

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

**SELEÇÃO DE RIZÓBIOS E ESTUDO DA COMPATIBILIDADE SIMBIÓTICA  
EM *Desmodium incanum* e *Lotus* spp.**

CAMILLE EICHELBERGER GRANADA  
Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia – UERGS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente como um dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre na Área de Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

**Porto Alegre, abril de 2010.**

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

**SELEÇÃO DE RIZÓBIOS E ESTUDO DA COMPATIBILIDADE SIMBIÓTICA  
EM *Desmodium incanum* e *Lotus* spp.**

**Camille Eichelberger Granada**  
Engenheira de Bioprocessos e Biotecnologia – UERGS

**Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá**  
Orientador

**Porto Alegre, abril de 2010.**

## **PÁGINA PARA HOMOLOGAÇÃO**

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Luiz Carlos e Rita, pelo exemplo de luta e vida sempre a serem seguidos. Seu apoio e estímulo que foram fundamentais para todas as minhas conquistas. Amo vocês.

Ao professor Enilson Luiz Saccol de Sá, pela paciência, orientação, amizade e por todo empenho, e, acima de tudo, exigência. Seus ensinamentos foram fundamentais para minha formação acadêmica.

Ao Dr. Luciano Kayser Vargas pela amizade e ajuda no decorrer da minha vida acadêmica.

Ao Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente e sua equipe de professores pela oportunidade e ensinamentos a mim oferecidos.

Ao professor Miguel Dall' Agnol, do Departamento de Plantas Forrageiras, pela concessão e ajuda com as sementes.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

Ao funcionário Márcio Silveira pela amizade e tempo dedicados, e pelas “dicas” em química.

Aos colegas de Laboratório Andréia Bins, Marcelo Wallau, Rafael Lima, Rafael Machado, Thais Cabral, Raquel Damasceno, Gleidson Reiff, Rogério Fontoura, André Nunes pela amizade. Em especial a Manuela Bruxel e Marcos Stroschein pela troca de conhecimentos, força e ajuda nos momentos mais difíceis.

Aos amigos que sempre torceram por mim, em especial as “novas” amigas Ana e Mica pelos vários momentos de amizade e descontração.

A galera do apartamento Franci, Rafael, Fani e meu irmão Jonas pelas brincadeiras, amizade e compreensão no dia-a-dia.

Aos meus padrinhos Nice e Pepo pela acolhida, amizade, papos cabeça e vários almoços e jantas deliciosas.

Ao Raul pela força e apoio na reta final do mestrado.

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

## SELEÇÃO DE RIZÓBIOS E ESTUDO DA COMPATIBILIDADE SIMBIÓTICA EM *Desmodium incanum* e *Lotus* spp.

Autor: Camille Eichelberger Granada

Orientador: Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá

### RESUMO:

A existência de rizóbios nativos eficientes na fixação simbiótica do nitrogênio em leguminosas introduzidas nos campos do Rio Grande do Sul, como as forrageiras do gênero *Lotus*, é um fator determinante para adaptação ou o fracasso destas novas espécies. Este trabalho visou estudar a compatibilidade simbiótica de rizóbios simbiontes em *Desmodium incanum*, uma planta nativa dos campos do Rio Grande do Sul, e em *L. corniculatus*, *L. uliginosus*, *L. glaber* e *L. subbiflorus*. Para isto 35 isolados e 17 estirpes de rizóbios foram estudadas. Os isolados foram caracterizados fenotípicamente quanto a morfologia colonial, produção de ácido indol-acético e sideróforos. Os rizóbios foram estudados quanto a compatibilidade simbiótica pela inoculação cruzada com as espécies de plantas estudadas. Observou-se existem rizóbios nativos dos solos do Rio Grande do Sul capazes de produzir auxinas e sideróforos. Os rizóbios estudados neste trabalho foram sensíveis a salinidade. Também observou-se que todos os rizóbios isolados de *Lotus* foram capazes de induzir nodulação em pelo menos duas das cinco espécies estudadas. Os rizóbios de *L. uliginosus* que apresentaram compatibilidade com as cinco espécies de plantas estudadas, já os de *D. incanum* mostraram alta especificidade. Em experimento em casa de vegetação as plantas de *L. corniculatus* inoculadas com os o isolado UFRGS Lu 2 e as estirpes EEL 698 e SEMIA 816 produziram maior massa seca da parte aérea. Este isolado também foi eficiente em plantas de *D. incanum*. Os resultados deste trabalho mostram que existem rizóbios autóctones dos solos do Rio Grande do Sul que apresentam baixa especificidade hospedeira sendo capazes de formar simbiose com plantas de *D. incanum*, *L. corniculatus*, *L. subbiflorus*, *L. glaber* e *L. uliginosus*. A compatibilidade simbiótica com diferentes hospedeiros dificultou o estabelecimento de grupos de compatibilidade. A técnica de REP-PCR com o oligonucleotídeo iniciador BOX A1 mostrou que existe variabilidade entre os rizóbios estudados, sendo estes, diferentes das estirpes fornecidas pelas coleções de cultura.

---

Dissertação de Mestrado pelo Programa de Pós Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (70 p.) Abril, 2010.

## **Selection of Rhizobia and symbiotic compatibility study in *Desmodium incanum* and *Lotus* sp. plants**

Author: Camille Eichelberger Granada

Adviser: Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá

### **Abstract:**

The presence of native Rhizobia which are efficient in symbiotic nitrogen fixation in legumes introduced in the fields of Rio Grande do Sul, such as the forages plants of the genus *Lotus*, is one of the factors determining the success or the failure of the adaptation of these new plant species. This work aimed to evaluate the symbiotic compatibility of Rhizobia in association with *Desmodium incanum*, a native plant from the fields of Rio Grande do Sul, as well as with *L. corniculatus*, *L. uliginosus*, *L. glaber* and *L. subbiflorus* species. For this, 35 isolates and 17 lineages of Rhizobia were analyzed. The isolates were characterized phenotypically based on the colony morphology and on the indole acetic acid and siderophore production. The Rhizobia were studied for symbiotic compatibility by cross-inoculation with the plant species studied. It was observed that there are indigenous Rhizobia in the soils of Rio Grande do Sul capable of producing siderophores and auxins. All of *Lotus* Rhizobia were able to induce nodulation in at least two of the five studied species. Rhizobia strains isolated from *L. uliginosus* have shown a broad specificity, being able to induce nodulation in all studied species. On the other hand, Rhizobia isolated from *D. incanum* have shown to be highly specific. In a green-house experiment the plants of *L. corniculatus* inoculated with the isolate UFRGS Lu 2 and strains EEL 698 and SEMIA 816 produced higher shoot dry mass. This isolate was also efficient in *D. incanum* plants. The results show that there are indigenous Rhizobia in the soils of Rio Grande do Sul, which have low host specificity and are capable of forming symbiosis with *D. incanum*, *L. corniculatus*, *L. subbiflorus*, *L. glaber* and *L. uliginosus* plants. The symbiotic compatibility with different hosts made difficult the establishment of compatibility groups. The technique of REP-PCR using primer BOX A1 showed differences among the Rhizobia studied, which are different from strains provided by culture collections.

## SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Simbiose Rizóbio-Leguminosa e a fixação biológica do nitrogênio atmosférico.....	3
2.2. Bactérias diazotróficas simbiontes de leguminosas.....	5
2.3. Compatibilidade simbiótica entre rizóbios e leguminosas.....	7
2.4. Caracterização genética de rizóbios.....	9
2.5. Leguminosas e o estudo da simbiose.....	11
2.5.1. Características da leguminosa <i>Desmodium incanum</i> .....	12
2.5.2. Características das espécies de <i>Lotus</i> com potencial forrageiro: <i>L. corniculatus</i> , <i>L. glaber</i> , <i>L. uliginosus</i> e <i>L. subbiflorus</i> .....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1. Isolados de rizóbios de <i>Lotus</i> spp. e estirpes estudadas.....	15
3.2. Obtenção dos isolados bacterianos de <i>D. incanum</i> .....	16
3.3. Resistência ao choque salino em 1, 2 e 3% de cloreto de sódio em meio ágar LM.....	17
3.4. Reação de pH dos rizóbios em meio de cultura.....	18
3.5. Produção de auxinas equivalentes ao ácido-indol-acético (AIA)....	18
3.6. Produção de sideróforos.....	19
3.7. Determinação da compatibilidade simbiótica entre os rizóbios e plantas de <i>D. incanum</i> , <i>Lotus</i> spp. e <i>Glycine max</i> .....	19
3.8. Avaliação da eficiência na fixação simbiótica do nitrogênio dos rizóbios em plantas de <i>L. corniculatus</i> e <i>D. Incanum</i> .....	20
3.9. Caracterização genética dos rizóbios.....	22
3.9.1. Amplificação do DNA genômico pela técnica de Rep-PCR pelo oligonucleotídeo iniciador BOX.....	24
3.9.2. Análise dos produtos da amplificação.....	24
4. RESULTADOS.....	26
4.1. Características morfológicas dos rizóbios.....	26
4.2. Resistência ao choque salino em meio de cultura com 1, 2 e 3% de cloreto de sódio (NaCl).....	29
4.3. Produção de auxinas e sideróforos pelos rizóbios.....	31
4.4. Avaliação da compatibilidade simbiótica dos rizóbios com as plantas estudadas.....	33
4.5. Avaliação da eficiência na fixação simbiótica do nitrogênio dos rizóbios em plantas de <i>L. corniculatus</i> e <i>D. Incanum</i> .....	42
4.6.....	48
5. CONCLUSÕES.....	54

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
7. APÊNDICE 1.....	67
7.1. Meios de Cultura e Soluções utilizadas.....	67
7.1.1 Levedura Manitol (LM) (Vincent, 1970).....	67
7.1.2. Soluções para a extração de DNA.....	67
7.1.3. Solução Nutritiva (Sarruge, 1974).....	68
7.1.4. Meio de Cultura de Wood & Cooper adaptado por Sá (2001)*.....	69
8. APÊNDICE 2 .....	70
8.1. Mistura de cada reação para o PCR com o oligonucleotídeo iniciador BOX A 1-R.....	70
8.2. Ciclos para a amplificação do DNA genômico no Rep-PCR BOX...	70

## RELAÇÃO DE TABELAS

	Pág
<b>TABELA 1:</b> Relação de Isolados e estirpes dos rizóbios para <i>L. glaber</i> , <i>L. subbiflorus</i> , <i>L. corniculatus</i> e <i>L. uliginosus</i> estudados neste trabalho.....	16
<b>TABELA 2:</b> Características das colônias de rizóbios avaliadas neste trabalho: tempo de aparecimento de colônias de 1 mm, diâmetro da colônia após sete dias de crescimento, densidade óptica em meio de cultura ágar LM com vermelho congo e reação de pH em meio ágar LM com azul de bromotimol.....	27
<b>TABELA 3:</b> Resistência dos Rizóbios ao choque salino em meio de cultura LM com concentrações de cloreto de sódio de 1, 2 e 3%.....	30
<b>TABELA 4:</b> Produção de ácido indol acético (AIA) e sideróforos pelos rizóbios estudados.....	32
<b>TABELA 5:</b> Avaliação da capacidade de induzir nodulação (Nod) e fixação simbiótica de nitrogênio (Fix) de estirpes e isolados de rizóbios de plantas de <i>D. incanum</i> quando inoculados em plantas de <i>D. incanum</i> , <i>L. corniculatus</i> , <i>L. uliginosus</i> , <i>L. glaber</i> , <i>L. subbiflorus</i> e <i>Glycine Max</i> .....	34
<b>TABELA 6:</b> Avaliação da capacidade de induzir nodulação (Nod) e fixação simbiótica de nitrogênio (Fix) de estirpes e rizóbios isolados de plantas de <i>L. corniculatus</i> quando inoculados em plantas de <i>D. incanum</i> , <i>L. corniculatus</i> e <i>L. uliginosus</i> ..	36
<b>TABELA 7:</b> Avaliação da capacidade de induzir nodulação (Nod) e fixação simbiótica de nitrogênio (Fix) de estirpes e rizóbios isolados de plantas de <i>L. uliginosus</i> quando inoculados em plantas de <i>D. incanum</i> , <i>L. corniculatus</i> , <i>L. uliginosus</i> , <i>L. subbiflorus</i> e <i>L. glaber</i> .....	37

<b>TABELA 8:</b>	Avaliação da capacidade de induzir nodulação (Nod) e fixação simbiótica de nitrogênio (Fix) de estirpes e rizóbios isolados de plantas de <i>L. subbiflorus</i> quando inoculados em plantas de <i>D. incanum</i> , <i>L. corniculatus</i> , <i>L. uliginosus</i> , <i>L. subbiflorus</i> e <i>L. glaber</i> .....	39
<b>TABELA 9:</b>	Avaliação da capacidade de induzir nodulação (Nod) e fixação simbiótica de nitrogênio (Fix) de estirpes e rizóbios isolados de plantas de <i>L. glaber</i> quando inoculados em plantas de <i>D. incanum</i> , <i>L. corniculatus</i> , <i>L. uliginosus</i> , <i>L. subbiflorus</i> e <i>L. glaber</i> .....	40
<b>TABELA 10:</b>	Avaliação da capacidade de induzir nodulação (Nod) e fixação simbiótica de nitrogênio (Fix) de estirpes para soja ( <i>G. max</i> ) quando inoculadas em plantas de <i>D. incanum</i> , <i>L. corniculatus</i> e <i>L. subbiflorus</i> .....	41
<b>TABELA 11:</b>	Massa seca (MS) da raiz e da parte aérea (PA) das plantas <i>Desmodium incanum</i> inoculadas com rizóbios e cultivadas em casa de vegetação.....	43
<b>TABELA 12:</b>	Massa seca (MS) e número de nódulos, massa seca da raiz, da parte aérea por tratamento e nitrogênio (N) total por planta de <i>L. corniculatus</i> inoculadas com os rizóbios e cultivadas em casa de vegetação e eficiência relativa da inoculação dos rizóbios nestas plantas.....	46

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
<b>FIGURA 1:</b> Foto do perfil eletroforético em gel de agarose dos fragmentos da amplificação do DNA genômico por Rep-PCR BOX de 13 isolados e quatro estirpes de rizóbios estudados neste trabalho.....	49
<b>FIGURA 2:</b> Foto do perfil eletroforético em gel de agarose dos fragmentos da amplificação do DNA genômico por Rep-PCR BOX de oito isolados e 11 estirpes de rizóbios estudados neste trabalho.....	50
<b>FIGURA 3:</b> Dendrograma de genotipagem de 36 estirpes e isolados de rizóbios estudados neste trabalho. Agrupamento obtido por UPGMA, utilizando-se o coeficiente de Jaccard, para perfil de bandas obtido a partir da PCR com o oligonucleotídeo iniciador BOX A1.....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS

**AIA** – Ácido indol acético  
**BOX** - Sequências repetitivas de enterobactérias  
**CAS** – Cromazurol S  
**DNA** – Ácido desoxiribonucleico  
**EEL** – Estação Experimental de Lages  
**ERIC** - Sequências repetitivas intergênicas consenso em enterobactérias  
**Lc** – *Lotus corniculatus*  
**Lg** – *Lotus glaber*  
**Ls** – *Lotus subbiflorus*  
**Lu** – *Lotus uliginosus*  
**LM** – Levedura Manitol  
**mg** – Miligramas  
**mL** – Mililitros  
**µL** – Microlitros  
**mM** – Milimolar  
**N** - Nitrogênio  
**PCR** – Reação em cadeia pela polimerase  
**rDNA** - Ácido Desoxirribonucléico Ribossômico  
**REP** - Sequências repetitivas extragênicas palindromicas  
**RFLP** - Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição  
**RPM** – Rotações por minuto  
**SDS** - Dodecil Sulfato de Sódio  
**SEMIA** – Seção de Microbiologia Agrícola  
**U** - Unidade  
**UFRGS** – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## 1. INTRODUÇÃO

O bioma Pampa, no Brasil, possui uma área de aproximadamente 176.496 Km<sup>2</sup>, o que constitui cerca de 2,07% da área total do país, sendo que no Rio Grande do Sul, este é formado pelos campos da parte sul do estado, também conhecidos como campos nativos. Grande parte da riqueza da biodiversidade do Pampa ainda é desconhecida, pois foram desenvolvidas até hoje poucas pesquisas de levantamento e de identificação da fauna e da flora deste Bioma.

A grande quantidade e diversidade de plantas nativas com potencial forrageiro que existem nos campos do Rio Grande do Sul, fazem com que a pecuária seja uma das principais atividades da região. A lotação excessiva do gado pode gerar perda de biodiversidade. Além do potencial forrageiro, as pastagens permanentes e a introdução de espécies são fundamentais para a proteção do solo, podendo também contribuir na recuperação de áreas com solos degradados.

Existem diversas espécies leguminosas características destas regiões que apresentam um grande potencial forrageiro, entre elas encontram-

se espécies do gênero *Desmodium*. As raízes destas plantas podem ser colonizadas por bactérias diazotróficas genericamente denominadas rizóbios, formando uma associação simbiótica entre a planta e a bactéria. Quando a planta e o rizóbio estão em simbiose, ocorre a fixação biológica do nitrogênio, que fornece esse nutriente para a leguminosa e, ao mesmo tempo, beneficia outras espécies associadas, por meio da liberação de exudados radiculares e da ciclagem dos resíduos da leguminosa.

A existência de rizóbios de baixa especificidade, que estabeleçam simbiose eficiente com as leguminosas forrageiras nativas e também com plantas exóticas (como forrageiras do gênero *Lotus*) pode facilitar a adaptação das leguminosas forrageiras introduzidas e também melhorar a qualidade da forragem nas áreas de pastagem nativa. Mas em geral, a população de rizóbios nativos de um solo é menos eficiente na fixação biológica do nitrogênio do que as estirpes que são introduzidas via inoculação, podendo estabelecer simbiose ineficiente com a leguminosa, o que dificulta a adaptação e o desenvolvimento das plantas exóticas.

Por isso, a determinação de grupos de compatibilidade e a seleção de estirpes de rizóbios que possuam a capacidade de estabelecer simbiose e fixar o nitrogênio atmosférico eficientemente em mais de uma leguminosa é de grande importância atualmente. Assim, o objetivo deste trabalho foi selecionar, avaliar a compatibilidade simbiótica e a capacidade de fixação simbiótica do nitrogênio de rizóbios nativos dos solos do Rio Grande do sul simbiotes de plantas de *D. incanum*, *L. corniculatus*, *L. subbiflorus*, *L. uliginosus* e *L. glaber* nestas respectivas plantas.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

O estudo da simbiose entre leguminosas e bactérias diazotróficas fixadoras de nitrogênio atmosférico é de grande importância para o desenvolvimento de tecnologias que facilitem a adaptação de novas espécies, aumentem a produtividade, reduzam os custos de produção, com o mínimo risco de degradação do solo e do ambiente.

### **2.1. Simbiose rizóbio-Leguminosa e a fixação biológica do nitrogênio atmosférico**

A formação dos nódulos, 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 exudatos radiculares, as plantas podem enviar um número bem diverso de sinais. Tais sinais são altamente específicos entre o hospedeiro e o simbiote, pois diferem consideravelmente

entre as leguminosas, e esta especificidade possibilita que os rizóbios simbioses identifiquem seus próprios hospedeiros (Bais et al., 2004).

O processo da simbiose é iniciado pela ausência de nitrogênio no solo. Os flavonóides excretados pelo sistema radicular da leguminosa acumulam-se na membrana citoplasmática dos rizóbios e, se os receptores de membrana das bactérias reconhecerem estes metabólitos, o gene *nodD* é ativado (Recourt et al., 1989; Hubac et al., 1993) e, o produto deste gene, ativa os genes de nodulação *nod*, *nol* e *noe* (Goormachtig et al., 2004) mais conhecidos como fatores de nodulação.

Os fatores de nodulação atuam no estabelecimento da especificidade pela planta hospedeira. A estrutura formada pelo produto dos genes *nodABC* é essencial para o estabelecimento da simbiose (o gene *nodA* sintetiza uma acil transferase, *nodB* uma desacetilase e *nodC* uma N-acetil-glucosamil transferase). A união destas moléculas resulta na formação de um lipo-quito-olissacarídeo que é reconhecido pelas células das raízes da planta, e juntamente com uma série de hormônios liberados pelas bactérias (auxinas, citocininas), provocam o encurvamento do pêlo radicular (Loh & Stacey, 2003). Em seguida, a expressão de um gene de iniciação da nodulação pelos rizóbios, a nodulina (*enod*), provoca uma série de alterações da estrutura do pêlo radicular formando um cordão de infecção que permite, finalmente, a entrada da bactéria pela raiz, seguido pela infecção da planta, e o desenvolvimento dos nódulos (Pereira, 2008).

Com a formação dos nódulos, inicia-se o processo de fixação biológica do nitrogênio. Este processo é regulado pelos genes *nif* e *fix* que são

responsáveis pela síntese e regulação de um sistema enzimático, onde se inclui a nitrogenase, que atua como catalisadora da reação, e que é capaz de reduzir o nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) em amônia ( $NH_3$ ) (Argudo et al. 2004). Este complexo enzimático é altamente conservado em termos de estrutura e função, constituindo-se basicamente de duas metaloproteínas, uma chamada ferro proteína que liga-se ao ATP e atua como doadora de elétrons, e outra molibdênio ferro proteína que contém o sítio de redução do substrato que transforma o gás nitrogênio ( $N_2$ ) em amônia ( $NH_3$ ) (Burriss & Roberts, 1993; Eady, 1996; Ferguson, 1998). Esta então é liberada por difusão pelo bacterióide para o citosol da célula infectada por transportadores de membrana (Taiz & Zieger, 2004).

O contato da amônia com o substrato aquoso do citoplasma das células faz com que este se transforme em no íon amônio ( $NH_4^+$ ). Por sua vez, o acúmulo de  $NH_4^+$  no citoplasma inibe a fixação biológica dentro dos bacterióides, desta forma, este íon é transportado para dentro das células hospedeiras e transformado em aminoácidos pelas enzimas glutamina sintetase e glutamato sintase (King & Purcell, 2005).

## **2.2 Bactérias diazotróficas simbiotes de leguminosas**

Genericamente conhecidas como rizóbios, estas bactérias são bastonetes gram-negativas, aeróbias, não formadoras de endosporos. O número e a posição de flagelos dependem do gênero. São bactérias predominantemente quimiorganotróficas (Somasegaram & Hoben, 1994; Moreira & Siqueira, 2002).

No ambiente, estas bactérias são pleomórficas, pois no solo, são bacilos de vida livre, móveis, aeróbios, incapazes de fixar o nitrogênio atmosférico (N<sub>2</sub>) (Melo et al., 1998). Já em simbiose com as raízes das leguminosas, assumem formas irregulares (sendo denominados bacterioides), aumentam o tamanho das suas células (Cardoso et al., 1992), nutrem-se de compostos sintetizados pela planta hospedeira, vivem em condições microaerofilicas (Canigia, 2003) e fixam o nitrogênio atmosférico (Moreira & Siqueira, 2002).

A primeira classificação considerava todas as bactérias formadoras de nódulos em leguminosas como pertencentes ao gênero *Rhizobium* (Frank, 1889). Nesta classificação, a especificidade da bactéria com a planta hospedeira era o principal fator determinante da espécie (Fred et al., 1932). Com o passar do tempo, este critério deixou de ser tão relevante, pois um grande número de exceções dentro dos grupos começou a ser detectado (Wilson, 1944). Posteriormente, Jordan (1982) sugeriu uma separação taxonômica baseada na taxa de crescimento, pois esta pode diferenciar os rizóbios de multiplicação rápida (*Rhizobium*) daqueles de multiplicação lenta (*Bradyrhizobium*).

Nos últimos 20 anos, a classificação dos rizóbios passou por constantes alterações (Wang et al., 2006). O emprego de técnicas de biologia molecular revolucionou o estudo da taxonomia procariótica. Estudos com o DNA das bactérias levaram à reclassificação de muitos microrganismos. Técnicas de amplificação e caracterização do DNA ribossomal das bactérias

estabeleceram relações filogenéticas antes não conhecidas, mostrando relações taxonômicas mais confiáveis (Garrity & Holt, 2001).

Atualmente os microrganismos diazotróficos que são capazes de induzir a formação de nódulos e fixar o nitrogênio atmosférico em simbiose com leguminosas são classificados como pertencentes ao filo  $\alpha$ -proteobactéria e  $\beta$ -proteobactéria (Zakhia & Laujudie, 2001). Os gêneros de rizóbios mais conhecidos são: *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* e *Azorhizobium*, sendo estes também, os mais estudados atualmente (Sahgal & Johri, 2003). Recentemente, algumas bactérias estão sendo denominadas rizóbios por serem simbioses de leguminosas, mas pertencem a gêneros bem distintos, tais como *Devosia* (Rivas et al., 2003), *Methylobacterium* (Jourand et al., 2004) e *Ochrobactrum* (Trujillo et al., 2005), pertencentes a classe  $\alpha$ -proteobactéria, *Burkholderia* (Vandamme et al., 2002), *Phyllobacterium* (Valverde et al., 2005) e *Cupriavidus* (Barrett e Parker, 2006) pertencentes a classe  $\beta$ -proteobactéria.

### **2.3 Compatibilidade simbiótica entre rizóbios e leguminosas**

De um modo geral, pode ser observada uma especificidade na formação dos nódulos pelos rizóbios nas plantas leguminosas (Melo et al., 1998). A soja (*Glycine max*) é um exemplo deste tipo de planta, uma vez que, dentre as variedades brasileiras, foram identificadas somente duas espécies de rizóbios que estabelecem simbiose com a mesma: *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii* (Neves & Rumjanek, 1996; Arruda et al., 2001; Campos et al., 2001; Silva et al., 2002; Pavanelli & Araújo, 2009).

Entretanto existem rizóbios que apresentam baixa especificidade pela leguminosa hospedeira, ou seja, vários rizóbios possuem a capacidade de estabelecer simbiose com diversos hospedeiros. Em estudo realizado por Fernandes et al. (2003) é relatada a existência de isolados de rizóbios em Sergipe (Brasil) capazes de nodular e fixar eficientemente o nitrogênio atmosférico em três espécies: guandu (*Cajanus cajan*), feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) e feijão-caupi (*Vigna unguiculata*). Melloni et al. (2006) estudaram a diversidade fenotípica de isolados de rizóbios simbioticamente compatíveis com feijão-caupi e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em áreas de mineração de bauxita e encontraram oito grupos diferentes entre os isolados estudados e as respectivas estirpes recomendadas.

Já em trabalhos sobre a simbiose entre rizóbios e leguminosas forrageiras, no caso de plantas de *Lotus*, Hernández et al. (2005) sugeriram a existência de estirpes de rizóbios de crescimento intermediário, *Mesorhizobium loti* (Jarvis et al., 1997), compatíveis simbioticamente com plantas de *Lotus corniculatus* e *L. glaber*. Segundo os mesmos autores, as plantas de *L. subbiflorus* e *L. uliginosus* formariam outro grupo de compatibilidade, relacionando-se efetivamente com estirpes de bactérias de crescimento lento, como as pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*. Contrariando estes resultados, Tonon (2008) em seu estudo sobre compatibilidade simbiótica entre os rizóbios e estas quatro espécies de *Lotus* já citadas, observou que a formação de nódulos nas plantas ocorreu de maneira aleatória, sem a formação dos grupos de compatibilidade entre os rizóbios e estas forrageiras.

Outro gênero de forrageira estudado quanto à possibilidade de estabelecer simbiose com os rizóbios é o *Desmodium*. Em um estudo realizado por Parker (2002) foi verificada a existência de muitos isolados de rizóbios de crescimento lento e rápido capazes de estabelecer simbiose em duas leguminosas distintas: *Desmodium glutinosum* (popularmente conhecido como pega-pega) e *Amphicarpaea bracteata*, que são plantas comuns na América do Norte.

No entanto, o fato dos rizóbios apresentarem baixa especificidade hospedeira, pode fazer com que bactérias eficientes em uma espécie possam comportar-se como parasitárias em outras, induzindo a nodulação, mas sendo simbioticamente ineficientes, não fixando o nitrogênio atmosférico para as plantas (Baraibar et al., 1999). Sá (2001), em seu trabalho realizado com rizóbios e plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), notou que o fato de uma grande variedade de espécies de rizóbios estabelecerem simbiose em uma mesma planta aumenta a probabilidade desta simbiose ser ineficiente. Observação semelhante foi relatada por Hernández et al. (2005) e Tonon (2008) com plantas de *Lotus corniculatus*, *L. subbiflorus*, *L. glaber* e *L. uliginosus*, e por Fontoura (2008) com *L. glaber* e *L. subbiflorus*.

#### **2.4 Caracterização genética de rizóbios**

Tradicionalmente são utilizados testes morfológicos, bioquímicos, enzimáticos e simbióticos para classificação e caracterização dos rizóbios (Vincent, 1970). Recentemente técnicas de biologia molecular têm facilitado o estudo e identificação destas bactérias (de Bruijn 1992; Laguerre et al, 1994;

Menna et al., 2006). A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é a mais utilizada atualmente, pois esta permite a amplificação de sequências definidas na molécula de DNA (Chueire et al., 2000; Laguerre et al., 2001). Vários são os relatos sobre a utilização desta tecnologia nos estudos de ecologia, genética e taxonomia de rizóbios (de Bruijn, 1992; Judd et al., 1993; Agius et al., 1997; Laguerre et al., 2001; Santos et al., 1999; Tonon, 2008), e de comparações genéticas entre estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (Laguerre et al., 1994; Vinuesa et al., 1998).

Para a caracterização da variabilidade das espécies existem muitas variações da técnica de PCR, que gera perfis diferenciados, e facilita o estudo dos isolados (Grange, 2001; Stralio, 2005). Algumas das técnicas mais utilizadas são: comparação e sequenciamento dos nucleotídeos dos genes, em especial, o gene 16S rDNA, considerado conservado nas bactérias, mas que contém variações significativas dentro do gene, sendo capaz de mostrar relações filogenéticas entre espécies (Willems, 2007). A técnica de RFLP (Restriction fragment Length polymorphism – polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição) é muito utilizada para caracterizar a variabilidade dos isolados bacterianos, com a amplificação de um gene seguida pelo uso de endonucleases de restrição. A técnica de Rep-PCR amplifica regiões altamente conservadas e repetitivas no genoma bacteriano (Chapaval et al., 2010). Suas variações Rep-PCR REP (repetitive extragenic palindromic – Sequências repetitivas extragênicas palindrômicas) Rep-PCR ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus – Sequências repetitivas intergênicas consenso) e Rep-PCR BOX (enterobacterial repetitive sequences

– Sequências repetitivas de enterobactérias) amplificam regiões altamente conservadas e repetitivas (Stern et al., 1984; Versalovic et al., 1994; Chapaval et al., 2010) e 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., 2000; Mostasso et al., 2002; Frizzo, 2007; Fontoura, 2008; Tonon, 2008).

Alguns trabalhos que estudaram a variabilidade dos rizóbios usando técnicas de biologia molecular foram descritos por Chen et al. (2000), Grange & Hungria (2004) e Giongo (2007) que utilizaram a amplificação e sequenciamento do rDNA 16S e Rep-PCR ERIC; e Stroschein (2007) utilizou Rep-PCR BOX para a caracterização de seus isolados bacterianos.

## **2.5 Leguminosas e o estudo da simbiose**

A família Leguminosae compreende 650 gêneros distribuídos em 18.000 espécies que estão amplamente distribuídas pelo mundo (Biondo et al., 2005). Estas espécies estão distribuídas em três subfamílias: Papilionoideae, Mimosoideae, Caesalpinioideae.

Alguns gêneros de leguminosas despertam o interesse de muitos pesquisadores no que se refere ao estudo da simbiose planta-rizóbio. Dentre elas estão forrageiras do gênero *Desmodium* (Tlusty et al., 2004; Gu et al., 2007) e *Lotus* (Scheffer-Basso et al., 2001; Frizzo, 2007; Fontoura, 2008; Tonon, 2008), e a oleaginosa do tipo *Glycine max* (soja) (Campos et al., 2001; Fagan et al., 2007; Carvalho et al., 2008)

### **2.5.1 Características da leguminosa *Desmodium incanum***

O gênero *Desmodium* sp. é constituído por aproximadamente 300 espécies, distribuindo-se em zonas tropicais de todo o mundo, tendo maior concentração de espécies no leste de Ásia, México e Brasil (Schubert, 1980).

A espécie *D. incanum* é nativa da América do Sul e distribuída nas comunidades vegetais de todas as regiões fisiográficas do Rio Grande do Sul (Garcia & Baseggio, 1999). Estas plantas, popularmente como pega pega, possuem um alto potencial forrageiro devido ao seu elevado valor nutricional, chegando a aproximadamente 15% de proteína bruta na planta (Krzyzanowski & Santos, 1984). Estas plantas adaptam-se aos mais variados tipos de solo, crescendo bem em solos ácidos e de baixa fertilidade, campos úmidos, secos, pedregosos, gramíneos (Silva et al, 2002).

Estas leguminosas também possuem a capacidade de estabelecer relações simbióticas com os rizóbios. No estudo realizado por Gu et al. (2007) sobre a diversidade genética dos rizóbios noduladores de *Desmodium* mostrou que, a maioria das cepas isoladas fazia parte do gênero *Bradyrhizobium* sendo caracterizados como *B. elkanii*, *B. japonicum* e *B. yuanmingense*, restando pequenos grupos de isolados caracterizados como *Rhizobium*, *Sinorhizobium* ou *Mesorhizobium*.

### **2.5.2 Características das espécies de *Lotus* com potencial forrageiro: *L. corniculatus*, *L. glaber*, *L. uliginosus* e *L. subbiflorus*.**

As plantas das espécies *Lotus corniculatus*, *L. glaber*, *L. subbiflorus* e *L. uliginosus* são leguminosas com potencial forrageiro, perenes, inverno-

primaveril, de origem européia e mediterrânea, distribuídas em todas as regiões de clima temperado (Soster et al., 2004). Podem apresentar variações quanto ao tamanho, à forma, à coloração das folhas (Seaney & Henson, 1970).

O cornichão (*L. corniculatus*) é uma leguminosa forrageira de grande importância em diversos países (Maroso & Scheffer-Basso, 2007), com excelente adaptação no sul do Brasil, Uruguai, Argentina e Chile (Paim & Riboldi, 1991). No Rio Grande do Sul, a cultivar “São Gabriel” de *L. corniculatus*, foi desenvolvida a partir de pesquisas 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).

As plantas de *L. uliginosus* (cultivar tetraplóide Maku) são denominadas popularmente como “cornichão dos banhados” (Maroso & Scheffer-Basso, 2007). Esta se caracteriza por apresentar maior tolerância a solos ácidos e deficientes de fósforo em relação às outras espécies de *Lotus*. Esta espécie de planta também possui elevada capacidade de estabelecimento em áreas úmidas (Paim & Riboldi, 1991; Brose, 1992), suportando também pastejos intensos (Ayala et al., 2003).

Em relação à espécie *L. subbiflorus* não há relatos de quando foi introduzida no Rio Grande do Sul (Paim & Riboldi, 1991), encontrando-se de forma espontânea em áreas de antigas coleções. É uma leguminosa de inverno, e pode comportar-se de maneira bianual ou perene em áreas sem

restrições hídricas. É adaptada a solos ácidos, de baixa fertilidade e drenagem deficiente (Lowther et al., 1987). Essa espécie possui um sistema radicular pouco profundo, mas abundante.

*L. glaber* é uma forrageira perene que se adapta 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 adapta-se a ambientes de muita salinidade (Mujica & Rumi, 1999) e cresce em solos com pH 5,8 a 6,0. No Chile, esta espécie é encontrada de forma espontânea nas áreas arroseiras.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Isolados de rizóbios de *Lotus* spp e estirpes estudadas.

Os rizóbios nativos de solos do Rio Grande do Sul simbiotes de plantas de *Lotus glaber*, *L. subbiflorus* estudados neste trabalho foram isolados por Fontoura (2008), e os rizóbios de *L. corniculatus* e *L. uliginosus* foram obtidos por Frizzo (2007) (Tabela 1). Estes isolados bacterianos fazem parte da Coleção de Culturas de Rizóbios do Laboratório de Microbiologia do Solo da UFRGS.

Também foram estudadas as estirpes EEL698, para *L. subbiflorus*, e EEL8084, para *L. uliginosus*, da coleção da Estação Experimental de Lages – SC (EEL), e a estirpe U512 que está sendo estudada no Uruguai. Além destas, também foram estudadas as estirpes de rizóbios obtidos da coleção de estirpes SEMIA localizadas na FEPAGRO (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária) liberadas para a produção de inoculantes no Brasil para *Glicyne max*, *Desmodium incanun*, *D. intortum*, *D. ovalifolium*, *Lotus corniculatus*, *L. uliginosus*, *L. subbiflorus* e *L. glaber* listadas na Tabela 1.

**TABELA 1:** Relação de Isolados e estirpes dos rizóbios para *L. glaber*, *L. subbiflorus*, *L. corniculatus*, *L. uliginosus*, *Desmodium* sp. e *Glycine max* estudados neste trabalho.

Espécies	Isolados	Estirpes	Espécies	isolados	Estirpes
<b><i>L. corniculatus</i></b>	UFRGS Lc 10	SEMIA 806	<b><i>L. subbiflorus</i></b>	UFRGS Ls 1	SEMIA 848
	UFRGS Lc 14	SEMIA808		UFRGS Ls 8	EEL 698
	UFRGS Lc 22	SEMIA 816		UFRGS Ls 22	
	UFRGS Lc 36	U 510		UFRGS Ls 28	
	UFRGS Lc 322			UFRGS Ls 36	
	UFRGS Lc 336			UFRGS Ls 59	
	UFRGS Lc 340			UFRGS Ls 62	
<b><i>L. uliginosus</i></b>	UFRGS Lu 2	SEMIA 822	<b><i>Desmodium</i></b>		SEMIA 6028 <sup>a</sup>
	UFRGS Lu 8	EEL 8084			SEMIA 656 <sup>b</sup>
	UFRGS Lu 9				SEMIA 6208 <sup>c</sup>
	UFRGS Lu 10				SEMIA 6209 <sup>c</sup>
	UFRGS Lu 12				
	UFRGS Lu 13				
	UFRGS Lu 14				
	UFRGS Lu 19				
<b><i>G. Max</i></b>		SEMIA 5079	<b><i>L. glaber</i></b>	UFRGS Lg 109	SEMIA 830
		SEMIA 5080		UFRGS Lg 111	
		SEMIA 587			
		SEMIA 5019			

<sup>a</sup>: Estirpe recomenda para *Desmodium incanun*; <sup>b</sup>: Estirpe recomendada para *D. intortum*; <sup>c</sup>: Estirpe recomendada para *D. ovalifolium*

### 3.2 Obtenção dos isolados bacterianos de *D. incanum*

Os rizóbios para *Desmodium incanum* foram isolados a partir dos nódulos radiculares de plantas desta espécie coletadas nas localidades de Rio Pardo, Eldorado do Sul e Viamão. Em laboratório, os nódulos radiculares foram destacados e desinfestados por lavagens sucessivas com etanol (70%) por 45

segundos, seguido de hipoclorito (1%) por 30 segundos e, cinco lavagens com água destilada e esterilizada. Em seguida, cada nódulo foi macerado com uma pinça estéril em tubos de microcentrífuga contendo 100 µL de água destilada e esterilizada, a suspensão obtida foi inoculada pela técnica de esgotamento por estrias em placas de Petry contendo o meio ágar Levedura Manitol (LM) (Vincent, 1970) com Vermelho Congo (25 mg/L) e incubadas em estufa a 28°C até o aparecimento de crescimento bacteriano. Os rizóbios obtidos foram purificados utilizando-se a técnica de esgotamento de inóculo por estriamento em placas de Petry com meio ágar LM, até a obtenção de colônias isoladas, homogêneas e com características persistentes. As colônias obtidas foram preservadas em tubos de dois mL contendo glicerol 50% e mantidos em ultra freezer a -80°C.

O crescimento dos isolados de rizóbios foi observado diariamente e as colônias foram caracterizadas. Foram avaliados o tempo de aparecimento de colônias (o tempo de aparecimento em dias foi avaliado quando a colônia bacteriana atingiu um diâmetro de um milímetro), tamanho e morfologia de colônia após sete dias de crescimento em meio de cultura ágar LM (Vincent, 1970) com vermelho congo.

### **3.3 Resistência ao choque salino em 1, 2 e 3% de Cloreto de Sódio em meio ágar LM.**

Os isolados bacterianos foram crescidos em frascos âmbar de 10mL com tampa de baquelite contendo 5mL de meio líquido LM (Vincent, 1970) por três dias a 28°C sob agitação de 120 rpm. Logo após, o choque salino foi

avaliado pela inoculação do caldo bacteriano pela técnica de inoculação de gotas de 20 µL em placas de Petry contendo o meio ágar LM adicionado de 1, 2, e 3 % de Cloreto de Sódio (NaCl). Após sete dias de incubação em estufa a 28°C, os isolados que cresceram na respectiva concentração de NaCl foram considerados resistentes.

### **3.4 Reação de pH dos rizóbios em meio de cultura**

A produção de compostos alcalinos ou ácidos pelos rizóbios foi avaliada pela inoculação das bactérias em meio ágar LM (Vincent, 1970) com Azul de Bromotimol (25mg/L). Após sete dias de incubação a 28°C, a mudança da coloração do meio de verde para amarelo indica a acidificação do meio, já a alteração para o azul, indica a alcalinização do mesmo (Somasegaran & Hoben, 1994).

### **3.5 Produção de auxinas equivalentes ao ácido-indol-acético (AIA)**

Para avaliar-se a capacidade dos rizóbios de produzir auxinas equivalentes ao AIA, adaptou-se a metodologia proposta por Asghar et al. (2002). Os isolados bacterianos preservados foram cultivados em meio líquido LM com adição de triptofano (50 mg/L), por três dias a 28°C sob agitação de 120 rpm. Após este período, em microplacas de poliestireno de 96 poços, 50 µL do caldo bacteriano crescido foram adicionados a 50 µL da solução de Salkowski (2 mL de FeCl<sub>3</sub> 0,5M + 98 mL de HClO<sub>4</sub> 35%). Esta metodologia

baseia-se na oxidação dos compostos indólicos por sais férricos, pois em pH 2,6 o ferro decompõe os compostos indólicos lentamente.

As suspensões obtidas pela mistura do reagente de Salkowski e o caldo bacteriano foram incubadas à temperatura ambiente por uma hora. As reações que mudaram a coloração de amarelo claro para rosa foram um indicativo da existência de auxinas semelhantes ao AIA, assim o rizóbio da reação foi considerado produtor de AIA.

### **3.6 Produção de Sideróforos**

Para avaliação da capacidade de produção de sideróforos, os rizóbios foram inoculados em meio líquido de Wood & Cooper (Wood & Cooper, 1985) adaptado por Sá (2001) e mantidos por três dias a 28°C sob agitação de 120 rpm. Após este período, 50 µL do caldo bacteriano obtido foi adicionado a 50 µL da solução descrita por Schwynn & Neilands (1987) de Chrome Azurol S (CAS). Esta metodologia baseia-se na imobilização do Ferro no complexo CAS + Fe<sup>+3</sup> + brometo de hexadeciltrimetilamônio. Com a remoção do ferro do complexo pelo sideróforo, a solução muda do azul para o amarelo e o rizóbio é considerado produtor de sideróforo.

### **3.7 Determinação da compatibilidade simbiótica entre os rizóbios e plantas de *D. incanum*, *Lotus* spp. e *Glycine max***

A compatibilidade simbiótica entre os rizóbios e as plantas de *D. incanum*, *Lotus corniculatus*, *L. subbiflorus*, *L. glaber*, *L. uliginosus* e *Glycine max* foi determinada pela inoculação dos rizóbios nas seis espécies citadas

acima. Para isto, sementes das plantas estudadas foram desinfestadas segundo a metodologia já descrita e pré-germinadas em papel filtro. Em seguida, as sementes pré-germinadas foram colocadas em tubos de ensaio de 250 mm de comprimento e 24 mm de diâmetro, contendo uma tira de papel filtro embebida parcialmente em solução nutritiva isenta de nitrogênio (Sarruge, 1975) esterelizados. Em cada tubo, as sementes foram inoculadas com 1 mL de caldo LM contendo o rizóbio a ser avaliado, crescido por três dias a 28°C sob agitação de 120 rpm. Os tubos foram colocados em um lampadário com fotoperíodo de 12 horas a temperatura ambiente.

O desenvolvimento das plantas foi acompanhado diariamente com a finalidade de avaliar a capacidade de formação de nódulos do isolado na respectiva planta após 60 dias da inoculação. Os rizóbios que formaram nódulos nas plantas foram considerados como compatíveis com a respectiva planta. Como indicativo de que o rizóbio inoculado é um possível fixador de nitrogênio, considerou-se a persistência da cor verde escuro na parte aérea das plantas inoculadas em comparação com as testemunhas não inoculadas e com adição de nitrogênio.

### **3.8 Avaliação da eficiência na fixação simbiótica do nitrogênio dos rizóbios em plantas de *L. corniculatus* e *D. Incanum*.**

Foi realizado um experimento em casa de vegetação utilizando vasos do tipo Leonard (Vincent, 1970) contendo uma mistura de vermiculita com areia estéril (na proporção 2:1) na parte superior dos vasos e, solução nutritiva isenta de nitrogênio (Sarruge, 1975) na parte inferior do mesmo.

Sementes de *L. corniculatus* cv. São Gabriel e *D. incanum* foram desinfestadas com uma lavagem por 30 segundos com etanol (70%), uma com hipoclorito (1%) seguida de cinco lavagens com água destilada e esterilizada, pré-germinadas e plantadas nos vasos. Logo após, cada tratamento foi inoculado com um isolado de rizóbio compatível com a planta crescido em cinco mL de caldo bacteriano LM por três dias sob agitação de 120 rpm. Além dos tratamentos inoculados foram utilizados dois tratamentos controles, um sem adição de nitrogênio e outro com adição de 72 mg de nitrato de amônio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) divididos em 26 doses ao longo do experimento. Para *L. corniculatus*, além dos tratamentos já citados foi avaliado a estirpe SEMIA 816 recomendada para produção de inoculantes para esta planta.

O experimento foi conduzido por um período de 90 dias em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Após a colheita das plantas, a parte aérea das mesmas foi separada do sistema radicular com corte próximo a base do caule. As raízes foram lavadas e estas amostras acondicionadas em sacos de papel etiquetados e colocados em estufa para secagem a 60°C até atingir peso constante. Após foi determinada a massa seca da raiz e parte aérea.

Os nódulos de *D. incanum* foram contados e secos juntamente com o sistema radicular. Já os nódulos das plantas de *L. corniculatus* foram destacados contados e colocados separadamente do sistema radicular em estufa com temperatura de 60°C para determinação do peso seco. O teor de nitrogênio total na parte aérea das plantas de *L. corniculatus* foi determinado pela metodologia semi micro Kjeldhal descrita por Tedesco et al. (1995).

Devido à pouca quantidade de massa seca obtida com as plantas de *D. incanum*, o teor de nitrogênio total da parte aérea não foi determinado.

Os dados referentes ao número e à massa seca de nódulos, à massa seca da raiz e parte aérea e ao nitrogênio 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. O índice de eficiência relativa (Brockwell et al., 1966), que mede a acumulação de massa seca dos tratamentos inoculados em relação aos tratamentos controles com e sem adição de nitrogênio. Este índice foi calculado através da fórmula descrita abaixo.

$$\text{IER} = \frac{(\text{MS total tratamento} - \text{MS do T-N})}{(\text{MS do T+N} - \text{MS do T-N})} \times 100$$

onde:

MS total tratamento = Massa seca total da planta do tratamento inoculado;

MS do T-N = Massa seca total do tratamento controle sem N;

MS do T+N = Massa seca total do tratamento controle com N.

### **3.9 Caracterização genética dos Rizóbios**

Vinte e um isolados e quinze estirpes de rizóbios estudados neste trabalho quanto a compatibilidade simbiótica em plantas de *L. corniculatus*, *L. glaber*, *L. uliginosus*, *L. subbiflorus* e *Glycine max* foram caracterizados

geneticamente pelo método de amplificação do DNA genômico utilizando-se a técnica de PCR.

O DNA genômico dos rizóbios foi extraído pelo método de extração de DNA com clorofórmio. Este procedimento inicia-se a partir de uma cultura de células multiplicadas em meio LM por 72 horas a 28°C sob agitação de 120 rpm. Uma alíquota de 1,5 mL das culturas foi transferida para tubos de microcentrífuga esterilizados em autoclave por 20 minutos, os tubos foram centrifugados por três minutos a 12.000 rpm. A suspensão de células obtida foi submetida a uma lavagem com uma solução estéril de cloreto de sódio (NaCl) 1%. Logo após, as células foram homogeneizadas no vórtex em 700 µL de TES (Apêndice 1) e novamente centrifugadas por dois minutos a 12.000rpm. Os sobrenadantes foram desprezados e as suspensões de células foram homogeneizadas em 500 µL de TE1 (Apêndice 1) e 25 µL de lisozima (20mg/mL) e posteriormente incubados a 37°C por uma hora. Transcorrido este período, foi adicionado 100 µL de SDS 20% a 60°C e 5 µL de proteinase K (20 mg/mL) a cada microtubo e incubados a 60°C por 15 minutos. Logo após, foi adicionado às misturas 600 µL de clorofórmio álcool isoamílico (24:1). As suspensões foram agitadas no vórtex e centrifugadas por três minutos a 10.000 rpm. Os sobrenadantes foram transferidos para microtubos novos e adicionado 8 µL de NaCl 5M juntamente com 500 µL de isopropanol gelado. As misturas ficaram por 10 minutos no gelo e posteriormente centrifugadas por 15 minutos a 12000 rpm. Os pellets obtidos foram lavados com etanol 70% e foram secos por 1 hora à temperatura ambiente e finalmente ressuspensos em 50 µL de TE2 (Apêndice 1).

### **3.9.1 Amplificação do DNA genômico pela técnica de Rep-PCR pelo oligonucleotídeo iniciador BOX.**

Os DNAs genômicos dos isolados de rizóbios e das estirpes recomendadas foram caracterizados pela técnica de Rep-PCR que amplifica regiões conservadas e repetitivas do DNA cromossômico (Versalovic et al., 1994). O oligonucleotídeo iniciador utilizado para as reações foi o seguinte:

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

As reações de Rep-PCR foram realizadas de acordo com o protocolo de Versalovic et al. (1994) (Apêndice 2 ítem 8.1) para um volume total de 25 $\mu$ L. As condições empregadas para a programação do termociclador estão descritas no Apêndice 2 ítem 8.2.

### **3.9.2 Análise dos produtos da amplificação**

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em cuba horizontal com tampão TBE 0,5X (Sambrook et al., 2001). Como padrão de peso molecular foi utilizado o DNA do fago lambda clivado com as endonucleases de restrição *EcoRI* e *HindIII*. Os géis foram corados em solução de brometo de etídio (1  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>). A visualização dos fragmentos foi realizada em transiluminador de luz ultravioleta e documentada com equipamento de fotografia digital Kodak G2200.

O perfil de bandas no gel foi transformado em uma matriz binária, utilizando-se o programa GelPro Analyser 3.1, onde 0 (zero) indicava a

ausência de banda e 1 (um) a presença. A similaridade 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

Neste trabalho foram obtidos a partir de nódulos radiculares de plantas de *Desmodium incanum* 11 isolados de rizóbios que posteriormente foram caracterizados juntamente com os outros 24 isolados de rizóbios de *Lotus* spp. e 17 estirpes recomendadas para a produção de inoculantes nas plantas estudadas.

### 4.1 Características morfológicas dos Rizóbios

Na tabela 2 são mostradas as características das colônias dos 35 isolados estudados neste trabalho juntamente com as estirpes EEL 698, EEL 8084 e U510. Nota-se que todos os rizóbios isolados de *L. corniculatus*, *L. glaber*, *L. uliginosus* e *L. subiflorus* apresentaram o crescimento rápido, com um tempo de aparecimento de colônias variando de dois a três dias. Resultados diferentes foram obtidos por Brose (1992), Gault et al. (1994), Jarvis et al. (1997), Barrientos et al. (2002) e Tonon (2008) que afirmaram que a simbiose destas quatro espécies de *Lotus* se dá com rizóbios de crescimento intermediário (*Mesorhizobium loti*) e lento (*Bradyrhizobium* sp.).

**TABELA 2:** Características das colônias de rizóbios avaliadas neste trabalho: tempo de aparecimento de colônias de 1 mm, diâmetro da colônia após sete dias de crescimento, densidade óptica em meio de cultura Agar LM com vermelho congo e reação de pH em meio ágar LM com azul de bromotimol.

<b>Rizóbio</b>	<b>Tempo (dias)</b>	<b>Diâmetro (mm)</b>	<b>Densidade óptica</b>	<b>reação de pH</b>
<b>UFRGS Lc 10</b>	2	3	Translúcida	Ácido
<b>UFRGS Lc 14</b>	3	4	Translúcida	Ácido
<b>UFRGS Lc 22</b>	3	3	Translúcida	Ácido
<b>UFRGS Lc 36</b>	2	6	Translúcida	Ácido
<b>UFRGS Lc 322</b>	2	8	Translúcida	Ácido
<b>UFRGS Lc 336</b>	3	2	Opaca	Ácido
<b>UFRGS Lc 340</b>	2	3	Translúcida	Ácido
<b>EEL 698</b>	3	8	Translúcida	Ácido
<b>EEL 8084</b>	3	6	Translúcida	Ácido
<b>U 510</b>	3	6	Translúcida	Ácido
<b>UFRGS Lg 109</b>	3	5	Translúcida	Ácido
<b>UFRGS Lg 111</b>	3	3	Opaca	Ácido
<b>UFRGS Lu 2</b>	3	3	Opaca	Ácido
<b>UFRGS Lu 8</b>	3	3	Opaca	Ácido
<b>UFRGS Lu 9</b>	3	2	Opaca	Ácido
<b>UFRGS Lu 10</b>	3	3	Opaca	Ácido
<b>UFRGS Lu 12</b>	3	2	Opaca	Alcalino
<b>UFRGS Lu 13</b>	5	2	Opaca	Ácido
<b>UFRGS Lu 14</b>	3	3	Opaca	Ácido
<b>UFRGS Lu 19</b>	3	2	Opaca	Ácido
<b>UFRGS Ls 1</b>	3	2	Opaca	Ácido
<b>UFRGS Ls 8</b>	3	2	Opaca	Ácido

**Continuação: TABELA 2:** Características das colônias de rizóbios avaliadas neste trabalho: tempo de aparecimento de colônias de 1 mm, diâmetro da colônia após sete dias de crescimento, densidade óptica em meio de cultura Agar LM com vermelho congó e reação de pH em meio ágar LM com azul de bromotimol.

<b>Rizóbio</b>	<b>Tempo (dias)</b>	<b>Diâmetro (mm)</b>	<b>Densidade óptica</b>	<b>reação de pH</b>
<b>UFRGS Ls 22</b>	3	2	Opaca	Ácido
<b>UFRGS Ls 28</b>	3	2	Opaca	Ácido
<b>UFRGS Ls 36</b>	3	2	Opaca	Ácido
<b>UFRGS Ls 59</b>	3	2	Opaca	Ácido
<b>UFRGS Ls 62</b>	3	2	Opaca	Ácido
<b>UFRGS Di 1</b>	6	1	Opaca	Neutro
<b>UFRGS Di 2</b>	6	1	Opaca	Alcalino
<b>UFRGS Di 3</b>	7	1	Opaca	Alcalino
<b>UFRGS Di 4</b>	7	1	Opaca	Neutro
<b>UFRGS Di 5</b>	7	1	Opaca	Ácido
<b>UFRGS Di 6</b>	7	1	Opaca	Ácido
<b>UFRGS Di 7</b>	6	1	Opaca	Alcalino
<b>UFRGS Di 8</b>	7	1	Opaca	Neutro
<b>UFRGS Di 9</b>	7	1	Opaca	Alcalino
<b>UFRGS Di 10</b>	6	1	Opaca	Ácido
<b>UFRGS Di 11</b>	7	1	Opaca	Neutro

Já os isolados de rizóbios de plantas de *D. incanum* apresentaram o crescimento lento, com o tempo de aparecimento de colônias de aproximadamente sete dias. A característica de crescimento lento tem sido atribuída ao gênero *Bradyrhizobium* (Somasegaran & Hoben, 1994). Estes

resultados concordam com o trabalho de Gu et al. (2007) que mostraram que os rizóbios simbiontes de *Desmodium* pertenciam ao gênero *Bradyrhizobium*.

#### **4.2 Resistência ao choque salino em meio de cultura com 1, 2 e 3% de cloreto de sódio (NaCl).**

Para que o processo de Fixação biológica do nitrogênio seja eficiente faz-se necessário que sejam selecionadas estipes nativas adaptadas às condições edafoclimáticas. Assim, pode-se obter um inoculante mais competitivo capaz de se estabelecer mais rapidamente no solo e tolerar melhor condições adversas do ambiente como a salinidade do solo (Medeiros 2007).

O resultado da avaliação da resistência dos isolados de rizóbios ao choque salino em concentrações de 1, 2 e 3 % de cloreto de sódio (NaCl) pode ser observado na Tabela 3. Todos os isolados bacterianos estudados neste trabalho foram capazes de crescer em meio de cultura ágar LM com adição de 1% de NaCl, mas, somente os isolados UFRGS Ls 1 e UFRGS Lu 2 cresceram na concentração de 2% e, nenhum isolado bacteriano cresceu em 3%. No estudo realizado por Freitas et al. (2007) sobre a diversidade dos rizóbios de solos salinos de Pernambuco (Brasil), os rizóbios estudados cresciam de maneira normal em concentração de até 1,2% de NaCl. A partir desta concentração estes rizóbios começaram a apresentar resistência com decréscimo significativo no crescimento bacteriano. Esta resistência a concentrações de cloreto de sódio acima de 1,2% também foi observada por Hua et al. (1982), Martins et al., (1997), Ohwada et al. (1998), Medeiros et al. (2007) e Singh et al. (2008).

**TABELA 3:** Resistência dos Rizóbios ao choque salino em meio de cultura LM com concentrações de cloreto de sódio de 1, 2 e 3%.

Rizóbios	Concentração de NaCl			Rizóbios	Concentração de NaCl		
	1%	2%	3%		1%	2%	3%
UFRGS Lc 10	+	-	-	UFRGS Lu 19	+	-	-
UFRGS Lc 14	+	-	-	UFRGS Ls 1	+	+	-
UFRGS Lc 22	+	-	-	UFRGS Ls 8	+	-	-
UFRGS Lc 36	+	-	-	UFRGS Ls 22	+	-	-
UFRGS Lc 322	+	-	-	UFRGS Ls 28	+	-	-
UFRGS Lc 336	+	-	-	UFRGS Ls 36	+	-	-
UFRGS Lc 340	+	-	-	UFRGS Ls 59	+	-	-
EEL 698	+	-	-	UFRGS Ls 62	+	-	-
EEL 8084	+	-	-	UFRGS Di 1	+	-	-
U 510	+	-	-	UFRGS Di 2	+	-	-
UFRGS Lg 109	+	-	-	UFRGS Di 3	+	-	-
UFRGS Lg 111	+	-	-	UFRGS Di 4	+	-	-
UFRGS Lu 2	+	+	-	UFRGS Di 5	+	-	-
UFRGS Lu 8	+	-	-	UFRGS Di 6	+	-	-
UFRGS Lu 9	+	-	-	UFRGS Di 7	+	-	-
UFRGS Lu 10	+	-	-	UFRGS Di 8	+	-	-
UFRGS Lu 12	+	-	-	UFRGS Di 9	+	-	-
UFRGS Lu 13	+	-	-	UFRGS Di 10	+	-	-
UFRGS Lu 14	+	-	-	UFRGS Di 11	+	-	-

+: Isolado que cresceu na concentração de sal analisada (resistente); -: Isolado que não cresceu na concentração de sal analisada (sensível)

### 4.3 Produção de auxinas e sideróforos pelos rizóbios

Entre os rizóbios estudados neste trabalho, somente cinco isolados produziram auxinas, o que corresponde a aproximadamente 18% do total dos isolados de rizóbios estudados (Tabela 4). A produção deste fito-hormônio pelos rizóbios pode promover o crescimento das plantas, melhorando o desenvolvimento e o rendimento destas (Osório Filho, 2009). Trabalhos realizados por Biswas et al. (2000), Schlindwein et al. (2008) e Vargas et al. (2009) mostraram que rizóbios produtores de auxinas, podem melhorar o desenvolvimento de plantas de arroz, alface e trevo branco respectivamente.

A Tabela 4 mostra que 31% dos isolados apresentaram a capacidade de produzir sideróforos. Sideróforos são compostos orgânicos de baixo peso molecular que possuem alta afinidade por  $Fe^{3+}$ , sendo produzidos por diversos microrganismos sob condições de indisponibilidade deste no ambiente, tornando-o disponível para a planta (Silveira, 2009).

Uma das maneiras de contornar o problema de escassez de ferro no ambiente é o uso de rizobactérias produtoras de sideróforos via inoculação. Muitos trabalhos realizados mostram grande variabilidade na quantidade de rizóbios estudados produtores de sideróforos. Entre estes estão os estudos realizados por Antoun & Beauchamp (1998) que verificaram que 86% dos isolados de *Rhizobium leguminosarum* estudados em seu trabalho produziram sideróforos. Já os trabalhos realizados por Derylo et al. (1994) e Vargas et al. (2009) mostraram que somente 10% dos 84 isolados de rizóbios estudados e 8% dos 252 rizóbios avaliados produziram sideróforos respectivamente.

**TABELA 4:** Produção de ácido indol acético (AIA) e sideróforos pelos rizóbios estudados.

<b>Isolado</b>	<b>Auxinas</b>	<b>Sideróforo</b>	<b>Isolado</b>	<b>Auxinas</b>	<b>Sideróforo</b>
<b>UFRGS Lc 10</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>UFRGS Lu 19</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>UFRGS Lc 14</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>UFRGS Ls 1</b>	<b>-</b>	<b>+</b>
<b>UFRGS Lc 22</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>UFRGS Ls 8</b>	<b>+</b>	<b>-</b>
<b>UFRGS Lc 36</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>UFRGS Ls 22</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>UFRGS Lc 322</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>UFRGS Ls 28</b>	<b>-</b>	<b>+</b>
<b>UFRGS Lc 336</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>UFRGS Ls 36</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>UFRGS Lc 340</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>UFRGS Ls 59</b>	<b>-</b>	<b>+</b>
<b>EEL 698</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>UFRGS Ls 62</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>EEL 8084</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>UFRGS Di 1</b>	<b>-</b>	<b>+</b>
<b>U 510</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>UFRGS Di 2</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>UFRGS Lg 109</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>UFRGS Di 3</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>UFRGS Lg 111</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>UFRGS Di 4</b>	<b>-</b>	<b>+</b>
<b>UFRGS Lu 2</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>UFRGS Di 5</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>UFRGS Lu 8</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>UFRGS Di 6</b>	<b>-</b>	<b>+</b>
<b>UFRGS Lu 9</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>UFRGS Di 7</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>UFRGS Lu 10</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>UFRGS Di 8</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>UFRGS Lu 12</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>UFRGS Di 9</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>UFRGS Lu 13</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>UFRGS Di 10</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>UFRGS Lu 14</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>UFRGS Di 11</b>	<b>+</b>	<b>-</b>

**+**: Produtor de ácido indol-acético e ou sideróforos; **-**: Não produtor de ácido indol-acético e sideróforos.

#### 4.4 Avaliação da compatibilidade simbiótica dos rizóbios com as plantas estudadas

A Tabela 5 mostra a inoculação dos 11 isolados de rizóbios obtidos de nódulos de *D. incanum* em plantas de *D. incanum*, *L. corniculatus*, *L. uliginosus*, *L. glaber*, *L. subbiflorus* e *Glycine max* (FEPAGRO RS 10). Somente o isolado UFRGS Di 9 e a estirpe SEMIA 6028 induziram a formação de nódulos em mais de uma planta: com *D. incanum* e *L. corniculatus*. No entanto, esta simbiose não foi eficiente, pois o desenvolvimento e a coloração da parte aérea das plantas, em comparação com as do tratamento controle sem inoculação e com adição de nitrogênio, mostraram sinais de deficiência de nitrogênio.

As demais estirpes de rizóbios estudadas neste trabalho SEMIA 6208 e SEMIA 6209 recomendadas para a produção de inoculantes para *D. ovalifolium*, e SEMIA 656 recomendada para *D. incanum* não formaram nódulos em nenhuma das espécies de plantas estudadas, o que sugere que estas bactérias tem uma alta especificidade pela planta hospedeira.

As plantas de *L. uliginosus*, *L. glaber*, *L. subbiflorus* e *Glycine max* (FEPAGRO RS 10) não apresentaram nodulação quando inoculadas com os isolados e as estirpes de rizóbios de *D. incanum*. Este fato sugere que não existe compatibilidade entre os rizóbios e estas plantas. Esta incompatibilidade pode ser favorável ao desenvolvimento destas plantas, pois a formação de simbiose ineficiente com rizóbios nativos prejudica o desenvolvimento destas plantas nas áreas em que estas são introduzidas (Fernandes et al., 2003).

**TABELA 5:** Avaliação da capacidade de induzir nodulação (Nod) e fixação simbiótica de nitrogênio (Fix) de estirpes e isolados de rizóbios de plantas de *D. incanum* quando inoculados em plantas de *D. incanum*, *L. corniculatus*, *L. uliginosus*, *L. glaber*, *L. subbiflorus* e *Glycine max*.

	Leguminosas hospedeiras									
	<i>D. incanum</i>		<i>Lotus corniculatus</i>		<i>Lotus uliginosus</i>		<i>Lotus subbiflorus</i>		<i>Glycine max</i>	
	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix
	<b>Estirpes</b>									
SEMIA 6208	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SEMIA 6209	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SEMIA 6028	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
SEMIA 656	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<b>Isolados de rizóbios de plantas de <i>D. incanum</i></b>									
UFRGS Di 1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Di 2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Di 3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Di 4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Di 5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Di 6	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Di 7	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Di 8	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Di 9	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Di 10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Di 11	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

+: isolado Formador de nódulos e ou fixador de nitrogênio; -: Isolado não formador de nódulos e ou não fixador de nitrogênio.

Os resultados da inoculação dos rizóbios isolados de plantas de *L. corniculatus* em plantas de *D. incanum*, *L. corniculatus* e *L. uliginosus* podem ser observados na Tabela 6. Estes isolados e estirpes quando inoculados em plantas de *L. uliginosus* somente quatro rizóbios induziram a formação de nódulos nesta planta, o que corresponde a 40% dos rizóbios testados, mas somente um destes isolados apresentaram a capacidade de fixar nitrogênio simbioticamente. O trabalho realizado por Baraibar et al. (1999) mostrou resultados diferentes, pois foi observado que os rizóbios isolados de *L. corniculatus* não induziam a formação de nódulos em plantas de *L. uliginosus* mas sim, somente com *L. glaber*.

Quando estes rizóbios foram inoculados em plantas de *D. incanum*, apenas o isolado UFRGS Lc 336 foi capaz de induzir a formação de nódulos (Tabela 6). Mas este isolado não foi eficiente na fixação biológica do nitrogênio, pois o desenvolvimento da parte aérea das plantas mostrou-se prejudicado em relação ao tratamento não inoculado e com adição de nitrogênio. Estes resultados mostram a existência de baixa compatibilidade simbiótica entre os rizóbios nativos simbiontes de plantas de *L. corniculatus* e as plantas de *D. incanum*, indicando assim, que um grupo pouco diverso de rizóbios que possui a capacidade de induzir nodulação nestas plantas.

As estirpes SEMIA 816, SEMIA 806 e SEMIA 808 recomendadas para a produção de inoculantes no Brasil e U 510 recomendada no Uruguai para inoculação em plantas de *L. corniculatus*, mostraram-se altamente específicas, estabelecendo simbiose somente com as plantas em que são recomendadas.

**TABELA 6:** Avaliação da capacidade de induzir nodulação (Nod) e fixação simbiótica de nitrogênio (Fix) de estirpes e rizóbios isolados de plantas de *L. corniculatus* quando inoculados em plantas de *D. incanum*, *L. corniculatus* e *L. uliginosus*.

Rizóbios	Leguminosas hospedeiras					
	<i>Desmodium</i>		<i>Lotus</i>		<i>Lotus</i>	
	<i>incanum</i>		<i>corniculatus</i>		<i>uliginosus</i>	
	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix
<b>Estirpes</b>						
U510	-	-	+	+	-	-
SEMIA 816	-	-	+	+	-	-
SEMIA 806	-	-	+	+	-	-
SEMIA 808	-	-	+	+	-	-
<b>Isolados de rizóbios de <i>L. corniculatus</i></b>						
UFRGS Lc10	-	-	+	+	+	-
UFRGS Lc14	-	-	+	+	-	-
UFRGS Lc 22	-	-	+	+	-	-
UFRGS Lc 36	-	-	+	+	+	-
UFRGS Lc 269	-	-	+	+	-	-
UFRGS Lc 322	-	-	+	+	-	-
UFRGS Lc 336	+	-	+	+	+	+
UFRGS Lc 340	-	-	+	+	+	-

+: isolado simbiote ou fixador de nitrogênio; -: Isolado não simbiote ou não fixador de nitrogênio.

Os isolados de rizóbios de plantas *L. uliginosus* foram os menos específicos, pois induziram a formação de nódulos nas quatro espécies de *Lotus* e em *D. incanum* estudadas neste trabalho (Tabela 7).

**TABELA 7:** Avaliação da capacidade de induzir nodulação (Nod) e fixação simbiótica de nitrogênio (Fix) de estirpes e rizóbios isolados de plantas de *L. uliginosus* quando inoculados em plantas de *D. incanum*, *L. corniculatus*, *L. uliginosus*, *L. subbiflorus* e *L. glaber*.

Leguminosas Hospedeiras										
Rizóbio	<i>Desmodium</i>		<i>Lotus</i>		<i>Lotus</i>		<i>Lotus</i>		<i>Lotus</i>	
	<i>incanum</i>	<i>corniculatus</i>	<i>uliginosus</i>	<i>subbiflorus</i>	<i>glaber</i>	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod
<b>Estirpes</b>										
EEL8084	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
SEMIA 822	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<b>Isolados de rizóbios de <i>L. uliginosus</i></b>										
UFRGS Lu 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
UFRGS Lu 8	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
UFRGS Lu 9	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
UFRGS Lu 10	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
UFRGS Lu 12	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
UFRGS Lu 13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
UFRGS Lu 14	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-
UFRGS Lu 19	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-

+: Isolado simbiote ou fixador nitrogênio; -: Isolado não-simbiote ou não fixador de nitrogênio.

Sete isolados de rizóbios de *L. uliginosus* apresentaram a capacidade de realizar simbiose com plantas de *D. incanum* (90%), sete em plantas de *L. corniculatus* (90%), oito em plantas de *L. subbiflorus* (100%) e sete com plantas de *L. glaber* (90%). Esta simbiose foi eficiente, pois a maioria das plantas inoculadas, que estabeleceram simbiose com o isolado de rizóbio,

apresentou o desenvolvimento e a coloração da parte aérea semelhante a testemunha nitrogenada e sem inoculação, podendo assim, ser um isolado de rizóbio fixador de nitrogênio para a respectiva planta.

Os isolados de rizóbios UFRGS Lu 2, UFRGS Lu 9, UFRGS Lu 10, UFRGS Lu 12 e UFRGS Lu 13 mostraram-se inespecíficos, pois foram capazes de induzir a formação de nódulos em *D. incanum* e nas quatro espécies de *Lotus* estudadas. Destacando o isolado UFRGS Lu 2 que além de formar nódulos fixou nitrogênio eficientemente nestas plantas. Entre as estirpes recomendadas para *L. uliginosus* testadas, a SEMIA 822 foi capaz de estabelecer simbiose na planta em que esta é recomendada. E a estirpe EEL 8084, da estação experimental de Lages (SC), induziu a formação de nódulos e fixou nitrogênio em plantas de *L. corniculatus* e *L. uliginosus*.

Os resultados sobre a inoculação dos rizóbios de *L. subbiflorus* em plantas de *D. incanum*, *L. corniculatus*, *L. uliginosus*, *L. subbiflorus* e *L. glaber* podem ser visualizados na Tabela 8. Todos os rizóbios isolados de plantas de *L. subbiflorus* e a estirpe EEL 698 induziram a formação de nódulos radiculares e fixar nitrogênio em simbiose com as plantas de *D. incanum*.

Os isolados de rizóbios UFRGS Ls 1 e UFRGS Ls 59, apresentaram baixa especificidade pela planta hospedeira, pois induziram a formação de nódulos em *D. incanum* e nas quatro espécies de *Lotus* estudadas (Tabela 8). Mas estes isolados não fixaram nitrogênio para todas as plantas em que foram inoculados. O isolado de rizóbio UFRGS Ls 1 foi ineficaz em plantas de *L. glaber* e o rizóbio UFRGS Ls 59 fixou o nitrogênio atmosférico somente em plantas de *D. incanum*.

**TABELA 8:** Avaliação da capacidade de induzir nodulação (Nod) e fixação simbiótica de nitrogênio (Fix) de estirpes e rizóbios isolados de plantas de *L. subbiflorus* quando inoculados em plantas de *D. incanum*, *L. corniculatus*, *L. uliginosus*, *L. subbiflorus* e *L. glaber*.

Leguminosas Hospedeiras										
	<i>D. incanum</i>		<i>Lotus corniculatus</i>		<i>Lotus uliginosus</i>		<i>Lotus subbiflorus</i>		<i>Lotus Glaber</i>	
Rizóbio	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix
<b>Estirpes</b>										
<b>EEL 698</b>	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
<b>SEMIA 848</b>	-	-	-	-	NA	NA	+	+	-	-
<b>Isolados de rizóbios de <i>L. subbiflorus</i></b>										
<b>UFRGS Ls 1</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<b>UFRGS Ls 8</b>	+	+	-	-	NA	NA	+	+	-	-
<b>UFRGS Ls 22</b>	+	+	+	-	NA	NA	+	+	-	-
<b>UFRGS Ls 28</b>	+	+	-	-	NA	NA	+	+	-	-
<b>UFRGS Ls 36</b>	+	+	+	-	NA	NA	+	+	+	-
<b>UFRGS Ls 59</b>	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-
<b>UFRGS Ls 62</b>	+	+	+	-	NA	NA	+	+	-	-

**NA:** Isolado não testado na referida planta; **+**: isolado simbiote ou fixador de nitrogênio; **-**: isolado não-simbiote ou não fixador de nitrogênio.

A estirpe recomendada para inoculação em plantas de *L. subbiflorus* SEMIA 848 estabeleceu simbiose eficiente somente com as plantas em que são recomendadas, sugerindo alta especificidade entre planta hospedeira-rizóbio.

Em plantas de *L. corniculatus*, aproximadamente 70% dos isolados de rizóbios de *L. subbiflorus* estudados induziram a formação de nódulos, mas

somente o isolado UFRGS Ls 1 e a estirpe EEL 698 fixaram nitrogênio nesta planta (Tabela 8). Em plantas de *L. glaber*, 42% destes isolados induziram a formação de nódulos, mas nenhum fixou nitrogênio atmosférico. Tonon (2008) também mostrou que poucos dos rizóbios isolados de *L. subbiflorus* estudados em seu trabalho estabeleceram simbiose eficiente com plantas de *L. glaber*.

Os resultados obtidos com a inoculação dos rizóbios isolados de plantas de *L. glaber* em plantas de *D. incanum*, *L. corniculatus*, *L. uliginosus*, *L. subbiflorus* e *L. glaber* são mostrados na Tabela 9. Somente dois isolados e uma estirpe desta simbiotes desta espécie foram inoculadas nas plantas estudadas. Estes isolados de rizóbios apresentaram a capacidade de realizar simbiose eficiente nas plantas em que foram isolados e em plantas de *L. uliginosus*.

**TABELA 9:** Avaliação da capacidade de induzir nodulação (Nod) e fixação simbiótica de nitrogênio (Fix) de estirpes e rizóbios isolados de plantas de *L. glaber* quando inoculados em plantas de *D. incanum*, *L. corniculatus*, *L. uliginosus*, *L. subbiflorus* e *L. glaber*.

Rizóbio	Leguminosas Hospedeiras										
	<i>Desmodium</i>		<i>Lotus</i>		<i>Lotus</i>		<i>Lotus</i>		<i>Lotus</i>		
	<i>incanum</i>	Fix	<i>corniculatus</i>	Fix	<i>uliginosus</i>	Fix	<i>subbiflorus</i>	Fix	<i>glaber</i>	Fix	
<b>Estirpes</b>											
<b>SEMIA 830</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<b>Isolados de rizóbios de <i>L. glaber</i></b>											
<b>UFRGS Lg 109</b>	-	-	-	-	+	+	NA	NA	+	+	
<b>UFRGS Lg 111</b>	-	-	-	-	+	+	NA	NA	+	+	

**NA:** Isolado não testado na respectiva planta; **+**: isolado simbiote ou fixador de nitrogênio; **-**: isolado não-simbiote ou não fixador de nitrogênio.

Devido ao baixo número de rizóbios de *L. glaber* estudados, não foi possível fazer conclusões mais abrangentes sobre estes. Contudo, Hernández et al. (2005) supõem que os isolados de rizóbios de plantas de *L. glaber* estabeleceriam simbiose também com plantas de *L. corniculatus*, o que contraria os resultados obtidos neste trabalho, onde a simbiose foi formada com plantas de *L. uliginosus*.

Devido ao alto número de isolados de rizóbios estudados neste trabalho possuem características do gênero *Bradyrhizobium*, a avaliação da inoculação das estirpes liberadas para a produção de inoculantes para soja (*Glycine max*) no Brasil também foi avaliada. Estas estirpes foram inoculadas soja, *D. incanum*, *L. corniculatus* e *L. subbiflorus*, e os resultados desta inoculação podem ser visualizados na Tabela 10.

**TABELA 10:** Avaliação da capacidade de induzir nodulação (Nod) e fixação simbiótica de nitrogênio (Fix) de estirpes para soja (*G. Max*) quando inoculadas em plantas de *D. incanum*, *L. corniculatus* e *L. subbiflorus*.

Estirpes	Leguminosas hospedeiras							
	<i>Glycine max</i>		<i>Desmodium incanum</i>		<i>Lotus corniculatus</i>		<i>Lotus subbiflorus</i>	
	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix
<b>SEMIA 587</b>	+	+	-	-	-	-	-	-
<b>SEMIA 5019</b>	+	+	-	-	-	-	-	-
<b>SEMIA 5079</b>	+	+	-	-	-	-	-	-
<b>SEMIA 5080</b>	+	+	-	-	-	-	-	-

+: isolado simbiote ou fixador de nitrogênio; -: isolado não-simbiote ou não fixador de nitrogênio.

Nota-se que as estirpes recomendadas para soja foram altamente específicas, pois não induziram a formação de nódulos em nenhuma das leguminosas forrageiras estudadas neste trabalho.

Com base nos resultados obtidos anteriormente, nota-se que com exceção da estirpe recomendada para plantas de *D. incanum* SEMIA 6028, que estabeleceu simbiose com plantas de *D. incanum* e *L. corniculatus*, as estirpes SEMIA estudadas neste trabalho são específicas, já que, entre as plantas estudadas, estas estirpes só realizaram simbiose com as plantas nas quais são recomendadas. Algumas destas estirpes também foram estudadas por Tonon (2008) que também mostrou alta especificidade pela planta hospedeira.

#### **4.5 Avaliação da eficiência na fixação simbiótica do nitrogênio dos rizóbios em plantas de *L. corniculatus* e *D. incanum*.**

Em experimento em casa de vegetação com plantas de *D. incanum* foram avaliados o número de nódulos, a massa seca das raízes e da parte aérea das plantas (Tabela 11). O nitrogênio total acumulado na parte aérea não foi calculado, pois a massa seca das plantas inoculadas não atingiu o peso necessário para a realização dos testes.

As análises estatísticas do número de nódulos obtido nos tratamentos mostraram três grupos com diferenças significativas. O primeiro grupo, com a maior quantidade de nódulos, é formado pelos isolados UFRGS Di 9 e UFRGS Di 11. O segundo grupo, é formado pelos isolados UFRGS Di 3, UFRGS Di 4, UFRGS Di 5 e UFRGS Lu 2. E o terceiro grupo, com o menor

número de nódulos, estão os isolados UFRGS Di 2, UFRGS Ls 1, UFRGS Lu 13, UFRGS Lc 336 e a estirpe EEL 698.

**TABELA 11:** Número de nódulos, massa seca (MS) da raiz e da parte aérea (PA) das plantas *Desmodium intanum* inoculadas com rizóbios e cultivadas em casa de vegetação.

Tratamento	Num. de nódulos	MS da raiz (mg)	MS da PA (mg)
<b>T + N</b>	---	12,56 a	26,33 a
<b>UFRGS Di 2</b>	4,75 c	16 a	40,00 a
<b>UFRGS Di 4</b>	19,75 b	14,62 a	37,25 a
<b>UFRGS Ls1</b>	6,25 c	14,83 a	30,5 a
<b>UFRGS Lu 13</b>	5,25 c	20,50 a	27,00 a
<b>EEL 698</b>	6 c	16,87 a	33,00 a
<b>UFRGS Lu 2</b>	18,25 b	12,12 a	28,00 a
<b>UFRGS Di 9</b>	26 a	13,62 a	22,75 b
<b>UFRGS Di 11</b>	30 a	12,00 a	16,75 b
<b>UFRGS Di 3</b>	16,75 b	7,87 a	17,37 b
<b>UFRGS Lc 336</b>	6 c	11,00 a	17,75 b
<b>UFRGS Di 5</b>	15 b	9,75 a	20,00 b
<b>UFRGS Di 8</b>	16 b	11,17 a	20,33 b
<b>T – N</b>	---	8,56 a	15,22 b

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5%.

Estas análises mostraram que não houve diferenças significativas nos resultados de massa seca das raízes. Já a análise dos resultados de massa seca da parte aérea destas plantas separou os tratamentos em dois grupos. O primeiro grupo, que obteve os melhores resultados, é formado pelos

tratamentos inoculados com os rizóbios UFRGS Ls 1, EEL 698, UFRGS Lu 2, UFRGS Lu 13 e UFRGS Di 2 e UFRGS Di 4, no qual as plantas apresentaram um bom desenvolvimento da parte aérea com massa seca semelhante à testemunha nitrogenada, sendo um indicativo que a fixação biológica do nitrogênio foi eficiente. O segundo grupo é formado pelos tratamentos inoculados com os rizóbios UFRGS Di 3, UFRGS Di 5, UFRGS Di 8, UFRGS Di 9, UFRGS Di 11 e UFRGS Lc 336, que apresentaram o desenvolvimento e a massa seca da parte aérea das plantas de *D. incanum* inoculadas semelhante à testemunha sem adição de nitrogênio, indicando que a fixação biológica do nitrogênio não foi eficiente.

Quanto à massa seca da parte aérea dos tratamentos inoculados com os rizóbios do primeiro grupo, obteve-se uma média de 32,5 miligramas, já o segundo grupo, obteve uma média de 18,6 miligramas. Estes números são muito inferiores aos resultados obtidos por Rheinheimer et al. (1997) e Silva et al. (2001) que, em experimento com vasos e solo, conduzido por um período de 60 dias, obtiveram uma massa seca da parte aérea das plantas de *Desmodium* superior a 2 gramas.

A maioria dos rizóbios isolados de plantas de *D. incanum* (aproximadamente 70%) não foi eficiente na fixação biológica do nitrogênio atmosférico nestas plantas, prejudicando o desenvolvimento da parte aérea em relação à testemunha com adição de nitrogênio. Ainda assim, as plantas inoculadas com o isolado UFRGS Di 2 obtiveram a maior massa seca da parte aérea e a quantidade de nódulos muito pequena (Tabela 11). Uma pequena quantidade de nódulos implica em um menor desgaste fisiológico da planta

para a formação destes, e ainda assim, sendo capaz de suprir o nitrogênio necessário da planta inoculada. O contrário foi observado com as plantas inoculadas com o isolado UFRGS Di 11, que apresentaram grande quantidade de nódulos e a parte aérea destas plantas obtiveram um desenvolvimento inferior.

O isolado UFRGS Lc 336 isolado de nódulos de plantas de *L. corniculatus* não fixou o nitrogênio atmosférico eficientemente. Este isolado de rizóbio já foi identificado anteriormente por Osório Filho (2009) como pertencente à espécie *Bradyrhizobium japonicum*, concordando com o trabalho realizado por Gu et al. (2007) que relatam que a maioria dos rizóbios simbiossintetizantes de plantas de *Desmodium* pertenciam a este gênero bacteriano.

Na Tabela 12 são mostrados os resultados da produção de massa seca da parte aérea e da raiz, massa seca e número de nódulos, nitrogênio total acumulado e também a eficiência relativa da fixação biológica do nitrogênio em relação à massa seca da parte aérea das plantas de *L. corniculatus* cultivadas em experimento realizado em casa de vegetação.

Em relação ao número de nódulos radiculares formados nas plantas de *L. corniculatus* observou-se o maior número foi obtido nas plantas inoculadas com a estirpe SEMIA 816, seguido pelo tratamentos formados pelas plantas inoculadas com a estirpe EEL 698 e com os isolados de rizóbios UFRGS Lu 2, UFRGS Lu 13, UFRGS Ls 1. Já as plantas inoculadas com o isolado UFRGS Lc 336 e UFRGS Di 9 foram as que apresentaram o menor número de nódulos (Tabela 12).

**TABELA 12:** Massa seca (MS) e número de nódulos, massa seca da raiz, da parte aérea por tratamento e nitrogênio (N) total por planta de *L. corniculatus* inoculadas com os rizóbios e cultivadas em casa de vegetação e eficiência relativa da inoculação dos rizóbios nestas plantas.

Tratamento	Num. de nódulos	MS dos nódulos (mg)	MS da raiz (mg)	MS da Parte aérea (mg)	N total por planta (mg)	Eficiência relativa
T+N	----	----	1065,5 a	1008,5 a	5,63 c	----
SEMIA 816	538,5 a	109,5 a	627,25 b	1120,25 a	14,22 a	115%
UFRGS Lu 2	280,5 b	83,5 b	335,25 c	992,75 a	12,53 a	103,1%
EEL 698	290,25 b	71,5 b	365 c	875 a	10,1 b	80,16%
UFRGS Lc 336	155 c	36 c	182,5 c	337,75 b	2,41 d	17,47%
UFRGS Ls 1	231 b	51,5 c	189,25 c	332,5 b	2,63 d	14,4%
UFRGS Lu 13	334 b	53,25 c	221 c	454,75 b	2,48 d	14,01%
UFRGS Di 9	143,75 c	40,75 c	292,25 c	265 b	1,31 d	8,40%
T- N	----	----	304,75 c	207,25 b	0,57 d	----

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste estatístico de Scott-Knott a 5%.

Ainda em relação á massa seca dos nódulos, a Tabela 12 mostra que a média de nódulos dos tratamentos de *L. corniculatus* foi de 280 gerando uma massa seca de aproximadamente 63 miligramas. Os resultados do trabalho de Frizzo (2007), também com plantas de *L. corniculatus*, mostraram a formação de em média 40 nódulos, com massa seca de 82 mg. A análise destes resultados sugere que foram formados muitos nódulos pequenos e ineficientes nas plantas inoculadas. Este fenômeno já foi observado anteriormente em outros trabalhos com Brose (1992) em plantas de *L. corniculatus*, Giongo (2003) em plantas de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), Laguerre et al. (2003), Maâtallah et al. (2002) e Fontoura (2008) em plantas de *L. glaber* e *L. subbiflorus*.

Dentre os rizóbios inoculados nas plantas de *L. corniculatus* destaca-se estirpe liberada para a produção de inoculantes no Brasil SEMIA 816 com maior número e massa seca dos nódulos, 538.5 e 109.5 miligramas respectivamente (Tabela 12). O isolado UFRGS Lc 336 foi o que o que obteve os menores resultados de número e massa seca dos nódulos entre os isolados analisados, com 143,75 e 40,75 miligramas respectivamente. Os resultados obtidos por Barrientos et al. (2002) com isolados de rizóbios autóctones de regiões do Chile, mostraram que media da quantidade de nódulos em plantas de *L. corniculatus* muito inferior, sendo de aproximadamente de apenas dois nódulos, sendo esta, ineficiente na fixação do nitrogênio para a planta.

Ainda na Tabela 12, observa-se que os rizóbios inoculados que fixaram mais eficientemente o nitrogênio nas plantas de *L. corniculatus* foram a estirpe SEMIA 816, liberada para a produção de inoculantes no Brasil, e o

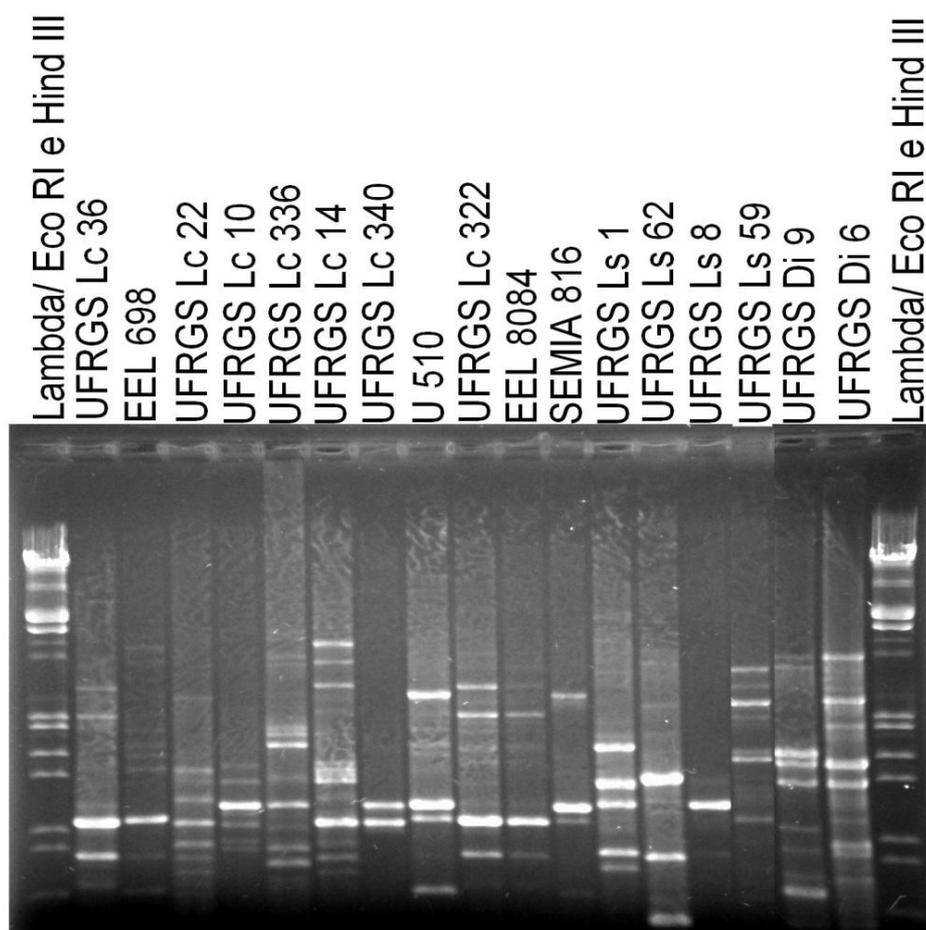
isolado UFRGS Lu 2, obtido de plantas de *L. uliginosus*. Resultados semelhantes foram obtidos por Frizzo (2007) onde a estirpe SEMIA 816 em plantas de *L. corniculatus*, foi a mais eficiente na fixação simbiótica do nitrogênio nestas plantas. Os tratamentos inoculados com os isolados UFRGS Di 9, UFRGS Lc 336, UFRGS Lu 13 e UFRGS Ls 1 apresentaram as mais baixos valores de nitrogênio acumulado na parte aérea das plantas, sendo semelhantes ao obtido no tratamento controle não inoculado e sem adição de nitrogênio, indicando que esta simbiose não foi eficiente

Os resultados de eficiência relativa da inoculação dos rizóbios em plantas de *L. corniculatus* em relação á massa seca das plantas mostraram que o melhor rizóbio testado foi a estirpe SEMIA 816 com 115% de eficiência na fixação simbiótica do nitrogênio atmosférico, seguido pelo isolado de *L. uliginosus* UFRGS Lu 2 com 103,1% e a estirpe EEL 698 com 80,16%. A inoculação dos demais tratamentos mostrou-se ineficiente, pois estes geraram uma eficiência inferior a 20%, destacando os rizóbios UFRGS Di 9, isolado de plantas de *D. incanum*, e UFRGS Lc 336 que obtiveram eficiência de somente 8,4% e 17,4% respectivamente.

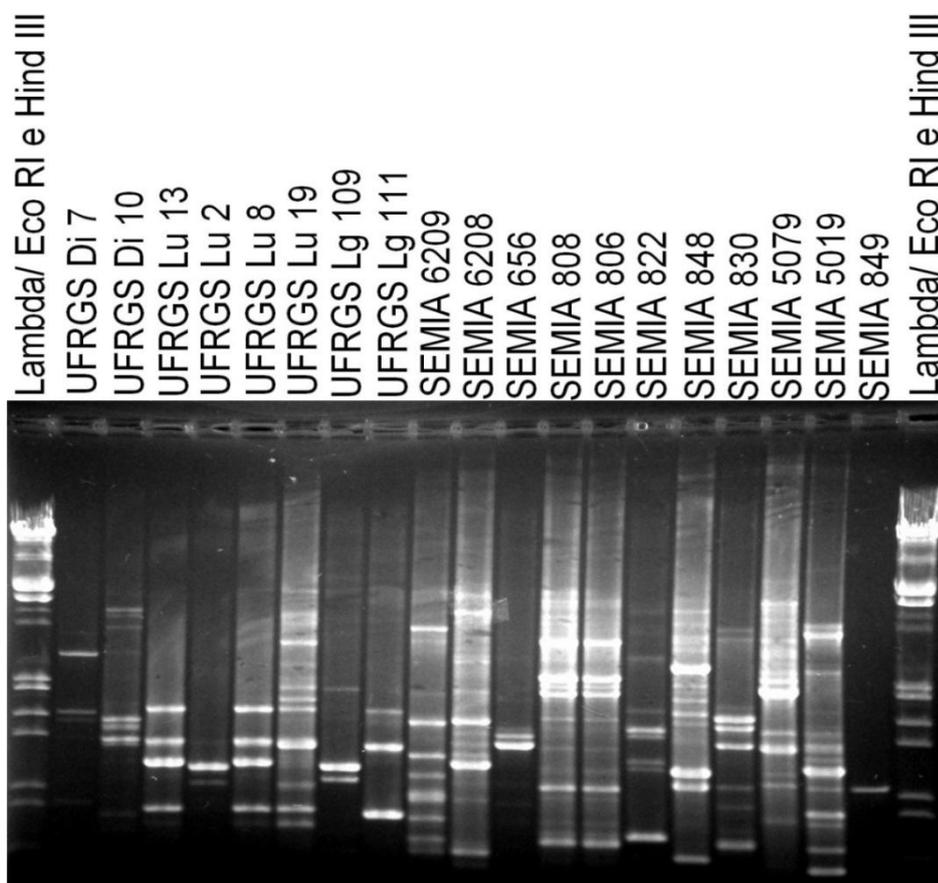
#### **4.6 Análise da variabilidade dos isolados de rizóbios pela técnica de Rep-PCR utilizando o oligonucleotídeo iniciador BOX A1**

Neste trabalho a técnica de Rep-PCR BOX foi utilizada para avaliação da diversidade genética dos rizóbios autóctones do Rio Grande do Sul simbioses de espécies as *L. corniculatus*, *L. subbiflorus*, *L. uliginosus*, *L. glaber*, *D. incanum* e *Glycine max* e as estirpes recomendadas para estas plantas.

O perfil eletroforético dos produtos de amplificação do DNA genômico de 21 isolados e 15 estirpes estudadas podem ser visualizados nas figuras 1 e 2. O tamanho dos fragmentos de DNA analisados no perfil eletroforético dos produtos de amplificação variou entre 5000 até 200 pares de bases, dependendo do isolado avaliado. Perfis eletroforéticos com semelhante faixa de peso molecular dos fragmentos foram obtidos por Fontoura (2008) que observaram que a faixa de variação dos produtos de amplificação dos rizóbios simbioss de plantas de *L. corniculatus*, *L. uliginosus*, *L. glaber* e *L. subbiflorus* ficou entre 5.000 pb a 500 pb.



**FIGURA 1:** Foto do perfil eletroforético em gel de agarose dos fragmentos da amplificação do DNA genômico por Rep-PCR BOX de 13 isolados e quatro estirpes de rizóbios estudados neste trabalho.



**FIGURA 2:** Foto do perfil eletroforético em gel de agarose dos fragmentos da amplificação do DNA genômico por Rep-PCR BOX de oito isolados e 11 estirpes de rizóbios estudados neste trabalho.

Gu et al. (2007) já demonstraram uma grande variabilidade dos isolados e estirpes de rizóbios de *Desmodium*, utilizando-se de outra técnica de avaliação da variabilidade: o PCR-RFLP. Neste mesmo trabalho, o sequenciamento do DNA 16S dos rizóbios confirmaram que os isolados pertenciam a gêneros distintos, entre eles vários *Bradyrhizobium* sp.

Os perfis mostram uma grande variabilidade entre os isolados no que se refere ao peso molecular das bandas. Vale ressaltar que esta grande variabilidade era esperada, já que os rizóbios estudados eram simbioses de

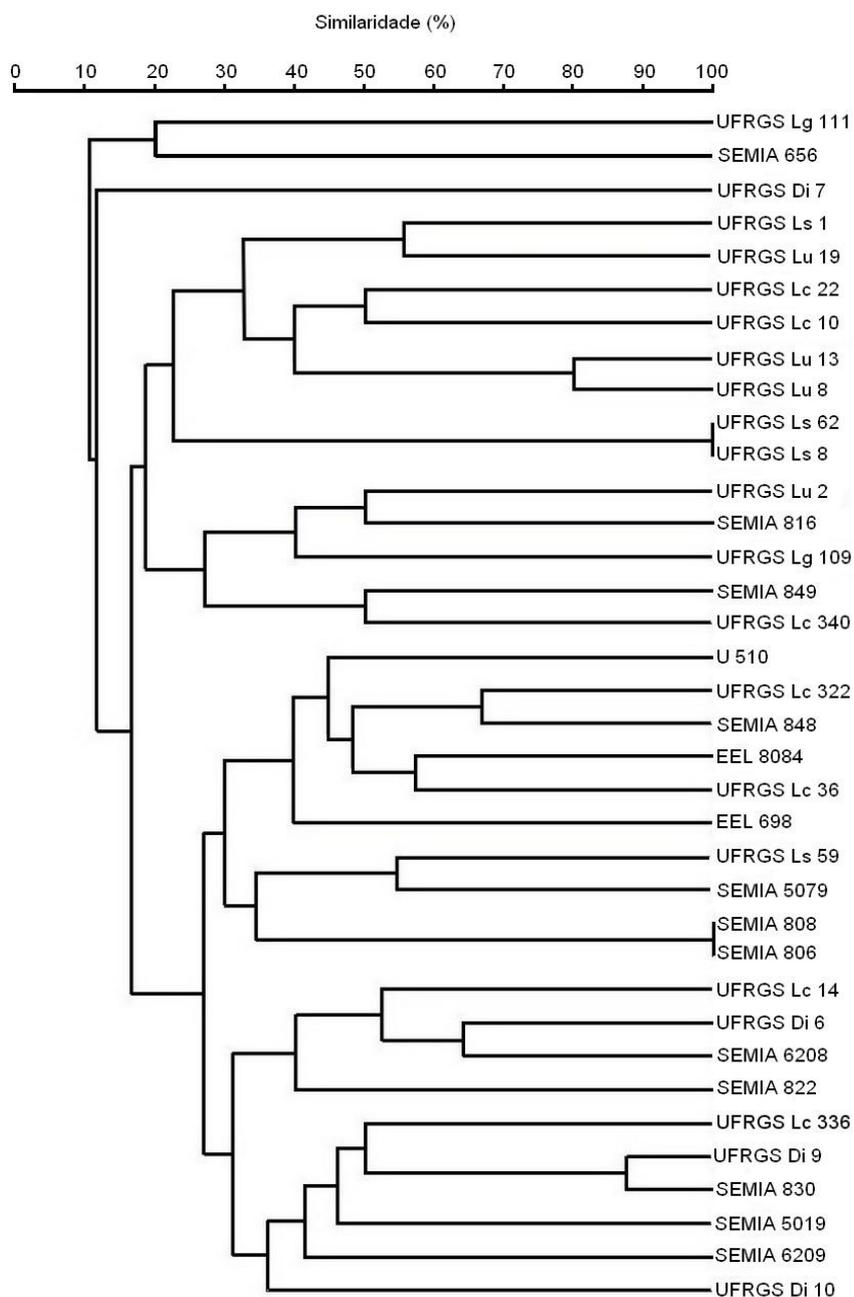
seis espécies diferentes de plantas e ainda, possuem características morfológicas e de crescimento das colônias bem diferenciadas, como mostrados nos resultados expressos anteriormente.

No trabalho desenvolvido por Fontoura (2008) com rizóbios isolados de plantas da espécie *L. subbiflorus*, e Frizzo (2007) com plantas de *L. corniculatus*, as técnicas de Rep-PCR BOX e Rep-PCR ERIC mostraram perfis eletroforéticos bem distintos, gerando um dendograma de similaridade em torno de 30% entre os rizóbios.

O dendograma gerado pelo perfil eletroforético obtido com o produto da amplificação do DNA genômico pela técnica de Rep-PCR BOX é mostrado na figura 3. Nota-se uma baixa similaridade entre os isolados de rizóbios estudados, indicando poucos grupos com similaridade superior a 50%.

Nota-se que dois isolados de *L. subbiflorus* UFRGS Ls 8 e UFRGS Ls 62 apresentaram 100% de similaridade por esta técnica de PCR, fato ocorrido igualmente com as duas estirpes recomendadas para *L. corniculatus* SEMIA 808 e SEMIA 806. Analisando a inoculação dos dois primeiros isolados nota-se uma diferença no comportamento dos mesmos, pois o isolado UFRGS Ls 62 foi capaz de estabelecer simbiose com plantas de *L. corniculatus* e o isolado UFRGS Ls 8 não (Tabela 8).

Alguns isolados apresentaram semelhança superior a 80% entre si, este é o caso do rizóbio UFRGS Di 9 e a estirpe SEMIA 830 recomendada para produção de inoculantes em plantas de *L. glaber*, e os isolados UFRGS Lu 8 e UFRGS Lu 13. O rizóbio UFRGS Di 7 foi o menos semelhante entre os isolados estudados



**FIGURA 3:** Dendrograma de genotipagem de 36 estirpes e isolados de rizóbios estudados neste trabalho. Agrupamento obtido por UPGMA, utilizando-se o coeficiente de Jaccard, para perfil de bandas obtido a partir da PCR com o oligonucleotídeo iniciador BOX A1.

O isolado e a estirpe que apresentaram melhor eficiência relativa na fixação biológica do nitrogênio em plantas de *L. corniculatus* no experimento realizado em casa de vegetação, UFRGS Lu 2 e SEMIA 816 (*Mesorhizobium loti* (Toledo et al., 2009)), formaram um pequeno grupo de similaridade de aproximadamente 50%. Já os isolados que não fixaram nitrogênio atmosférico eficientemente em plantas de *L. corniculatus* UFRGS Lc 336, UFRGS Lu 13, UFRGS Ls 1 E UFRGS Di 9 mostraram perfil eletroforético de bandas do DNA completamente distintos, mostrando similaridade entre si de aproximadamente 30%.

As tabelas de inoculações dos rizóbios e as leguminosas forrageiras demonstradas neste trabalho mostram uma grande diversidade no que se relaciona a rizóbio - planta hospedeira, não sendo capaz de formar de grupos de compatibilidade. O dendograma dos produtos de amplificação pela técnica de Rep-PCR BOX ilustrado na figura 3 demonstra esta grande variabilidade entre os isolados e estirpes analisadas, confirmando a inexistência de relação entre a formação de grupos de inoculação e a variabilidade genética do DNA total das bactérias.

## 5.CONCLUSÕES

Existem rizóbios autóctones dos solos do Rio Grande do Sul que apresentam baixa especificidade hospedeira sendo capazes de formar simbiose com plantas de *D. incanum*, *L. corniculatus*, *L. subbiflorus*, *L. glaber* e *L. uliginosus*.

Os rizóbios autóctones dos solos do Rio Grande do sul isolados de plantas de *D. incanum* apresentam alta especificidade hospedeira.

Os rizóbios estudados neste trabalho apresentam compatibilidade simbiótica em diferentes hospedeiros, dificultando o estabelecimento de grupos de compatibilidade hospedeira.

Os rizóbios estudados neste trabalho são sensíveis a salinidade.

A técnica de REP-PCR com o oligonucleotídeo iniciador BOX A1 mostrou que existe variabilidade entre os rizóbios estudados, sendo estes, diferentes das estirpes fornecidas pelas coleções de cultura.

## 6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGIUS, F.; SANGUINETTI, C.; 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.

ANTOUN, H. & BEAUCHAMP, C. J. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). – **Plant and Soil**, v. 204 p. 57-67, 1998.

ARGUDO, M.; LITTLE, I.; SHEARER, R.; JOHNSON, N.; DIXON, R. The NifL-NifA system: a multi domain transcriptional regulatory complex that integrate environmental signals. **Journal Bacteriology**, v.186, p.601–610, 2004.

ARRUDA, J. S.; LOPES, N. F.; BACARIN, M. A. Nodulação e fixação de dinitrogênio em soja tratada com sulfentrazone - **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vol. 36, n.2, p. 325-330, 2001.

ASGHAR, H. N.; ZAHIR, Z. A.; ARSHAD, M.; KHALIQ, A. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth-promoting activities in *Brassica juncea* L.. – **Biology Fertility of Soils**, v. 35, p. 231-237, 2002.

AYALA, W.; BERMÚDEZ, R. e FERRÉS, S. *Lotus Maku*: em los 90 uma promessa...hoj uma firme realidade. Revista del Plan Agropecuario, INIA-Treinta y Trés, Uruguay, p.46-50, 2003. Online. Disponível 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.; 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.

BARRETT, C. F. & PARKER, M. A. Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus*, and *Rhizobium* sp nodule bacteria on two *Mimosa* spp. in Costa Rica. - **Applied Environmental Microbiology**, v. 72, p. 1198–1206, 2006.

BARRIENTOS, L.; HIGUERA, M.; ACUÑA, H.; GUERRERO, J.; ORTEGA, F.; SEGUEL, I. Efectividad simbiótica de cepas naturalizadas de *Mesorhizobium loti* y *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) en plantas de 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.

BISWAS, J. C.; LADHA, J. K.; DAZZO, F. B. Rhizobia Inoculation Improves Nutrient Uptake and Growth of Lowland Rice - **Soil Sci. Soc. Am. Journal**, vol. 64 p.1644–1650, 2000.

BIONDO, E.; MIOTTO, S. T. S.; WITTMANN, M. T. S. Citogenética de espécies arbóreas da subfamília Caesalpinioideae – Leguminosae do sul do Brasil. – **Ciência Florestal**, v. 15, n. 3, p. 241-248, 2005.

BISWAS, J. C.; LADHA, J. K.; DAZZO, F. B., YANNI, Y. G. & ROLFE, B. G. Rhizobial Inoculation Influences Seedling Vigor and Yield of Rice - **Agronomy Journal**, vol. 92, p. 880-886, 2000.

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.

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

BURRIS, R. H. & ROBERTS, G. P. Biological nitrogen fixation. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 13, p. 317-335, 1993.

CAMPOS, B. C.; HUNGRIA, M.; TEDESCO, V. Eficiência da fixaçãobiológica do nitrogênio por estirpes de *Bradyrhizobium* na soja em plantio direto – **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 25, p. 583-592, 2001.

CANIGIA, M. V. F., 2003 – Manual de Nodulación. Disponível em: <http://www.nitragin.com.ar/Manual%20de%20nodulacion-Sept03.pdf>

CARDOSO, E. J.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. Microbiologia do Solo. Ln: Bioquímica e Fisiologia da Fixação Biológica do Nitrogênio, **Sociedade Brasileira de Ciências do Solo**, Campinas p. 141 a 155, 1992.

CARVALHO, F. G.; SELBACH, P. A.; SILVA, A. J. N. Especificidade hospedeira de variantes *Bradyrhizobium* spp em soja (CVS Peking e Clark), Caupi e Guandu. – **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 32, p. 2701-2708, 2008.

CHAPAVAL, L; OLIVINDO, C. S.; SOUZA, F. G. C.; ALVES, F. S. F.; FROTA, I. M. A. Detecção de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* pela técnica de Rep-PCR no monitoramento da qualidade do leite de cabra em sala de ordenha. – **Comunicata Scientiae**, vol. 1, n. 1, p. 49 – 56, 2010.

CHEN L. S.; FIGUEREDO A.; PEDROSA F. O.; HUNGRIA M. Genetic characterization of soybean rhizobia in Paraguay. **Applied Environmental Microbiology** v. 66, p. 5099–5103, 2000.

CHEN W.M.; LAEVENS S.; LEE T.M.; COENYE T.; VOS P.D.; MERGEAY M.; VANDAMME P. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of cystic fibrosis patients. **Int J Syst Evol Microbiology**. v. 51, p. 1729–1735, 2001.

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, 2000.

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.

DERYLO, M.; CHOMA, A.; PUCHALSKI, B.; SUCHANEK, W. Siderophore activity in *Rhizobium* species isolated different legumes. – **Acta-Biochem-Pol.**, v. 41, n. 1, p. 7-11, 1994.

EADY, R. R. Structure-function relationships of alternative nitrogenases. **Chemical Revist.**, v. 96, p. 3013-3030, 1996.

FAGAN, E. B.; MEDEIROS, S. L. P.; MANFRON, P. A.; CASAROLI, D.; SIMON, J.; DOURADO, D.; VAN LIER, Q. J.; SANTOS, O. S.; MULLER, L. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja (Revisão). – **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v. 14, n. 1, p. 89-106, 2007.

FERGUSON, S. J. Nitrogen cycle enzymology. - **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 2, p.182-193, 1998.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, M. Seleção de rizóbios nativos para guandu, caupi e feijão-de-porco nos tabuleiros costeiros do Sergipe. - **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 7, p. 835-842, 2003.

FONTOURA, R. **Seleção de rizóbios nativos, de solos do Rio grande do Sul, para *Lotus glaber* e *Lotus subbiflorus***. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, 2008.

FRANK, B. Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. **Ber. Dtsch. Bot. Ges**, v. 7., p. 332–346, 1889.

FRED, E. B.; BALDWIN, I. L.; McCOY, E. Root nodule bacteria and leguminous plants. Madison: University of Wisconsin, 1932. 132 p. Disponível em:<<http://digital.library.wisc.edu/1711.dl/HistSciTech.RootNodule>>. Acesso em: 05 dez. de 2009.

FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, C. L.; SANTOS, C. E. R.; STAMFORD, N. P.; LYRA, M. C. P. Caracterização de rizóbios isolados de Jacatupé cultivado em solo salino do estado de Pernambuco, Brasil. – **Revista de Ciência Agronomicas**, v. 66, n. 3, p. 497-504, 2007.

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**. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de pós-graduação em Ciências do Solo, Porto Alegre, 2007.

GARCIA, E. N. & BASEGGIO, J. Poder germinativo de sementes de *Desmodium incanum* dc. (leguminosae) - **Revista Brasileira de Agrociência** v.5, n.3, p. 199-202, 1999.

GARRITY, G.M. & HOLT, J.G. The *Archaea* and the Deeply Branching and Phototrophic *Bacteria*. In G.M. Garrity (ed.), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, 2nd ed., Springer-Verlag, New York., p.427-446, 2001.

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**. Austrália, v.34, n.3, p.385-394, 1994.

GIONGO , A. **Diversidade de rizóbios nativos que nodulam feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) isolados de áreas de campo nativo sob diferentes adubações**. - Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio Grande

do Sul, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, 2003.

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

GOORMACHTIG, S.; CAPOEN, W.; HOLSTERS, M. *Rhizobium* infection: Lessons from the versatile nodulation behavior of water-tolerant legumes. – **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 11, p. 518-522, 2004.

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

GRANGE L. & HUNGRIA M. Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. **Soil Biol Biochem**, v. 36, p.1389-1398, 2004.

GU, J.; WANG, E. T.; CHEN, W. X. Genetic diversity of rhizobia associated with *Desmodium* species grown in China. - **Applied Microbiology**, v.44, p. 286-292, 2007.

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>.

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.; YODER, J. I. Molecular signals and receptors: controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. - **Ecology**, v.84, n.4, p.858-868, 2003.

HUA, S. S. T.; TSAI, V. Y.; LICHENS, G. M.; NOMA, A. T. Accumulation of amino acids in *Rhizobium* sp. Strain WR1001 in response to sodium chloride salinity. – **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, n. 1, p. 135-140, 1982.

HUBAC, C.; FERRAN, J.; GUERRIER, D. Luteolin absorption in *Rhizobium meliloti* wild-type and mutant strains. - **Journal Gen. Microbiol.**, v. 139, p. 1571–1578, 1993.

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.

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.

JORDAN, D. C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow growing root nodule bacteria from leguminous plants. - **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 32, p. 136–139, 1982.

JOURAND, P.; GIRAUD, E.; BENA, G.; SY, A.; WILLENS, A.; GILLIS, M.; DREYFUS, B.; LAJUDIE, P. *Methylobacterium nodulans* sp. Nov., for a group of aerobic, facultatively methylophilic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. - **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, v. 54, n. 6, p.2269-2273, 2004.

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.

KING, C.A. & PURCELL. B. Inhibition of N<sub>2</sub> fixation in soybean is associated with elevated ureides and amino acids. - **Plant Physiology**, v.137, p.1389-1396, 2005.

KRZYZANOWSKI, F. C. & SANTOS FILHO, L. F. Trilhagem e beneficiamento de sementes de Desmódio. - **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 6, nº 1, p. 51-60, 1983.

LAGUERRE, G.; ALLARD, M.R.; REVOY, F.; AMARGER, N. Rapid 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.; NOURA S. M.; MACHERET V.; SANJUAN J.; DROUIN P.; AMARGER N. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. **Microbiol**, v. 147, p. 981-993, 2001.

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

LOH, J. & STACEY, G. Nodulation gene regulation in *Bradyrhizobium japonicum*: a unique integration of global regulatory circuits. – **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 1, p. 10-17, 2003.

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

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

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.

MARTINS, C. M.; LOUREIRO, S. M.; SOUTO, A. A. Caracterização morfológica e avaliação da tolerância em níveis crescentes de NaCl e altas temperaturas de isolados de rizóbio de nódulos de raiz e caule de *Discolobium* spp. nativas do Pantanal Mato-Grossense. **Revista Agrícola Tropical**, p. 7-14, 1997.

MEDEIROS, E. V.; SILVA, K. J. P.; MARTINS, C. M.; BORGES, W. L. Tolerancia de bactérias fixadoras de nitrogênio provenientes de municípios do Rio Grande do Sul à temperatura e salinidade. – **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 7, n. 2, p.160-168, 2007.

MELLONI, R.; MOREIRA, F. M. S.; NÓBREGA, R. S. A.; SIQUEIRA, J. O. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi [ *Vigna unguiculata* (L.) walp] e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. – **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 30, p. 235-246, 2006.

MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. Ecologia Microbiana, In: Microorganismos Endofíticos., p. 117-139 – Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 488 págs, 1998.

MENNA P.; HUNGRIA M.; BARCELLOS F. G.; BANGEL E. V.; HESS P. N.; MARTINEZ-ROMERO E. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic Applied Microbiology** 29:315–332, 2006.

MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e Bioquímica do Solo. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 625p, 2002.

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. & 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.

NEVES, M. C. P. & RUMJANEK, N. G. Diversity and adaptability of Soybean and cowpea rhizobia in tropical soils. - **Soil Biology & Biochemistry**, vol. 29, nº 5, p.889-895, 1996.

OHWADA, T.; SASAKI, Y.; KOIKE, H.; IGAWA, K.; SATO, T. Correlation between NaCl sensitivity of *Rhizobium* bacteria and ineffective nodulation of leguminous plants. – **Bioscience Biotechnololy. Biochemistry**, v. 62, n. 11, p. 2086-2090, 1998.

OSORIO FILHO, B. **Rizóbios eficientes em Lotus como promotores de crescimento em arroz irrigado.**- Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do sul, Programa de Pós-graduação em Ciências do Solo, Porto alegre, 2009.

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.

PARKER, M. A. *Bradyrhizobia* from Wild *Phaseolus*, *Desmodium*, and *Macroptilium* Species in Northern Mexico - **Applied and Environmental Microbiology**, vol. 68, nº. 4, p. 2044–2048, 2002.

PAVANELLI, L. E. & ARAUJO, F. F. Fixação biológica de nitrogênio em soja em solos cultivados com pastagens e culturas anuais do oeste paulista. – **Jornal de Biosciencias**, v. 25, n. 1, p. 21-29, 2009.

PEREIRA, P. **Taxonomia e diversidade genética de rizóbios microssimbiontes de distintas leguminosas com base na análise polifásica (BOX-PCR e 16S RNAr) e na metodologia de MLSA.** – Tese de doutorado- Programa de pós-graduação em Microbiologia. – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RHEINHEIMER, D. S.; SANTOS, J. S. P.; KAMINSKI, J.; MAFRAN, A. L. Crescimento de leguminosas forrageiras afetado pela adição de fósforo, calagem do solo e micorrizas em condições de casa de vegetação. **Revista Ciência Rural**, v. 27, n. 4, p. 571-576, 1997.

RECOURT, K.; VAN BRUSSEL, A. A.; DRIESSEN, A. J.; LUGTENBERG, B. J. Accumulation of a nod gene inducer, the flavonoid naringenin, in the cytoplasmic membrane of *Rhizobium leguminosarum* biovar *uiciae* is caused by

the pH-dependent hydrophobicity of naringenin. **Jounal Bacteriology**, v. 171, p. 4370–4377, 1989.

RIVAS, R.; WILLEMS, A.; SUBBA-RAO, N.; MATEOS, P. F.; DAZZO, F. B.; MARTINEZ-MOLINA, E.; GILLIS, M.; VELAZQUEZ, E. Description of *Devosia neptunia* sp. nov. that nodulates and fixes nitrogen in symbiosis with *Neptunia natans*, an aquatic legume from India. **Syst Appl Microbiol.** v. 26, p. 47–53, 2003.

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

SAHGAL, M. & JOHRI, B. N. The changing face of rizophial systematics. – **Current Science**, v. 84, n.1, p.43-48, 2003.

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, S. M.; JACQUES, A. V. A.; DALL'AGNOL, M.; RIBOLDI, J.; CASTRO, S. M. J. Disponibilidade e valor nutritive de forragem de leguminosas nativas (*Adesmia* DC.) e exóticas (*Lotus* L.). – **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 3, p. 975-982, 2001.

SCHUBERT, H. Processes and properties of instant powdered foods. Food Processing Engineering, London: **Elsevier Applied Science Publisher Ltd**, p. 657–684, 1980.

SCHLINDWEIN, G; VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; AZAMBUJA, A. C.; GRANADA, C. E.; GABIATTI, N. C.; PRATES, F.; STUMPF, R. Influência da Inoculação de Rizóbios sobre a germinação e o vigor de plantulas de alface. – **Revista Científica do Centro de Ciências Rurais**, vol. 38, nº 3, p. 658-664, 2008.

SCHWYN, B. & NEILANDS, J. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analitycal Biochemistry**, v. 160, p. 47-56, 1987.

SEANEY, R. R. & HENSON, P. R. Birdsfoot trefoil. **Advances in Agronomy**, v. 22, p.119-157, 1970.

SELENSKA-POBELL; Direct and simultaneous extraction of DNA and RNA from soil. In: Ackermans A. D. L., van Elsas J. D. e de Bruijn F. D. (eds) **Molecular Microbial Ecology Manual**. Kluwer Academic, Dordrech, p.1-17, 1995.

SILVA, N. C.; FRANKE, L. B.; NABINGER, C.; BARRETO, R. Produção e partição da biomassa de *Desmodium incanum* em resposta à aplicação de fósforo. – **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n, 3, p. 541-548, 2001.

SILVA, A. F.; FREITAS, S. D. A.; STAMFORD, N. P. Efeito da inoculação de soja (cv. Tropical) com rizóbios de crescimento rápido e lento em solo ácido submetido à calagem. –**Revista Acta Scientiarum**, v. 24, n. 5, p. 1327-1333, 2002.

SILVEIRA, A. A. **Análise genética e funcional de genes relacionados com a captação de sideróforos em *Bradyrhizobium elkanii***. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Porto Alegre- RS, 2009.

SINGH, B.; KAUR, R.; SINGH, K. Characterization of *Rhizobium* strain isolated from the roots of *Trigonella foenumgraecum* (fenugreek) **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 20, p. 3671-3676, 2008.

SOMASEGARAN, P. & HOBEN, J. H. Handbook for Rhizobia: methods in legume-*Rhizobium* technology. **Springer-Verlag**, New York, 1994.

SOSTER, M. T. B.; SCHEFFER-BASSO, S. M.; DALL'AGNOL, M. Caracterização Morfofisiológica de Genótipos de Cornichão (*Lotus corniculatus* L.). - **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p.1654-1661, 2004.

STERN, M. J.; AMES, G. F.; SMITH, N. H.; ROBINSON, E. C.; HIGGINS, E. C. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. – **Cell**, v. 37, p. 1015 – 1026, 1984.

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 albescens***. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Santa Maria, RS, 2007.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. Porto Alegre: Artmed, p.449-484, 2004.

TEDESCO, M. J. et al. Análise de Solo, Plantas e outros Materiais – **Boletim Técnico - Departamento de Solos - Faculdade de Agronomia** – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995.

TLUSTY, B.; GROSSMAN, J. M.; GRAHAM, P. H. Seletion of rhizobia for prarie legumes used in restoration and reconstruction programs in Minesota. – **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 11, p. 977-983, 2004.

TOLEDO, B. F.; MARCONDES, J.; LEMOS, E. G. M. Caracterização d rizóbios recomendados para a produção de inoculantes por meio do sequenciamento parcial do *16S rRNA*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n 4, p. 384-391, 2009.

TONON, B. C. **Compatibilidade simbiótica e caracterização de rizóbios de *Lotus spp.*, isolados de solos do Rio Grande do Sul.** – Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Programa de Pós-graduação em Ciências do Solo, 2008.

TRUJILLO, M.E.; WILLEMS, A.; ABRIL, A.; PLANCHUELO, A. M.; RIVAS, R.; LUDENA, D.; MATEOS, P. F.; MARTINEZ-MOLINA, E.; VELAZQUEZ, E.; Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 1318–1327, 2005.

VALVERDE, A.; VELAZQUEZ, E.; FERNANDEZ-SANTOS, F.; VIZCAINO, N.; RIVAS, R.; GILLIS, M.; MATEOS, P. F.; MARTINEZ-MOLINA, E.; IGUAL, J. M.; WILLEMS, A. *Phyllobacterium trifolii* sp. nov. nodulating Trifolium and Lupinus in Spanish soils. - **Int Journal Systematic Evolucionary Microbiology**, v. 55, p. 1985–1989, 2005.

VANDAMME, P.; GORIS, J.; CHEN, W. M., VOS, P.; WILLEMS, A. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., Nodulate the Roots of Tropical Legumes. – **Systematic and Applied Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 507-512, 2002.

VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; SCHLINDWEIN, G.; GRANADA, C. E.; GIONGO, A.; BENEDUZI, A; PASSAGLIA, L. M. P. Occurrence of plant growth-promoting traits in clover-nodulating rhizobia strains isolated from different soils in rio grande do sul state. **Revista Brasileira de Ciencias do Solo**, v. 33, p. 1227-1235, 2008.

VERSALOVIC J.; SCHNEIDER M.; BRUIJN F. J. D.; LUPSKI J. R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods Mol. Cell. Biol.** 5, 25-40, 1994.

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.

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.

WANG, E. T.; MARTÍNEZ-ROMERO, J.; LÓPEZ, I. Rhizobium y su destacada simbiosis con plantas. Microbios en línea. Disponível em : <[www.biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap8/](http://www.biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap8/)>. Acesso em : 27 de out. de 2006.

WILLEMS A. The taxonomy of rhizobia: an overview. In: Velazquez E e Rodriguez-Barrueco C (eds) First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization. **Springer**, p. 3–14, 2007.

WILSON, J. K. Over five hundred reasons for abandoning the cross inoculation groups of legumes. **Soil Science**, v. 58, n. 1, p. 61-69, 1944.

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

ZAKHIA, F. & LAJUDIE, P. Taxonomy of Rhizobia. **Agronomie**, v. 21. n. 6, p. 569-576, 2001.

## 7. APÊNDICE 1

### 7.1. Meios de Cultura e Soluções utilizadas

#### 7.1.1 Levedura Manitol (LM) (Vincent, 1970)

Manitol .....	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O .....	0,2 g
NaCl .....	0,1 g
Extrato de Levedura .....	0,4 g
Ágar .....	15g
Água destilada .....	1L

pH da solução deve ser ajustado para 6,8.

Para a caracterização das colônia dos rizóbios adicionar 25mgL<sup>-1</sup> do corante vermelho congo. E para ver a reação de pH no meio de cultura adicionar o corante azul de bromotimol 25mgL<sup>-1</sup>.

#### 7.1.2. Soluções para a extração de DNA

**TE1:** Tris 10mM e EDTA 25mM.

**TE2:** Tris 2mM e EDTA 25mM

**TES:** Tris 10mM, EDTA 25mM e NaCl 150mM.

### 7.1.3. Solução Nutritiva (Sarruge, 1974)

<b>Macronutrientes</b>	<b>Estoque (g/L)</b>	<b>Quantidade do estoque (mL) para 1 L de Solução (100%)</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,1	1
MgSO <sub>4</sub> x 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>	0,1	1
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,04	1
Na <sub>2</sub> Mo <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	0,02	1

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. Nos experimentos é utilizado a solução nutritiva diluída a 25%

**7.1.4. Meio de Cultura de Wood & Cooper adaptado por Sá (2001)\***

<b>Composição</b>	<b>Concentração (µM)</b>
CaCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	1000
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	500
KCl	50
Fe EDTA**	25
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10
MnSO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	1
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	5
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	1
NaMoO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	25
CoCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	5
Glutamato de sódio***	1,8 g/L
Arabinose***	0,3 g/L
Galactose***	0,3 g/L
Tiamina HCl***	100 µg/L
Biotina***	250 µg/L

\* Ajustou-se o pH do meio após a autoclavagem com HCl ou NaOH 10% esterilizados por filtração; \*\* Fe EDTA foi substituído por FeCl<sub>3</sub>; \*\*\* Soluções esterilizados por filtração e adicionadas ao meio após autoclavagem.

Foi adicionado 100mM de MOPS (ácido 3-[N-morpholine] propanesulfônico), como agente tamponante.

## 8.APÊNDICE 2

### 8.1. Mistura de cada reação para o PCR com o oligonucleotídeo iniciador BOX A 1-R

Componentes	BOX A 1-R
Tampão 10X *	1X
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1 mM
dNTP (10mM)	200 µM
Taq DNA pol (5 U µL <sup>-1</sup> )	1 U
DMSO	1 µL
Oligonucleotídeo iniciador	10 Pm
Água ultra pura	

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

### 8.2. Programação do termociclador para a amplificação do DNA genômico no Rep-PCR BOX

Ciclo	Nº de repetições	Fases do ciclo
Hot start	1	95 °C - 7 min
Desnaturação	40	94 °C - 1 min
Anelamento		53 °C - 1 min
Extensão		65 °C - 8 min
Extensão final	1	65 °C - 16 min
Estoque		4 °C - α