demonstram a existência de incompatibilidade simbiótica destes rizóbios com plantas de *L. subbiflorus*. A incompatibilidade simbiótica de rizóbios de *L. glaber* em plantas de *L. subbiflorus* já foi observada por outros autores (Baraibar et al., 1999), sugerindo, desta forma, a existência de grupos de compatibilidade (Hernández et al., 2005), onde as espécies *L. glaber* e *L. subbiflorus* são pertencentes a grupos distintos. No entanto, observou-se que, no experimento realizado em tubos, o isolado Lg 29, obtido de *L. glaber*, induziu a formação de nódulos e a fixação de N em plantas de *L. subbiflorus* (Tabela 11), o que contradiz a existência de grupos de compatibilidade simbiótica, proposta por Hernández et al. (2005).

A produção de massa seca da parte aérea das plantas de *L. subbiflorus* inoculadas com as estirpes EEL698, para *L. subbiflorus* e U512 foram inferiores àquela produzida nas plantas inoculadas com a estirpe SEMIA 850 e com o isolado UFRGS Lc340, embora não tenham diferido quanto ao número de nódulos formados (Tabela 14).

Quanto à quantidade de nitrogênio fixado na parte aérea das plantas inoculadas com o isolado UFRGS Lc340 e com a estirpe SEMIA 850, observa-se que foram semelhantes entre si e superiores aos demais tratamentos (Tabela 14). Também se pode observar que os isolados UFRGS Lg109, Lg111 e a estirpe EEL 8084 não foram capazes de formar simbiose eficiente nas plantas de *L. subbiflorus* que não diferiram das plantas do tratamento controle sem inoculação e sem adição de nitrogênio.

O isolado UFRGS Lc340, obtido de *L. corniculatus*, apresentou um índice de eficiência relativa na fixação simbiótica do nitrogênio de 109%, em relação ao tratamento inoculado com a estirpe SEMIA 850 (Figura 3), mostrando compatibilidade simbiótica com plantas de *L. subbiflorus*. Já as estirpes EEL698 e U512 apresentaram um índice de eficiência relativa na fixação de nitrogênio abaixo de 40%, em relação ao tratamento inoculado com a estirpe SEMIA 850, sendo consideradas ineficientes.

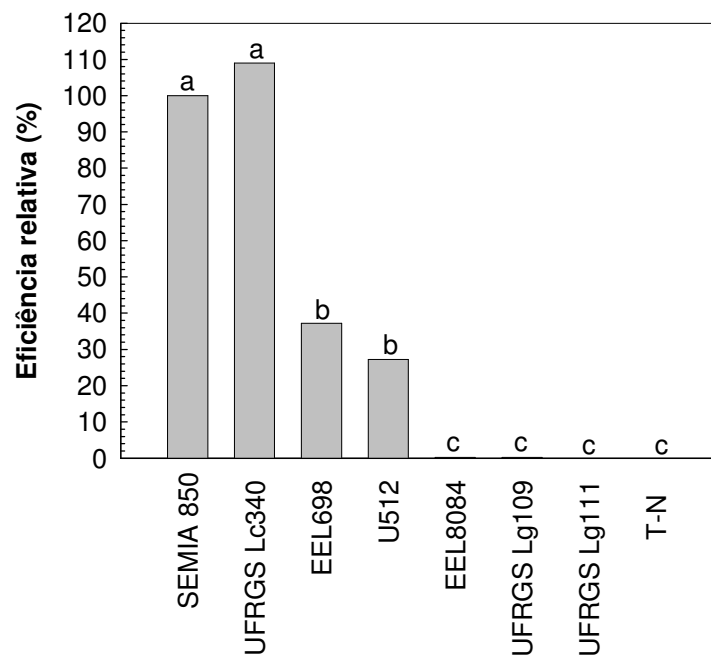


Figura 3. Índice de eficiência relativa da fixação biológica do nitrogênio (%) em comparação a estirpe SEMIA 850, dos isolados e estirpes de rizóbios inoculados em plantas de *L. subbiflorus*, em experimento conduzido em casa de vegetação.

Os demais tratamentos inoculados com os isolados UFRGS Lg109 e Lg111 e com a estirpe EEL8084 apresentaram índice de eficiência relativa na fixação de N inferior a 1% em relação à estirpe SEMIA 850, indicando que não ocorreu simbiose eficiente com as plantas de *L. subbiflorus* (Figura 3).

#### 4.3.4 Avaliação da compatibilidade simbiótica dos isolados de rizóbios nativos inoculados em plantas de *L. uliginosus* em casa de vegetação

Na Tabela 15, são mostrados os valores médios de número e massa seca de nódulos, bem como a massa seca e quantidade de N acumulado na parte aérea das plantas de *L. uliginosus*. O tratamento inoculado com a estirpe SEMIA 839, recomendada para produção de inoculantes para *L. uliginosus* no Brasil, foi utilizado para comparação com os resultados obtidos nos demais tratamentos. As plantas do tratamento inoculado com a estirpe EEL8084, para *L. uliginosus*, foram perdidas devido ao ataque de pragas no início do

experimento. Desta forma, não são apresentados resultados deste tratamento na Tabela 15.

Tabela 15. Número e massa seca de nódulos, massa seca e quantidade de nitrogênio acumulado na parte aérea de plantas de *Lotus uliginosus* inoculadas com isolados e estirpes de rizóbios em experimento conduzido em casa de vegetação

Tratamento	N° de nódulos planta <sup>-1</sup> *	Massa seca de nódulos	Massa seca da parte aérea	Quantidade de nitrogênio
SEMIA 839	235 a	118,7 a	1442,7 a	55,1 a
UFRGS Lc340	115 c	96,5 a	1213,0 a	40,2 b
EEL698	170 b	122,0 a	714,7 b	18,7 c
U512	128 c	105,0 a	516,5 c	17,4 c
UFRGS Lg111	29 d	32,7 b	408,7 c	10,8 c
UFRGS Lg5	9 e	9,5 b	73,7 d	1,4 d
UFRGS Lg109	0	0	55,0 d	0,3 d
EEL8084	-	-	-	-
T-N	0	0	46,0 d	0,2 d
CV (%)	14,3	25,9	29,5	27,2

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5%. Médias de quatro repetições. \* Dados transformados por  $(x+1)^{1/2}$

As plantas do tratamento inoculado com a estirpe SEMIA 839 apresentaram maior número de nódulos do que as dos demais tratamentos inoculados (Tabela 15), seguidas pelo número de nódulos das plantas dos tratamentos inoculados com a estirpe EEL698, para *L. subbiflorus*, e com o isolado UFRGS Lc340, obtido de *L. corniculatus*, e com a estirpe U512. Estes resultados indicam a existência de compatibilidade simbiótica da estirpe EEL698, de *L. subbiflorus*, e do isolado UFRGS Lc340, de *L. corniculatus*, com as plantas de *L. uliginosus*. Observações semelhantes foram relatadas por Frizzo (2007), que observou que o isolado UFRGS Ls54, obtido de plantas de *L. subbiflorus*, apresentou capacidade em formar nódulos e eficiência na fixação simbiótica de nitrogênio em plantas de *L. uliginosus* em experimento conduzido em casa de vegetação.

A massa seca dos nódulos formados nas plantas inoculadas com as estirpes SEMIA 839, EEL698, U512 e com o isolado UFRGS Lc340, foi



superior à formada nas plantas inoculadas dos demais tratamentos (Tabela 15).

Observa-se que o isolado UFRGS Lg109, obtido de plantas de *L. glaber*, não foi capaz de estabelecer simbiose eficiente com plantas de *L. uliginosus*, nas condições do experimento em casa de vegetação, pois não induziram a formação de nódulos (Tabela 15), verificando-se apenas a presença de primórdios nodulares.

A produção de matéria seca da parte aérea das plantas de *L. uliginosus* inoculadas com a estirpe SEMIA 839 e com o isolado UFRGS Lc340 foi semelhante nestes tratamentos e superior aos demais (Tabela 15). Observa-se também que a massa seca da parte aérea das plantas de *L. uliginosus* inoculadas com os isolados UFRGS Lg5, que induziu a formação de poucos nódulos, e com o isolado UFRGS Lg109, que não formou nódulos, ambos obtidos de *L. glaber* não diferiu da produzida pelas plantas do tratamento controle sem inoculação e sem adição de N.

A quantidade de nitrogênio acumulada na parte aérea das plantas de *L. uliginosus* (Tabela 15) inoculadas com a estirpe SEMIA 839 foi superior ao obtido nos demais tratamentos inoculados, seguido pela quantidade de nitrogênio acumulada nas plantas inoculadas com o isolado UFRGS Lc340, obtido de *L. corniculatus*.

Na avaliação do índice de eficiência relativa na fixação simbiótica de N, em comparação ao tratamento inoculado com a estirpe SEMIA 839 (Figura 4), observa-se que este comportamento se repete, sendo o isolado UFRGS Lc340 mais eficiente que os demais, porém sem se equiparar ao índice de eficiência obtido pela estirpe SEMIA 839, nas condições de realização do experimento.

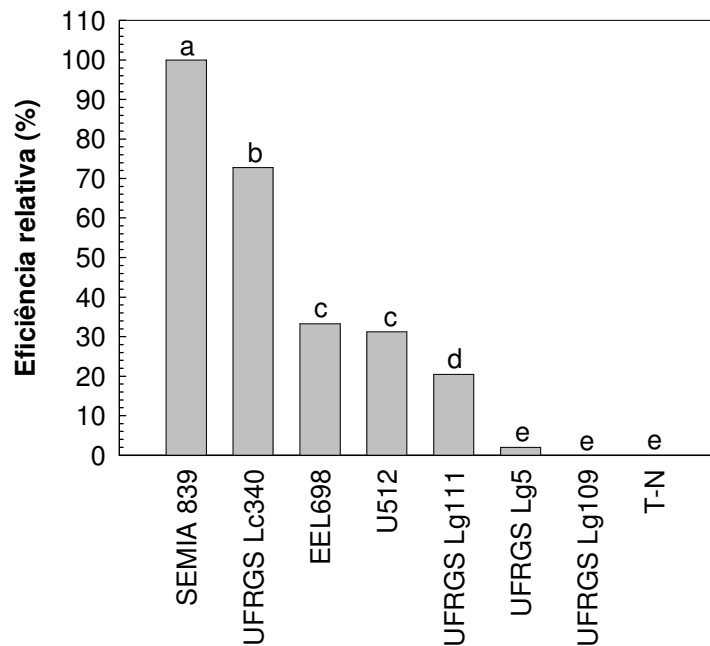


Figura 4. Eficiência relativa da fixação simbiótica de nitrogênio (%) em comparação a estirpe SEMIA 839 dos rizóbios de *Lotus* isolados dos solos do RS inoculados em plantas de *L. uliginosus*, em experimento conduzido em casa de vegetação

Já as estirpes EEL698, para *L. subbiflorus*, e U512, juntamente com o isolado UFRGS Lg111, obtido de *L. glaber*, formaram um grupo intermediário com índice de eficiência relativa na fixação de N inferior a 40% (Figura 4), indicando que, embora capazes de formar simbiose efetiva, esta foi ineficiente. Observa-se ainda, que os isolados UFRGS Lg5 e Lg109, obtidos de *L. glaber*, mostraram índice de eficiência relativa na fixação de N próximo à zero, indicando a existência de incompatibilidade desses rizóbios com as plantas de *L. uliginosus*. (Figura 4). A incompatibilidade simbiótica entre um rizóbio de *L. glaber* e plantas de *L. uliginosus* também foi observada por Estrella et al. (1997), que concluíram que o isolado de *L. glaber* 1-INTECH (Instituto Tecnológico de Chascomús-Argentina) não foi capaz de formar nódulos eficientes, produzindo apenas pseudonódulos, o que indica parasitismo.

#### **4.3.5 Comparação da compatibilidade simbiótica dos isolados de rizóbios nativos com plantas das espécies de *L. corniculatus*, *L. glaber*, *L. subbiflorus* e *L. uliginosus* em casa de vegetação.**

Na Tabela 16, para fins de comparação e identificação de grupos de compatibilidade simbiótica, são apresentados os valores referentes ao número de nódulos formados e ao teor de nitrogênio total acumulado na parte aérea de plantas de *L. corniculatus*, *L. glaber*, *L. subbiflorus* e *L. uliginosus* inoculadas com isolados e estirpes de rizóbios em experimento conduzido em casa de vegetação. Deve-se salientar que nem todas as estirpes estudadas foram inoculadas em todas as espécies de *Lotus* utilizadas no experimento.

Avaliando-se os resultados produzidos pelas estirpes que foram inoculadas nas plantas das quatro espécies estudadas, estirpe EEL698 e U512 (Tabela 16), observa-se que estas foram capazes de induzir a formação de grande quantidade de nódulos e de fixar nitrogênio em simbiose com todas as espécies de *Lotus* estudadas. Observa-se também que a estirpe EEL 698 é de *L. subbiflorus*, mas formou simbiose efetiva tanto em plantas desta espécie como em *L. corniculatus*, *L. glaber* e *L. uliginosus*, embora tenha sido mais eficiente em *L. corniculatus*. Da mesma forma, a estirpe U512 foi eficiente na fixação de nitrogênio tanto em plantas de *L. corniculatus* como de *L. glaber*, mas foi pouco eficiente em plantas de *L. subbiflorus* e *L. uliginosus* (Tabela 16).

Em relação aos resultados produzidos pela estirpe EEL8084, obtida de *L. uliginosus*, observa-se que esta estirpe foi capaz de formar nódulos e fixar nitrogênio em simbiose com plantas de *L. corniculatus* e *L. glaber*. Já com plantas de *L. subbiflorus* esta estirpe não foi capaz de formar simbiose efetiva, produzindo apenas 8 nódulos e não fixando nitrogênio (Tabela 16).

Avaliando-se os resultados produzidos pelos isolados de rizóbios nativos que foram inoculados nas plantas das quatro espécies estudadas, isolados UFRGS Lg5, Lg109, Lg111 e Lc340 (Tabela 16), observa-se que estas apresentaram comportamento simbiótico diferente.

O isolado UFRGS Lc340, obtido de *L. corniculatus*, demonstrou capacidade de induzir nodulação e fixar nitrogênio em simbiose com plantas das quatro espécies estudadas. No entanto, observou-se também que este isolado formou simbiose eficiente na fixação de nitrogênio em plantas de *L.*

*subbiflorus*, sendo superior que as demais espécies (Tabela 14, 16 e Figura 3), pouco eficiente em plantas de *L. corniculatus* (Tabela 12, 16 e Figura 1) e ineficiente em plantas de *L. glaber* (Tabela 13 e 16).

Tabela 16. Número de nódulos e quantidade de nitrogênio total (mg planta<sup>-1</sup>) obtido nas plantas das espécies de *L. corniculatus*, *L. glaber*, *L. subbiflorus* e *L. uliginosus* inoculadas com isolados e estirpes de rizóbios em experimento conduzido em casa de vegetação

Rizóbio	Espécies de <i>Lotus</i>							
	<i>L. corniculatus</i>		<i>L. glaber</i>		<i>L. subbiflorus</i>		<i>L. uliginosus</i>	
	Nº. Nod	N tot. (mg)	Nº. Nod	N tot. (mg)	Nº. Nod	N tot. (mg)	Nº. Nod	N tot. (mg)
<b>SEMIA 830</b>	NA	NA	87 c	8,2 c	NA	NA	NA	NA
<b>SEMIA 839</b>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	235 a	55,1 a
<b>SEMIA 850</b>	NA	NA	NA	NA	149 a	50,5 a	NA	NA
<b>EEL698</b>	169 aA	46,6aA	138 bA	23,6bB	141 aA	18,8bB	170 bA	18,7cB
<b>EEL8084</b>	261 aA	31,4bA	118 bB	27,4bA	8 bC	0,5 cB	-	-
<b>U510</b>	179 a	40,7 a	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<b>U512</b>	133 aA	39,8aA	77 cA	23,6bB	94 aA	12,7bB	128 cA	17,4 cB
<b>Lg5</b>	195 aA	26,7bA	181 aA	17,6bB	-	-	9 eB	1,4 dC
<b>Lg109</b>	172 aA	34,9aB	233 aA	44,3aA	8 bB	0,5 cC	0	0,3 dC
<b>Lg111</b>	168 aA	38,1aA	79 cB	21,3bB	0	0,3 cC	29 dC	10,8cC
<b>Lc340</b>	229 aA	25,7bC	46 cC	9,1 cD	212 aA	53,6aA	115 cB	40,2bB
<b>T-N</b>	0	0,2 c	0	0,4 c	0	0,3 c	0	0,2 d
<b>CV (%)</b>	23	17,2	18,61	40,7	24,4	34,1	14,3	27,2

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5%. Médias de quatro repetições. \*Dados transformados por  $(x+1)^{1/2}$

Legenda: NA = não avaliado; - = tratamento perdido; T-N = Tratamento controle negativo, sem inoculação e sem adição de N

Os resultados obtidos com as estirpes EEL 698, EEL 8084 e U512 e com o isolado UFRGS Lc340 contradizem a idéia proposta por Hernández et al. (2005) da existência de grupos de compatibilidade simbiótica definidos, sendo um grupo formado entre plantas de *L. corniculatus* e *L. glaber* e seus rizóbios simbiotes e outro formado entre plantas de *L. subbiflorus* e *L. uliginosus* e

seus rizóbios simbiotes. Sendo assim, as bactérias que produziram nódulos nas espécies de *L. corniculatus* e *L. glaber* não seriam capazes de induzir a nodulação em *L. uliginosus* e *L. subbiflorus*, e vice-versa, formando grupos de incompatibilidade simbiótica ou, segundo os autores, podem induzir a nodulação em plantas do outro grupo, sendo simbioticamente ineficiente, ou então estabelecer uma relação de parasitismo.

Estes resultados deste trabalho indicam que não existem os grupos de compatibilidade simbiótica e que os rizóbios eficientes nas espécies de *L. corniculatus*, *L. glaber*, *L. subbiflorus* e *L. uliginosus* apresentaram potencial para serem usados em inoculantes funcionais para as demais espécies de *Lotus* que foram utilizadas neste estudo.

No entanto, os resultados produzidos pelos isolados de rizóbios nativos UFRGS Lg5, Lg109 e Lg111, obtidos de *L. glaber*, mostram que os mesmos foram ineficientes na simbiose com plantas de *L. subbiflorus* e *L. uliginosus* sendo eficientes apenas em plantas de *L. corniculatus* e *L. glaber* (Tabela 16).

Também os resultados da avaliação da compatibilidade simbiótica dos isolados de rizóbios nativos obtidos de *L. corniculatus* (Tabela 8) e de *L. glaber* (Tabela 9) mostram que muitos não induziram a formação de nódulos ou não fixaram nitrogênio em simbiose com plantas de *L. uliginosus*. De forma semelhante, a avaliação dos rizóbios nativos obtidos de *L. uliginosus* (Tabela 10) mostra incompatibilidade simbiótica de muitos isolados com plantas de *L. corniculatus* e *L. glaber*.

Também a observação de que muitos dos rizóbios estudados induziram a formação de nódulos radiculares sem fixação simbiótica de nitrogênio (Tabelas 7, 8, 9, 10 e 16) mostra que estes podem ser potencialmente parasitas, concordando com as observações de Baraibar et al. (1999), que salientam que os rizóbios eficientes em um grupo de especificidade comportam-se como parasitas em outro.

Estes resultados indicam a existência de população de rizóbios nativos que podem ser potenciais parasitas em plantas de espécies de *Lotus* de grupos de compatibilidade simbiótica diferentes.

#### **4.4 Caracterização genotípica dos rizóbios isolados obtidos de plantas de *Lotus***

A caracterização genotípica dos isolados e estirpes de rizóbios, que foram estudados quanto à compatibilidade hospedeira e eficiência simbiótica, em condições de casa de vegetação, mostrou grandes diferenças entre estes quanto ao perfil eletroforético de fragmentos de DNA oriundos da amplificação do DNA genômico pela PCR com os oligonucleotídeos iniciadores BOXA1 e ERIC (ERIC1-R e ERIC-2).

Na Figura 5 é apresentado o perfil eletroforético dos produtos de amplificação com os oligonucleotídeos iniciadores ERIC1-R e ERIC-2 das estirpes padrão SEMIA 816, SEMIA 830, SEMIA 839, SEMIA 850, U510, U512, dos isolados de rizóbios UFRGS Lc340, Lg5, Lg109, Lg111, e das estirpes EEL698 e EEL8084, avaliados quanto a eficiência da fixação simbiótica de N em plantas de *L. corniculatus*, *L. glaber*, *L. subbiflorus* e *L. uliginosus*. Na Figura 6 é apresentado o perfil eletroforético dos produtos da amplificação do DNA genômico dos mesmos rizóbios com o oligonucleotídeo iniciador BOX A 1-R

A amplificação do DNA genômico com oligonucleotídeos iniciadores ERIC1-R e ERIC-2, permitiu a obtenção de perfis eletroforéticos em gel de agarose das estirpes e isolados utilizados (Figura 5). O tamanho dos fragmentos de DNA analisados no perfil eletroforético dos produtos de amplificação do oligonucleotídeo ERIC variou de 3530 pares de bases (pb) até 564 pb (Figura 5), dependendo do isolado avaliado, diferindo dos dados encontrados por Fontoura (2007), em que os tamanhos dos fragmentos variaram de 4.268 pb a 564 pb e por Giongo (2007), em que a faixa observada variava de 5.000 pb a 650 pb.

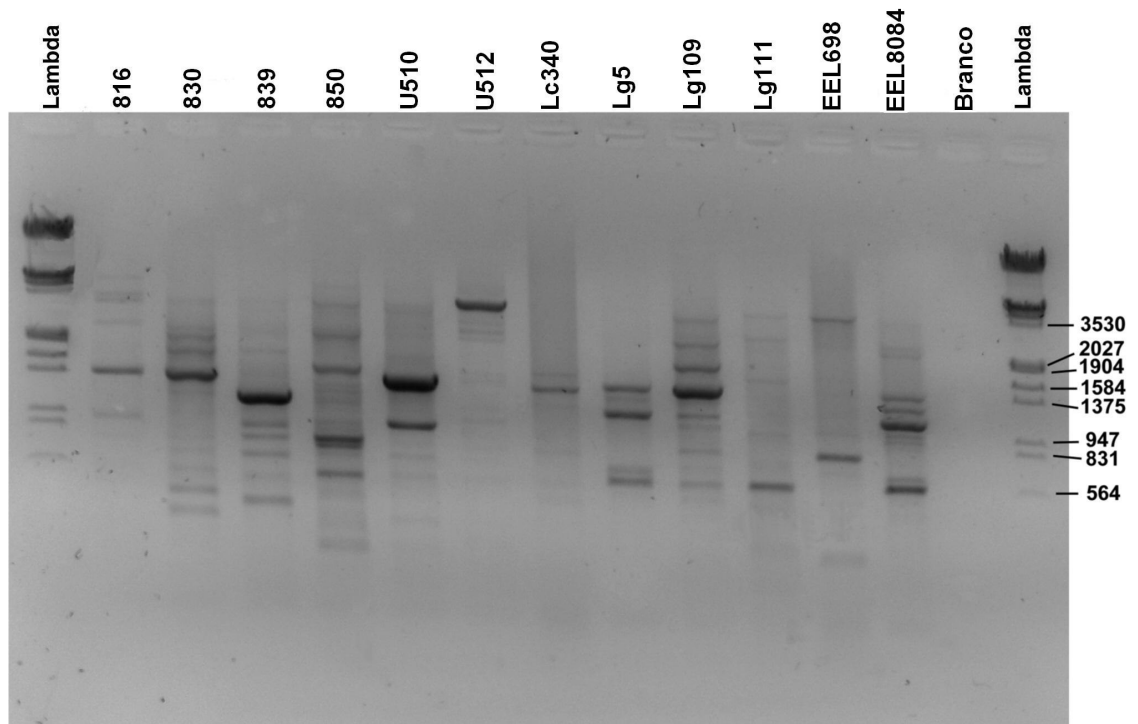


Figura 5. Perfil de bandas obtidas com amplificação do DNA genômico com os oligonucleotídeos iniciadores ERIC1-R e ERIC-2. Lambda= marcador de peso molecular Lambda Eco RI + Hind III. A foto é apresentada em negativo para melhor visualização das bandas

Com a amplificação do DNA genômico com o oligonucleotídeo iniciador BOX A1, submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, foi possível a obtenção do perfil de bandas característico para as estirpes e isolados de rizóbios utilizados (Figura 6). O tamanho dos fragmentos de DNA analisados no perfil eletroforético dos produtos de amplificação do oligonucleotídeo BOX A1 variou de 3.530 pares de bases (pb) até 564 pb (Figura 6).

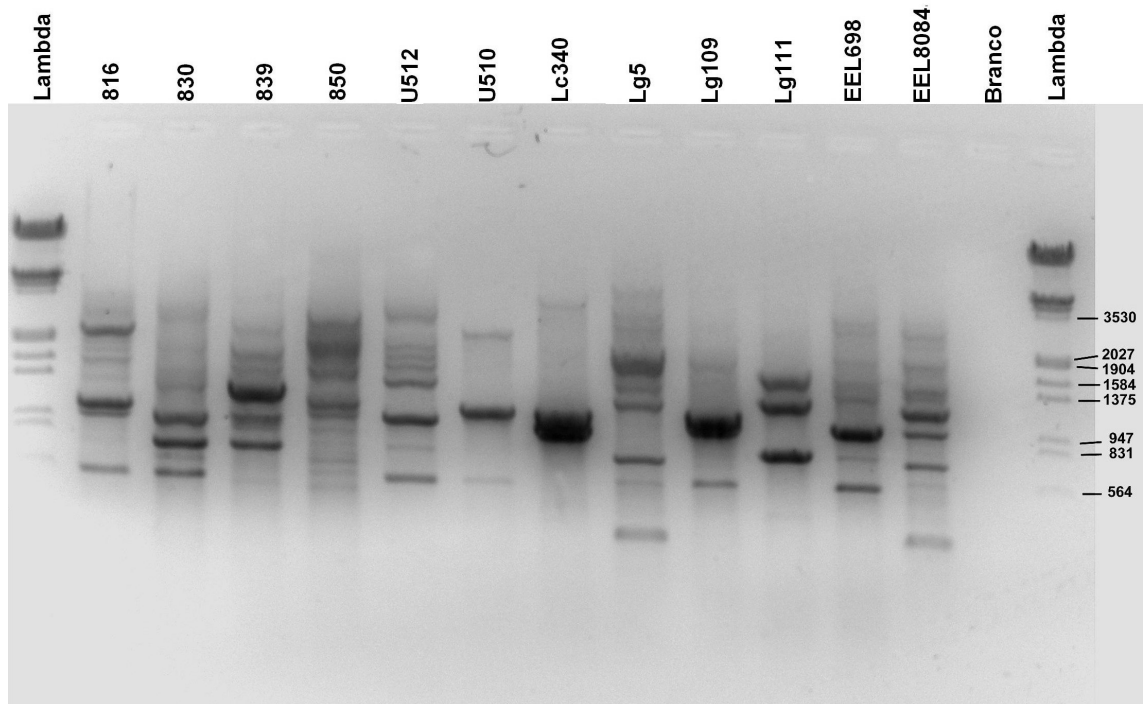


Figura 6. Perfil de bandas obtidas com amplificação do DNA genômico com o oligonucleotídeo iniciador BOX A1. Lambda= marcador de peso molecular Lambda Eco RI + Hind III. A foto é apresentada em negativo para melhor visualização das bandas

Os perfis eletroforéticos obtidos com a amplificação do DNA genômico com o oligonucleotídeo iniciador ERIC (Figura 5) e BOX A1 (Figura 6) foram analisados em conjunto com objetivo de se obter uma análise de agrupamento mais detalhada. Recentemente, essa metodologia vem sendo utilizada por muitos autores (Hungria & Vargas, 2000; Sikora et al., 2002; Frizzo, 2007; Fontoura, 2007; Giongo et al., 2008), com o intuito de elevar ao máximo as diferenças genotípicas detectadas, de modo a fornecer resultados mais coerentes (Rademaker et al., 2000). O dendrograma formado pelo agrupamento dos perfis de bandas dos isolados e estirpes de rizóbios, analisadas com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Jaccard, que considera a presença ou ausência de bandas, é mostrado na Figura 7.

No dendrograma, observa-se a formação de dois grandes grupos que apresentaram similaridade em torno de 15% entre si. No grupo I foram agrupadas as estirpes SEMIA816, SEMIA 830, EEL698, EEL8084 e U512, além do isolado UFRGS Lg5, proveniente de amostras de Porto Alegre.



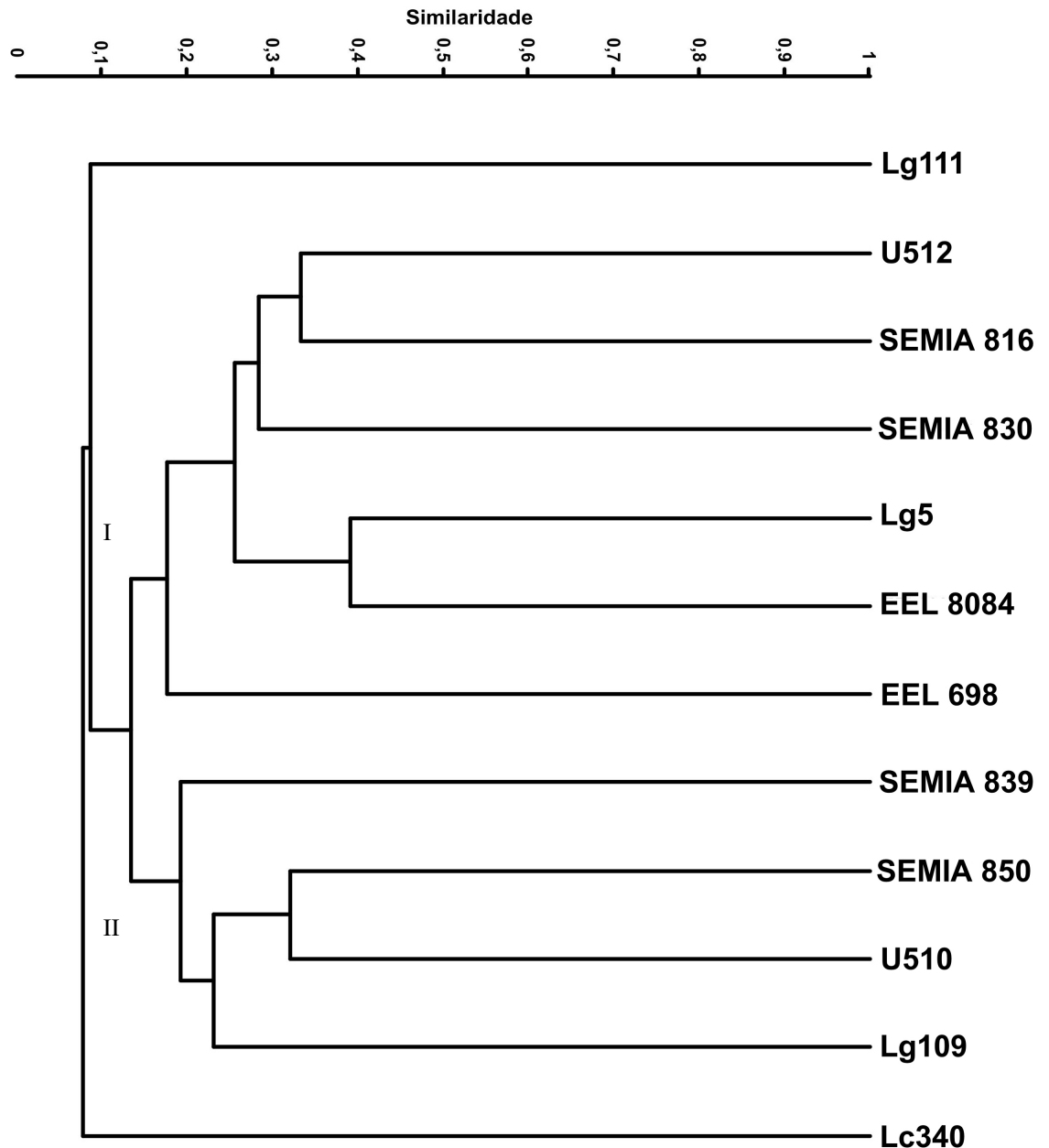


Figura 7. Dendrograma de genotipagem de estirpes e isolados de rizóbios para *L. corniculatus*, *L. glaber*, *L. subbiflorus* e *L. uliginosus*. Agrupamento obtido por UPGMA, utilizando-se o coeficiente de Jaccard, para perfil de bandas obtido a partir da PCR com os oligonucleotídeos iniciadores BOX A1-R + ERIC1-R e ERIC -2

No grupo II foram agrupadas as estirpes SEMIA 839, SEMIA 850 e U510 e o isolado UFRGS Lg109, também proveniente de amostras de Porto Alegre.

Na Figura 7, observa-se que os isolados UFRGS Lg111, obtido de plantas de *L. glaber* em amostra de solo de Porto Alegre, de uma área

experimental com histórico de inoculação com diferentes estirpes, e o isolado UFRGS Lc340, de *L. corniculatus* em amostra de solo de Hulha Negra destacam-se por apresentar menos de 10% de similaridade com os demais rizóbios estudados. Do mesmo modo, pode-se observar que os isolados estudados não mostraram grande similaridade com as estirpes SEMIA 816, SEMIA 830, SEMIA 839, SEMIA 850 e também com as estirpes EEL698, EEL8084, U510 e U512 (Figura 7) não sendo, portanto, re-isolamento de nenhuma destas. Frizzo (2007), em um estudo de caracterização genotípica dos isolados e estirpes para *L. uliginosus*, em análise conjunta dos produtos de PCR dos oligonucleotídeos iniciadores ERIC e BOX, também observou que nenhum dos isolados apresentou 100% de similaridade entre si. Esse autor relata ainda que isolados também não mostraram grande similaridade com as estirpes recomendadas comercialmente para *L. uliginosus*, indicando a existência de um novo banco de rizóbios para a seleção de estirpes mais eficientes para esta espécie.

## 5. CONCLUSÕES

- a) Existem rizóbios potencialmente parasitas tanto para plantas da espécie *L. corniculatus*, *L. glaber*, *L. subbiflorus* como para *L. uliginosus* nas amostras de solos das localidades estudadas no Estado.
  
- b) Existem rizóbios nativos eficientes em plantas das quatro espécies de *Lotus* em estudo, como o isolado UFRGS Lc340, e a estirpe EEL698, com potencial para serem usados em inoculantes funcionais para espécies de *Lotus*, nas amostras de solos das localidades estudadas no Estado.
  
- c) Existem rizóbios com especificidade hospedeira em uma ou mais espécies de *Lotus*, e outros rizóbios com incompatibilidade simbiótica, contrariando a hipótese dos grupos de compatibilidade simbiótica.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A.; BALOTA, E. L.; HUNGRIA, M. Rizóbio e inoculação. In: **Feijão: tecnologia de produção**. Londrina, Ilust. IAPAR. Informe de Pesquisa, n.135, 115p, 2000.

AGIUS, F.; SANGUINETTI, C. e MONZA, J. Strain-specific fingerprints of *Rhizobium loti* generated by PCR with arbitrary and repetitive sequences. **FEMS – Microbiology Ecology**, Haren, v.24, p.87-92, 1997.

AYALA, W.; BERMÚDEZ, R. e FERRÉS, S. *Lotus* Maku: em los 90 uma promessa...hoy uma firme realidad. **Revista del Plan Agropecuario**, INIA-Treinta y Trés, Uruguai, p.46-50, 2003. Online. Disponible na Internet: <http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/tt/ara/2003/107pa.pdf>.

BAIS, H.P.; PARK, S.; WEIR, T. L.; CALLAWAY, R.M. E VIVANCO, J.M. How plants communicate using the underground information superhighway. **Trends in Plant Science**. vol.9, n.1, p.26-32, 2004.

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, 1999.

BARRIENTOS, L.; HIGUERA, M.; ACUÑA, H.; GUERRERO, J.; ORTEGA, F.; SEGUÉL, I. Efectividad simbiótica de cepas naturalizadas de *Mesorhizobium loti* y *Bradyrhizobium sp.* (*Lotus*) en plantas de tres especies del género *Lotus*. **Agricultura técnica**. Temuco, v.62, n.2, p.226-236, 2002.

BEUSELINCK P. R. **TREFOIL: The Science and Technology of Lotus**, CSSA Special Publication, n. 28, Madison, 1999.

BLUMENTHAL, M.J. e MCGRAW, R.L. Lotus adaptation, use and management. BEUSELINCK, P.R. (ed.) **Trefoil: The Science and Technology of Lotus**, CSSA Special Publication, n. 28, Madison, 1999.

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

BROSE, E. Seleção de rizóbio para *Lotus pedunculatus* em solo ácido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.27, n.3, p.409-415, 1992b.

BROCKWELL, J.; HELY, F.W.; NEAL-SMITH, C.A. Some symbiotic characteristics of rhizobia responsible for spontaneous, effective field nodulation of *Lotus hispidus*. **Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry**. Tamworth, v.6, n.23, p.365-370, 1966.

CARVALHO, F.G. **Caracterização fenotípica e genotípica de variantes espontâneos isolados de estirpes de *Bradyrhizobium* sp recomendadas para soja (*Glycine max*)**. 2003. 104f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo), Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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. 32p. (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.

de BRUJIN, 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, n.3, p. 2180-2187, 1992.

ESTRELLA, M.J.; PIECKENSTAIN, F.L.; UGALDE, R.A.; e IGLESIAS, A.A. Studies on the symbiotic potencial of a *Rhizobium loti* strain native from Chascomús on *Lotus pedunculatus* and *Lotus corniculatus* var. *hirsutus* plants. **Lotus Newsletter**. v.28. Online. Disponível na internet: <http://www.plantsci.missouri.edu/lnl>, 1997.

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

FONTOURA, R. A. **Isolamento e seleção de rizóbios nativos, de solos do Sul do Brasil, eficientes em *Lotus subbiflorus* Lag. (syn. *Lotus hispidus* Desf.) e *Lotus glaber* Mill.(=*Lotus tenuis* Waldst. et Kit. ex Wild.)**. 2007. 82f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

FRIZZO, M.L.S. **Seleção e caracterização de rizóbios nativos, de solos do Rio Grande do Sul, para *Lotus corniculatus* L. e *Lotus uliginosus* Schkuhr**. 2007. 68f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

FULCHIERI, M.M., ESTRELLA, M.J. e IGLESIAS, A.A. Characterization of *Rhizobium loti* strains from the Salado River Basin. **Antonie van Leeuwenhoek**. Dordrecht, v.79, n.2, p.119-125, 2001.

GAGE, D. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.68, n.2, p.280-300, 2004.

GAULT, R.R., PILKA, A., HEBB, D.M. e BROCKWELL, J. Nodulation studies on legumes exotic to Australia: symbiotic relationships between *Chamaecytisus palmensis* (tagasaste) and *Lotus* spp. **Australian Journal of Experimental Agriculture**. Australia, v.34, n.3, p.385-394, 1994.

GIONGO, A. **Diversidade de *Bradyrhizobium elkanii* e *B. japonicum* que nodulam soja em solos do Rio Grande do Sul**. 2007. 168f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

GIONGO, A.; AMBROSINI, A.; VARGAS, L.K.; FREIRE, J.R.J.; BODANESE-ZANETTINI, M.H. e PASSAGLIA, L.M.P. Evaluation of genetic diversity of bradyrhizobia strains nodulating soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] isolated from South Brazilian fields. **Applied Soil Ecology**. v.38, p.261-269, 2008.

GIONGO, A.; PASSAGLIA, L.M.P.; FREIRE, J.R.J. e SÁ, E.L.S. Genetic diversity and symbiotic efficiency of population of rhizobia of *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. **Biology and Fertility in Soils**. v.43, p.593-598, 2007.

GRANGE, L.; Diversidade de rizóbio capaz de nodular o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) isolado de solos da região nordeste e da região sul do Brasil. 2001. 99f. Dissertação (mestrado em Genética e Melhoramento) - Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

GRANGE, L.; HUNGRIA, M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.36, n.9, p.1389-1398, 2004.

HAMMER, Ø. et al. PAST – Palaeontological Statistics, ver. 1.69. 2007. Capturado em 10 de março de 2008. Online. Disponível na internet: <http://folk.uio.no/ohammer/past>.

HARTWIG, U.A. The regulation of symbiotic N<sub>2</sub> fixation: a conceptual model of N feedback from the ecosystem to the gene expression level. **Perspectives in Plants Ecology, Evolution and Systematics**. v.1, n.1, p.92-120, 1998.

HERNÁNDEZ, S., REBUFFO, M., ARRIVILLAGA, S., JAURENA, M., LABANDERA, L., RISSO, D. e CILIUTI, J. Evaluation of the genotype-environment interaction in the establishment of *Lotus uliginosus* (Schkuhr) with soil-cores. **Lotus Newsletter**. Columbia, v.35, n.1, p.120-130, 2005.

HIRSCH, A.M.; BAUER, W.D.; BIRD, D.M.; CULLIMORE, J.; TYLER, B. e YODER, J.I. Molecular signals and receptors: controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. **Ecology**, v.84, n.4, p.858-868, 2003.

HOTTER, G.S. e SCOTT, B. Exopolysaccharide mutants of *Rhizobium loti* are fully effective on a determinate nodulating host but are ineffective on an indeterminate nodulating host. **Journal of Bacteriology**. Washington, v.173, n.2, p.851-859, 1991.

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. e VARGAS, M.A.T. Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. **Field Crops Research**. v.65, p.151-164, 2000.

IRISARRI, P., MILNITSKY, F., MONZA, J. e BEDMAR, J. Characterization of rhizobia nodulating *Lotus subbiflorus* from Uruguayan soils. **Plant and Soil**. Netherlands, v.180, n.1, p.39-47, 1996.

JACOB Jr, E.A., MENEGUELO, G.E., MELO, P.T.B.S. e MAIA, M.S. Tratamentos para superação de dormência em sementes de cornichão anual. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, vol. 26, n° 2, p.15-19, 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. ciceri*, *R. mediterraneum* e *R. tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. Nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.47, n.3, p.895-898, 1997.

JUDD, A.K.; SCHNEIDER, M.; SADOWSKY, M.J.; DE BRUJIN, F.J. Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.1702-1708, 1993.

JUSTIN, S.H.F.W., ARMSTRONG, W. The anatomical characteristics of roots and plant response to soil flooding. **New Phytologist**. Lancaster, v.106, n.3, p.465-495, 1987.

KIRKBRIDE Jr, J.H. The scientific name of narrow-leaf trefoil. **Crop Science**. New York, V.46, p.2169-2170, 2006.

LAGUERRE, G.; ALLARD, M.R.; REVOY, F. e AMARGER, N. Rapad identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.56-63, 1994.

LAGUERRE, G.; van BERKUN, P.; AMARGER, N.; PREVOST, D. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera

*Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, p. 4748-4758, 1997.

LANGER, R.H.M. **Pastures Plants**. In: R.H.M. Langer (Ed.) Pastures: Their ecology and management. Oxford University Press, Auckland, Australia, 1990.

LIEVEN-ANTONIOU, C.A. e WHITTAM, T.S. Specificity in the symbiotic association of *Lotus corniculatus* and *Rhizobium loti* from natural populations. **Molecular Ecology**, v.6, p.629-639, 1997.

LIMPENS, E. e BISSELING, T. Signaling in symbiosis. **Current Opinion in Plant Biology**, v.6, n.4, p.343-350, 2003.

LÓPEZ, J.; PRESTES, P.J.Q.; MAGALHÃES, E.A. A curva de crescimento e a composição em carboidratos solúveis, estruturais, lignina e proteína e a digestibilidade em cornichão. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE PASTAGENS, 9, 1965, São Paulo. Anais... São Paulo: Alarico. p. 851-887, 1966.

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.

MAROSO, R.P. & SCHEFFER-BASSO, S.M. Desenvolvimento morfológico de *Lotus* spp. de diferentes hábitos de crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa, v.36, n.6, p.1961-1968, 2007.

MATHIS, R., GIJSEGEM, F.V., RYCKE, R., D'HAENZE, W., MAELSAEKE, E.V., ANTHONIO, E., MONTAGU, M.V., HOLSTERS, M. and VEREECKE, D. Lipopolysaccharides as a communication signal for progression of legume endosymbiosis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.102, n.7, p.2655-2660, 2004.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. In: MOREIRA, F.M.S. e SIQUEIRA, J.O. Fixação biológica de nitrogênio atmosférico. 2 ed. Lavras. Editora UFLA, p.449-541, 2005.

MOSTASSO, L.; MOSTASSO, F.L.; DIAS, B.G.; VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.73, p.121-132, 2002.

MUJICA, M.M. e RUMI, C.P. Effects of salinity on the germination of *Lotus glaber* Mill.(= *Lotus tenuis* Waldst. et Kit. ex Wild.). **Lotus Newsletter**, Missouri, vol.30, n.1, 1999.

PAIM, N.R. Research on *Lotus* spp. In: Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Lotus Newsletter**, Columbia, v. 19, p. 37-43, 1988.

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



PERES, J.R.R.; MENDES, I.C.; SUHET, A.R.; VARGAS, M.A.T. Eficiência e competitividade de estirpes de rizóbio para soja em solos de cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.17, p.357-363, 1993.

RADEMAKER, L.W., HOSTE, B., LOUWS, F.J., KERSTERS, K., SWINGS, J., VAUTERIN, L., VAUTERIN, P., de BRUIJIN, F.J. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** Vol.50, p.665-677, 2000.

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 em Ciência – Energia Nuclear na Agricultura) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor: Cold 5 Spring Harbor Laboratory Press, 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.

SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas. **Summa Phitopathologica**, Piracicaba, v.1, n.3, p.231-234, 1975.

SCHEFFER-BASSO et al., Nodulação e Fixação biológica de nitrogênio de *Adesmia latifolia* e *Lotus corniculatus* em vasos de Leonard. **Revista Brasileira de Zootecnia**, vol. 30(3), p. 687-693, 2001

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.

SIKORA, S.; DEDZEPOVIC, S.; BRADIC, M. Genomic fingerprinting of *Bradyrhizobium japonicum* isolates by RAPD and rep-PCR. **Microbiology Research**. v.57, p.213-219, 2002.

SISVAR. Versão 4.6 (Build 61), copyright Ferreira, D.F. 2003. Online. Disponível na internet: <http://www.dex.ufla.br>.

SOSTER, M.T.B.et al. Caracterização morfofisiológica de genótipos de cornichão (*Lotus corniculatus* L.) **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.33, n.6, p. 1654-1661, 2004. (a)

SOSTER, M.T.B.; SCHEFFER-BASSO, S.M.; DALL'AGNOL, M.; BRUSTOLIN, R.; FONTANELI, R.S. Caracterização agrônômica de genótipos de cornichão (*Lotus corniculatus* L.) **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n.6, p. 1662-1671, 2004. (b)

STRALIOTO, R. Aplicação e evolução dos métodos moleculares no estudo da biodiversidade do rizóbio. In: AQUINO, A.M. e ASSIS, R.L. **Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para uma agricultura sustentável**. EMBRAPA Agrobiologia. Brasília, DF. 1 ed. p.281-322, 2005.

STROSCHEIN, M.R.D. **Caracterização de bactéria fixadora de nitrogênio em *Lupinus albus***. 2007. 83f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.

SULLIVAN, T. Interactions between soil microbial communities and plant roots: a minireview. **Soil and Crop Sciences**, Colorado State University, 2004.

TEDESCO, M.J. et al. **Análise de solo, planta e outros materiais**. 2° ed., Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS. 174 p. 1995.

VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUJIN, 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.

VINCENT, J.M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. I.B.P. Handbook. Blackwell Scientific, Oxford, n.15, 164p., 1970.

VINUESA, P.; RADEMAKER, J. L. W.; DE BRUIJIN, 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.

VIGNIOLO, O.R; FERNÁNDEZ, O.N.; e 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.

## **7 APÊNDICES**

## APÊNDICE 1. Solução Nutritiva (Sarruge, 1975)

<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 substituído por 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 manganês.

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 2. 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 3. Rizóbios isolados de plantas de *L. uliginosus* e *L. corniculatus* autenticados por Frizzo (2007) quanto a nodulação e fixação simbiótica de nitrogênio em experimento em tubos mantidos sob condições de lampadário

<i>L. uliginosus</i>				<i>L. corniculatus</i>			
Rizóbios	Nod <sup>+</sup>	Fix <sup>+</sup>	Local	Rizóbios	Nod <sup>+</sup>	Fix <sup>+</sup>	Local
Lu 2	+	-	MO	Lc 8	+	+	HN
Lu 4	+	+	MO	Lc 11	+	+	HN
Lu 5	+	+	MO	Lc 13	+	+	ES
Lu 7	+	-	MO	Lc 14	+	+	ES
Lu 8	+	+	MO	Lc 15	+	+	ES
Lu 9	+	+	MO	Lc 18	+	+	ES
Lu 10	+	-	MO	Lc 21	+	+	ES
Lu 11	+	+	MO	Lc 22	+	+	ES
Lu 12	+	-	MO	Lc 24	+	+	ES
Lu 13	+	+	MO	Lc 25	+	+	ES
Lu 15	+	+	MO	Lc 26	+	+	ES
Lu 16	+	+	MO	Lc 27	+	+	ES
Lu 17	+	-	MO	Lc 30	+	+	ES
Lu 18	+	+	MO	Lc 32	+	+	ES
Lu 19	+	+	MO	Lc 33	+	+	ES
Lu 20	+	+	MO	Lc 34	+	+	ES
Lu 21	+	-	MO	Lc 36	+	+	ES
Lu 22b	+	+	MO	Lc 38	+	+	ES
Lu 24	+	+	MO	Lc 41	+	+	ES
Lu 25	+	+	MO	Lc 44	+	+	ES
Lu 26	+	+	MO	Lc 45	+	+	ES
Lu 28	+	-	MO	Lc 46	+	+	ES
Lu 30	+	+	MO	Lc 47	+	+	ES
Lu 31	+	+	MO	Lc 48	+	+	ES
Lu 32	+	+	ES	Lc 49	+	+	ES
Lu 33	+	+	ES	Lc 50	+	+	ES
Lu 38	+	+	ES	Lc 54	+	+	ES
Lu 39	+	+	ES	Lc 55	+	+	ES
Lu 40	+	+	ES	Lc 57	+	+	ES
Lu 47	+	-	ES	Lc 58	+	+	ES
Lu 54	+	-	HN	Lc 235	+	+	PA
Lu 57	+	-	HN	Lc 240	+	+	PA
Lu 62	+	-	HN	Lc 241	+	+	PA
				Lc 242	+	+	PA
				Lc 247	+	+	PA
				Lc 250	+	+	PA
				Lc 252	+	+	PA
				Lc 253	+	+	PA
				Lc 254	+	+	PA
				Lc 256	+	+	PA
				Lc 270	+	+	PA
				Lc 324	+	+	HN

Isolados da coleção da UFRGS; Legenda: Nod+= nodulação positiva; Fix+= fixação de N positiva; += positiva; -= negativo; AR = Arroio dos Ratos; ES = Eldorado do Sul; HN = Hulha Negra; MO = Mostardas; PA = Porto Alegre

## APÊNDICE 3. Continuação.....

<b>Lc 327</b>	+	+	HN
<b>Lc 328</b>	+	+	HN
<b>Lc 331</b>	+	+	HN
<b>Lc 336</b>	+	+	HN
<b>Lc 338</b>	+	+	HN
<b>Lc 339</b>	+	+	HN
<b>Lc 340</b>	+	+	HN
<b>Lc 341</b>	+	+	HN
<b>Lc 343</b>	+	+	HN
<b>Lc 345</b>	+	+	HN
<b>Lc 346</b>	+	-	HN
<b>Lc 347</b>	+	+	HN
<b>Lc 348</b>	+	+	HN
<b>Lc 354</b>	+	+	HN
<b>Lc 386</b>	+	+	AR
<b>Lc 389</b>	+	+	AR
<b>Lc 392</b>	+	+	AR

Isolados da coleção da UFRGS; \*Legenda: Nod+= nodulação positiva; Fix+= fixação de N positiva; += positiva; - =negativo; AR =: Arroio dos Ratos; ES = Eldorado do Sul; HN = Hulha Negra; MO = Mostardas; PA = Porto Alegre

APÊNDICE 4. Rizóbios isolados de plantas de *L. subbiflorus* e *L. glaber* autenticados por Fontoura (2007) quanto à nodulação e fixação simbiótica de nitrogênio em experimento em tubos mantidos sob condições de lampadário

<i>L. subbiflorus</i>				<i>L. glaber</i>			
Rizóbios	Nod <sup>+</sup>	Fix <sup>+</sup>	Local	Rizóbios	Nod <sup>+</sup>	Fix <sup>+</sup>	Local
Ls 1	+	-	MO	Lg 2	+	+	RP
Ls 9	+	+	MO	Lg 4	+	+	RP
Ls 22	+	-	MO	Lg 5	+	+	RP
Ls 23	+	-	MO	Lg 6	+	+	RP
Ls 29	+	-	MO	Lg 7	+	+	RP
Ls 36	+	-	MO	Lg 8	+	+	RP
Ls 50	+	-	PA	Lg 10	+	+	RP
Ls 51	+	-	PA	Lg 11	+	+	RP
Ls 52	+	-	PA	Lg 12	+	+	RP
Ls 54	+	-	PA	Lg 13	+	+	RP
Ls 57	+	-	PA	Lg 14	+	+	RP
Ls 59	+	-	PA	Lg 15	+	+	RP
Ls 62	+	-	PA	Lg 16	+	+	RP
Ls 65	+	-	PA	Lg 17	+	+	RP
Ls 70	+	-	PA	Lg 18	+	+	RP
				Lg 22	+	+	RP
				Lg 23	+	+	RP
				Lg 24	+	+	RP
				Lg 25	+	+	RP
				Lg 26	+	+	RP
				Lg 27	+	+	RP
				Lg 29	+	+	RP
				Lg 31	+	+	RP
				Lg 32	+	+	RP
				Lg 33	+	+	RP
				Lg 34	+	+	RP
				Lg 86	+	-	BG
				Lg 108	+	+	PA
				Lg 109	+	+	PA
				Lg 111	+	+	PA
				Lg 121	+	+	PA
				Lg 122	+	+	PA
				Lg 125	+	+	PA
				Lg 126	+	+	PA
				Lg 149	+	+	PF
				Lg 156	+	+	PF
				Lg 254	+	-	ES

Isolados da coleção da UFRGS; Legenda: Nod+= nodulação positiva; Fix+= fixação de N positiva; += positiva; -=negativo; BG = Bagé; ES = Eldorado do Sul; HN = Hulha Negra; MO = Mostardas; PA = Porto Alegre; PF = Passo Fundo; RP = Rio Pardo