

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

**RIZÓBIOS, PARA *Lotus* spp, RESISTENTES À ACIDEZ  
E À SALINIDADE DO SOLO**

Adriana Ferreira Martins  
(Dissertação)

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

**RIZÓBIOS, PARA *Lotus spp*, RESISTENTES À ACIDEZ  
E À SALINIDADE DO SOLO**

ADRIANA FERREIRA MARTINS  
Bióloga (PUCRS)

Dissertação apresentada como  
um dos requisitos para obtenção do  
Grau de Mestre em Ciência do Solo

Porto Alegre (RS) Brasil  
Abril de 2010



Aos meus pais, Ary e Fátima, pelos ensinamentos de respeito e justiça, e aos meus irmãos, Alexandre e Adriano, companhias incondicionais na jornada da vida, dedico essa conquista.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me conceder serenidade, saúde e a possibilidade de realizar tudo o que desejo, sempre em direção à paz.

Ao meu orientador Enilson Luiz Saccol de Sá meu agradecimento pela oportunidade, ensinamentos, dedicação e empenho na orientação deste trabalho.

Ao colega da FEPAGRO, Luciano Kayser Vargas pelos ensinamentos, paciência, amizade, colaboração na realização deste trabalho e confiança a mim dedicados.

Aos colegas, professores e funcionários do Departamento de Solos da UFRGS pelo auxílio e amizade.

Aos colegas Bruno Brito Lisboa e Gilson Schlindwein, da FEPAGRO, e aos estagiários do Laboratório de Fitopatologia e Ecologia Microbiana da FEPAGRO pela colaboração e amizade.

Aos meus pais Ary e Fátima pelo apoio e incentivo que sempre recebi, tendo sempre como conselho, a calma necessária e a obstinação por aquilo que deseja.

Aos meus irmãos Alexandre e Adriano pela amizade incondicional, pelo amor, carinho, apoio, pela ajuda em todos os momentos da minha vida, e também pelas longas conversas e desabafos.

A minha sobrinha-afilhada Giovanna pelos momentos de alegria e descontração.

Ao Flávio Pereira de Oliveira pelo amor, compreensão e apoio.

A todos os meus amigos que sempre acreditaram em mim e torceram mesmo de longe para a realização deste trabalho.

# RIZÓBIOS, PARA *Lotus* spp, RESISTENTES À ACIDEZ E À SALINIDADE DO SOLO <sup>(1)</sup>

Autora: Adriana Ferreira Martins  
Orientador: Enilson Luiz Saccol de Sá

## RESUMO

Espécies com potencial forrageiro adaptadas aos solos do Rio Grande do Sul, como *L.corniculatus*, *L.glaber*, *L.subbiflorus* e *L.uliginosus*, se destacam pela capacidade de fixação simbiótica de nitrogênio, boa produção e tolerância à acidez e baixa fertilidade dos solos. A seleção de rizóbios para *Lotus*, resistentes a baixo pH, a alumínio tóxico e à salinidade é fundamental para a implantação e aumento da produção destas leguminosas no estado. Foram avaliados 52 rizóbios da coleção de culturas da UFRGS quanto à resistência a pH 4,2 e a 50µM de alumínio tóxico em meio mínimo de Wood e Cooper (MWC) modificado e quanto à resistência a diferentes concentrações de NaCl e KCl em meio Levedura-Manitol (LM) a pH 6,8. A diversidade genética de rizóbios de *Lotus* spp foi avaliada usando-se PCR com os oligonucleotídeos iniciadores BOX A1-R, ERIC e RISA, sendo o perfil eletroforético dos produtos da amplificação do DNA genômico de cada rizóbio analisado e construído um dendrograma de similaridade. Entre os isolados resistentes a pH 4,2 e a 50µM de Al<sup>3+</sup>, sete foram avaliados quanto à eficiência simbiótica com plantas em casa de vegetação. Entre os rizóbios estudados, 16 foram resistentes a pH 4,2 e a 50µM de alumínio, 11 foram resistentes até concentrações de 12gL<sup>-1</sup> de NaCl e seis foram resistentes até a 20gL<sup>-1</sup> de KCl. Foram selecionados rizóbios para *Lotus* spp resistentes à acidez e ao estresse salino. Observou-se alta diversidade genética, indicando que os rizóbios estudados não são reisolamentos de estirpes utilizadas em inoculantes para as espécies de *Lotus* estudadas.

<sup>(1)</sup>Dissertação de Mestrado em Ciência do Solo, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. (81p.) abril, 2010.

## RHIZOBIA, FOR *Lotus* spp, RESISTANT ACID AND SALINITY SOIL<sup>(1)</sup>

Author: Adriana Ferreira Martins

Adviser: Enilson Luiz Saccol de Sá

### ABSTRACT

Species with forage potential adapted to the soils from the state of Rio Grande do Sul, such as *L.corniculatus*, *L.glaber*, *L.subbiflorus* and *L.uliginosus*, stand out for their capacity of symbiotic nitrogen fixation, good production and tolerance to acid and low-fertility soils. Selection of rhizobia that are resistant a low pH, aluminum toxicity and salinity, is fundamental to establishing and increasing the production of to *Lotus* legumes in this state. In the present research, 52 rhizobia, from the culture collection of UFRGS, were assessed for resistance to pH 4.2 and 50µM of aluminum in modified minimal Wood and Cooper medium (MWC), and for resistance to different concentrations of NaCl and KCl in yeast mannitol medium (LM) at pH 6.8. The genetic diversity of *Lotus* spp rhizobia was assessed by using PCR with the primers BOX-A1 R, ERIC and RISA. The electrophoretic profile of the PCR products from each rhizobium was analyzed and a dendrogram of similarity was built. Among the isolates that were resistant to pH 4.2 and 50µM of Al<sup>3+</sup>, seven were assessed for symbiotic efficiency with plants in the greenhouse. Among the studied rhizobia, 16 were resistant to pH 4.2 and 50µM of aluminum, 11 were resistant to concentrations of 12gL<sup>-1</sup> NaCl and six were resistant to the 20gL<sup>-1</sup> KCl. It was possible to select *Lotus* spp rhizobia resistant to acidity and salinity stress. A high genetic diversity was observed, indicating that the studied rhizobia were not reisolations of strains used in inoculants for *Lotus* species.

<sup>(1)</sup>M. Sc. Dissertation in Soil Science, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. (81p.) april, 2010.

## SUMÁRIO

	Página
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	03
2.1. Simbiose entre rizóbios e leguminosas.....	03
2.2. Características do gênero <i>Lotus</i> .....	05
2.3. Fatores que interferem na nodulação e na fixação do N <sub>2</sub> .....	07
2.3.1. Acidez do solo.....	08
2.3.2. Salinidade do solo.....	09
2.4. Produção de melanina.....	11
2.5. Produção de sideróforos.....	12
2.6. Germinação e desenvolvimento de plântulas.....	15
2.7. Variabilidade genética dos isolados de rizóbios.....	16
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	18
3.1. Resistência dos rizóbios a pH 4,2.....	19
3.2. Resistência dos rizóbios a alumínio tóxico.....	20
3.3. Resistência dos rizóbios a estresse salino por alta concentração de cloreto de sódio e de cloreto de potássio.....	21
3.4. Produção de melanina.....	22
3.5. Produção de sideróforos.....	23
3.6. Avaliação da eficiência dos rizóbios na fixação simbiótica de nitrogênio.....	24
3.7. Avaliação da influência dos rizóbios na germinação e no vigor de plântulas.....	25
3.8. Caracterização genética dos isolados de rizóbios.....	26
3.8.1. Extração do DNA genômico dos rizóbios.....	27
3.8.2. Amplificação do DNA genômico por oligonucleotídeos iniciadores BOX A1-R, ERIC e RISA.....	27
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	30
4.1. Resistência dos rizóbios a pH 4,2 e a alumínio tóxico.....	30
4.2. Resistência dos rizóbios ao estresse salino por alta concentração de cloreto de sódio e de cloreto de potássio.....	34
4.3. Produção de melanina.....	43
4.4. Produção de sideróforos.....	44
4.5. Avaliação da eficiência dos rizóbios na fixação simbiótica de nitrogênio.....	45
4.6. Avaliação dos rizóbios na germinação e no desenvolvimento de plântulas.....	49
4.7. Caracterização genética dos isolados de rizóbios.....	51
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	56
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	57
<b>7. APÊNDICES</b> .....	74



## RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Isolados de rizóbios nativos para <i>Lotus</i> spp da coleção de culturas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul estudados e localidades das amostras de solo de onde foram obtidos.....	19
2. Condutividade elétrica das diferentes concentrações de NaCl por litro de meio LM líquido.....	22
3. Condutividade elétrica das diferentes concentrações de KCl por litro de meio LM líquido.....	22
4. Características químicas do solo Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico típico coletado na Unidade de Viamão da FEPAGRO.....	25
5. Crescimento de rizóbios de <i>Lotus</i> spp em meio com pH 4,2 e com 50µM de alumínio tóxico, após sete dias de incubação em meio MWC modificado.....	31
6. Valores do pH do caldo por rizóbios de <i>Lotus</i> spp ao final do período de incubação (7 dias).....	35
7. Crescimento de rizóbios de <i>Lotus</i> spp em meio levedura-manitol com diferentes concentrações de NaCl, após sete dias de incubação.....	37
8. Crescimento de rizóbios de <i>Lotus</i> spp em meio levedura-manitol com diferentes concentrações de KCl, após sete dias de incubação.....	40
9. Número de nódulos e da massa seca de nódulos, e produção de massa seca e nitrogênio total da parte aérea de plantas de <i>Lotus corniculatus</i> L. cv. São Gabriel inoculados com isolados de rizóbios e estirpes liberadas para produção de inoculantes...	46
10. Efeito da inoculação com rizóbios sobre a germinação e o desenvolvimento de plântulas de <i>Lotus corniculatus</i> L. cv. São Gabriel.....	50

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Regressão linear das diferentes concentrações de NaCl e de KCl, em meio levedura e manitol, sobre os isolados e estirpes de rizóbios de <i>Lotus</i> spp.....	43
2. Índice de eficiência relativa na fixação simbiótica de nitrogênio em plantas de <i>Lotus corniculatus</i> inoculadas com isolados de rizóbios e estirpes SEMIA 806 e SEMIA 816 (Médias comparadas pelo teste de Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade).....	48
3. Exemplos de géis contendo o perfil eletroforético de bandas do produto da amplificação do DNA genômico por PCR com o oligonucleotídeo iniciador BOX A 1-R.....	51
4. Exemplos de géis contendo o perfil eletroforético de bandas do produto da amplificação do DNA genômico por PCR com os oligonucleotídeos iniciadores ERIC (ERIC1-R e ERIC-2).....	52
5. Exemplos de géis contendo o perfil eletroforético de bandas do produto da amplificação do DNA genômico por PCR com os oligonucleotídeos iniciadores RISA (SD-Bact-1522-bS-20 e LD-Bact-132-aA-18).....	53
6. Dendrograma de genotipagem de estirpes e isolados de rizóbios, autóctones em solos do Rio Grande do Sul, simbiotes em quatro espécies de <i>Lotus</i> . Agrupamento obtido pelo coeficiente de Jaccard, para perfil de bandas obtido a partir da PCR com os oligonucleotídeos iniciadores BOX A1-R, ERIC e RISA.....	54

## RELAÇÃO DE APÊNDICES

	Página
1. Meio extrato de levedura, manitol, ágar – LMA (Vincent, 1970).....	75
2. Composição do meio de cultura MWC.....	76
3. Meio triptona levedura – TY (Somasegaram e Hoben, 1994).....	77
4. Meio extrato de levedura e manitol – LM (Vincent, 1970).....	78
5. Solução de brometo hexadeciltrimetilamonio (HDTMA) 10mM.....	79
6. Solução Férrica ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1mM e HCl 0,01N).....	79
7. Meio de King B – KMB (King et al., 1954).....	80
8. Meio de Murashige e Skoog (1962) – MS.....	81

## 1. INTRODUÇÃO

No Rio Grande do Sul, a produção estacional de plantas forrageiras impõe aos pecuaristas uma considerável redução na produtividade, já que a carga animal é regulada pela situação predominante no verão, época de maior pico de desenvolvimento das pastagens nativas. Uma das alternativas utilizadas pelos produtores para assegurar a produção animal, sem desconsiderar a importância das espécies nativas, é a introdução de leguminosas exóticas hibernais que, além de produzirem forragem de boa qualidade, atuam como melhoradoras do solo, pela sua capacidade de fixação biológica de nitrogênio.

Entre as leguminosas com grande potencial forrageiro encontram-se algumas espécies do gênero *Lotus*, como *L. corniculatus*, *L. glaber*, *L. subbiflorus* e *L. uliginosus*. Estas espécies apresentam uma série de vantagens, como a boa produção de forragem, boa adaptação a solos de baixa fertilidade, tolerância a solos ácidos e capacidade de fixação simbiótica de nitrogênio, além de não provocar o timpanismo em animais ruminantes, o que tornam estas leguminosas importantes para o estudo e introdução em áreas de pecuária do Rio Grande do Sul.

A simbiose entre as leguminosas e rizóbios pode suprir grande parte ou a totalidade do nitrogênio necessário ao desenvolvimento e produtividade das leguminosas. Entretanto, para que isto ocorra, a leguminosa deve estar eficientemente nodulada pelo rizóbio específico. A nodulação é dependente de uma série de fatores envolvendo a leguminosa, o rizóbio, o solo e a interação dos três. A ação conjunta desses fatores poderá limitar ou estimular a nodulação o que irá se refletir sobre a quantidade de N<sub>2</sub> fixado e sobre a

produtividade da leguminosa. Dentre os principais fatores abióticos que afetam o potencial da fixação biológica de nitrogênio encontram-se a acidez e toxidez de alumínio, a salinidade e a baixa fertilidade do solo.

O pH do solo constitui um dos principais fatores limitantes na fixação de nitrogênio pelas leguminosas, devido ao retardamento ou supressão da formação de nódulos. A acidez do solo vem normalmente associada com toxidez de alumínio e baixa disponibilidade de nutrientes essenciais para a simbiose. A acidez dos solos do Sul do Brasil, associada a uma grande concentração de alumínio, representa um sério problema para adaptação de diferentes vegetais e microrganismos.

Alguns solos que apresentam risco de desertificação, são ameaçados por uma possível salinização. Nos casos que está prevista a utilização de leguminosas forrageiras em locais afetados por este problema, torna-se necessário avaliar os efeitos da salinidade nos rizóbios a introduzir, dado que, nestas condições, a produtividade agrícola vai depender da capacidade do sistema simbiótico rizóbio-leguminosa tolerar os aumentos da salinidade do solo.

Logo, os rizóbios precisam lidar com os estresses ambientais e, entre muitas características, conseguir apresentar resistência a baixo pH e alumínio tóxico, assim como a salinidade, conseguindo, portanto, induzir a nodulação e realizar a fixação do nitrogênio atmosférico. Assim, a seleção de isolados de rizóbios, para *Lotus*, que possuam alta capacidade fixadora de nitrogênio, resistência à acidez e ao alumínio tóxico, e resistência à salinidade, é fundamental para a produção e utilização de inoculantes pelos agricultores para o incremento na produção desta leguminosa no Estado.

Este trabalho se baseou na hipótese de que rizóbios, para *Lotus* spp, resistentes à acidez e à salinidade do solo podem ser isolados de solos do Rio Grande do Sul e ser capazes de induzir nodulação e fixar nitrogênio em simbiose mesmo em solos ácidos.

Os objetivos deste trabalho foram selecionar e avaliar, entre os isolados de rizóbios nativos para plantas de *Lotus* spp, da coleção de culturas da UFRGS, aqueles resistentes a pH baixo, elevados teores de  $Al^{3+}$  tóxico e à alta salinidade; e avaliar a eficiência na fixação simbiótica de nitrogênio destes rizóbios oriundos de solos agrícolas do Rio Grande do Sul.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Simbiose entre rizóbios e leguminosas

O nitrogênio é considerado um dos nutrientes mais limitantes para o crescimento de plantas no seu ambiente natural. Mesmo este sendo extremamente abundante na atmosfera terrestre, com cerca de 79% de gás dinitrogênio (N<sub>2</sub>) (Simms e Taylor, 2002). Assim, a introdução do nitrogênio atmosférico, via fixação biológica do nitrogênio, tem efeitos positivos no ambiente e na economia (Silva, 2006).

Na natureza, bactérias fixadoras de nitrogênio são capazes de reduzir nitrogênio atmosférico à amônia. Esse processo, chamado de fixação biológica do nitrogênio, é realizado pela enzima nitrogenase, um complexo protéico que catalisa a reação (Simms e Taylor, 2002; Silva, 2006; Silva et al., 2006). A enzima nitrogenase é composta por duas unidades básicas: uma ferro-proteína que coleta a força redutora e energia e outra ferro-molibdênio, proteína que coleta e reduz o substrato (Moreira e Siqueira, 2006; Fagan et al., 2007).

Dentre as associações entre bactérias fixadoras de nitrogênio e plantas, a que ocorre entre bactérias denominadas rizóbios e leguminosas é a mais conhecida. Os gêneros como *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Azorhizobium*, fazem parte do grupo dos rizóbios capazes de induzir a formação de nódulos em diversas espécies de leguminosas. As leguminosas quando em associação com os rizóbios formam estruturas em suas raízes, denominadas nódulos, nos quais ocorre o processo de fixação do nitrogênio atmosférico que é utilizado pela planta para o seu desenvolvimento.

A formação dos nódulos é um processo complexo que ocorre em várias etapas e envolve mudanças fisiológicas e morfológicas, tanto na célula hospedeira, quanto na bactéria. As mudanças na bactéria visam o recebimento de fontes de carbono da planta hospedeira, para prover o ATP e poder redutor necessários para o processo de fixação biológica do nitrogênio, enquanto que as mudanças na planta hospedeira visam assimilar a amônia produzida pelas bactérias (Hungria e Campo, 2005; Silva, 2006).

O estabelecimento da simbiose depende das seguintes etapas fundamentais: pré-infecção – reconhecimento dos simbioses e interações entre superfícies das bactérias e da planta; infecção da planta pela bactéria e formação do nódulo; funcionamento dos nódulos – fixação de nitrogênio. Essas etapas podem variar em função dos genótipos da planta e do rizóbio envolvido, bem como de fatores ambientais.

O reconhecimento inicial dos simbioses é realizado por meio de moléculas exsudadas pela planta que ativam os genes de nodulação (genes *nod*) da bactéria. Uma vez ativados, começa a ocorrer a síntese dos chamados fatores *nod* que induzem o início do processo de infecção no hospedeiro o qual leva à nodulação, desempenhando papel importante na especificidade hospedeira. No processo de aderência estão envolvidos diferentes tipos de polissacarídeos extracelulares e moléculas com propriedades antigênicas de reação cruzada, capazes de promover o reconhecimento dos parceiros da simbiose, garantindo a interação física entre si. Muitas espécies de rizóbio produzem microfibrilas celulósicas que servem para ancorar a bactéria à superfície radicular, permitindo reações bioquímicas que desencadeiam encurvamento do pêlo radicular e a penetração. O processo de infecção pode ser através da epiderme ou de pêlos radiculares, sendo com ou sem cordão de infecção, ocasionando multiplicação das bactérias ao redor do pêlo, ligação das bactérias ao pêlo, encurvamento dos pêlos, infecção seletiva do hospedeiro, formação e crescimento do cordão de infecção e liberação das bactérias nas células do córtex (Freire, 1992; Simms e Taylor, 2002; Haynes et al., 2004; Matiru e Dakora, 2004; Moreira e Siqueira, 2006).

Genes do hospedeiro, especificamente expressos durante a formação e funcionamento dos nódulos, denominados “genes de nodulinas” levam à produção de nodulinas, proteínas vegetais que se acumulam nos

nódulos e têm funções específicas no processo de fixação biológica do nitrogênio. Neste processo estão envolvidas as nodulinas mais conhecidas como a leghemoglobina e enzimas envolvidas no processo de assimilação do nitrogênio fixado como a glutamina sintetase e o glutamato sintase. A leghemoglobina tem a importante função de transportar oxigênio em taxas suficientes para o metabolismo aeróbio dos bacteróides, sem excessos que possam inibir a atividade da nitrogenase (Simms e Taylor, 2002; Moreira e Siqueira, 2006).

O rizóbio, sob a forma de bacteróide, presente no interior de células infectadas dos nódulos radiculares de leguminosas, possui as enzimas assimilativas para a amônia; essas estão presentes em concentrações muito baixas, de modo que a amônia produzida é exportada pelo bacteróide para a célula vegetal infectada que contém grandes quantidades de enzimas assimilatórias da amônia, principalmente glutamina sintetase e glutamato sintase (Freire, 1992).

As espécies de rizóbios não produzem nodulação e fixação do nitrogênio com qualquer leguminosa, é necessário que haja um certo grau de especificidade entre os dois componentes da associação. Conseqüentemente, a nodulação é dependente de uma série de fatores envolvendo a leguminosa, o rizóbio, o solo e a interação dos três. A ação conjunta desses fatores poderá limitar ou estimular a nodulação o que irá se refletir sobre a quantidade de N<sub>2</sub> fixado e sobre a produtividade da leguminosa.

## **2.2. Características do gênero *Lotus***

Algumas espécies do gênero *Lotus*, como *L. corniculatus*, *L. glaber*, *L. subbiflorus* e *L. uliginosus*, apresentam uma série de vantagens que podem permitir o seu uso com sucesso na região sul do Brasil, como: a boa produção de forragem; o crescimento sob baixa disponibilidade de fósforo; a boa adaptabilidade a solos ácidos, além do conteúdo de tanino, que beneficia o comportamento animal, atuando como regulador do consumo, permitindo uma maior persistência da espécie. Os dados agronômicos indicam diferenças no desempenho entre e dentro de espécies, indicando a existência de variabilidade disponível para os melhoristas atuarem no sentido de buscar



adaptação a ambientes adversos. Vários mecanismos levam a planta a sobreviver e produzir sob condições adversas. No entanto, o melhoramento convencional para tolerância a estresses abióticos é uma tarefa desafiadora e lenta. Este usualmente envolve características complexas e de difícil avaliação. Como uma alternativa, a caracterização de genótipos para tolerância a determinado estresse, seguida da formação de linhas parentais contrastantes e uso de seleção assistida, pode auxiliar no desenvolvimento de genótipos tolerantes de maneira mais consistente (Santos et al., 2006).

O gênero *Lotus* L. pertence à família Fabaceae, subfamília Papilionoideae, tribo Loteae (Izaguirre e Beyhaut, 1998) e compreende de 125 a 180 espécies (Santos, 2007). Este é composto por espécies perenes e anuais, cultivadas como pastagens e para produção de feno em várias partes do mundo, sendo que muitas são citadas como espécies pioneiras, uma vez que se adaptam em solos ácidos, com baixa fertilidade e sob condições de pastejo (Maroso, 2006). As espécies do gênero estão distribuídas no mundo inteiro, com exceção das regiões árticas muito frias e áreas tropicais baixas do sudeste da Ásia, das Américas do Sul e Central (Allen e Allen, 1981; Maroso, 2006). Quatro espécies têm sido mais difundidas como forrageiras, pela sua grande representação nas regiões temperadas: *Lotus uliginosus* Schkuhr (cornichão-dos-banhados), *L. corniculatus* L. (cornichão), *L. subbiflorus* Lag. (*el Rincón*) e *L. glaber* Mill. (= *Lotus tenuis* Waldst. et. Kit. ex Wild.).

O cornichão (*L. corniculatus* L.) se destaca pela sua boa produção, tolerância a solos ácidos e de baixa fertilidade e por não provocar timpanismo (Maroso, 2006), e por possuir características incomuns à maioria das leguminosas forrageiras, como pronta formação de gemas adventícias de raízes quando a coroa é removida e a versatilidade de uso tanto para pastejo quanto para feno (Scheffer-Basso et al., 2005). No Brasil, o único cultivar disponível é o São Gabriel, desenvolvido pela Estação Experimental de São Gabriel, atual Fepagro Forrageiras, no Rio Grande do Sul, a partir de pesquisas realizadas entre 1955 e 1965, tendo seu cultivo se expandido para outros países da América do Sul (Paim, 1988; Soster et al., 2004).

Quanto ao *L. uliginosus* Schkuhr, de hábito rizomatoso, os trabalhos na região sul são mais recentes. O cv. Maku tem mostrado problemas relativos ao florescimento, restringindo seu cultivo no sul do Brasil, em razão da baixa

produção de sementes. Essa característica parece estar aliada ao florescimento esparso ou, até mesmo, à ausência de florescimento no ano de estabelecimento. Na Austrália, o interesse por essa leguminosa aumentou com o reconhecimento de suas características, como não provocar timpanismo; aumentar a absorção de aminoácidos no rúmen; ser resistente a insetos; possuir habilidade de superar as produções de trevo branco (*Trifolium repens* L.) em solos com pH inferior a 5,2; tolerar solos alagados e ser eficiente na absorção de fósforo (Scheffer-Basso et al., 2005).

*Lotus glaber* Mill. é uma forrageira perene, de crescimento prostrado que se ajusta a ambientes úmidos de clima temperado (Blumenthal e McGraw, 1999). Mendoza et al. (2005) citam que essa leguminosa tem grande importância na pastagem de campo inundado na região centro-oeste da Argentina. E essa é valorizada pelos agricultores, devido à sua capacidade de produzir forragem nutricional para bovinos em solos deficientes em nutrientes.

A espécie *Lotus subbiflorus* Lag. possui hábito semi-ereto, mas sob pastejo freqüente adota porte prostrado (Carámbula et al., 1994), é uma planta herbácea anual ou bianual (Izaguirre e Beyhaut, 1998). Adapta-se a uma ampla classe de solos (Risso e Carámbula, 1998; Ayala e Bermúdez, 2001), inclusive superficiais ácidos e de baixa fertilidade; também apresenta boa persistência sobre solos rasos (Ayala e Bermúdez, 2001). No Rio Grande do Sul tem aparecido espontaneamente em pastagens nativas, provavelmente como impureza de lotes de sementes de outras espécies importadas do Uruguai (Scheffer-Basso et al., 2002).

As espécies como *Lotus corniculatus* e *L. glaber* geralmente estabelecem associações efetivas com rizóbios das espécies do gênero *Mesorhizobium* sp. (Baraibar et al., 1999; Labandera, 2007), enquanto que espécies como *L. subbiflorus* e *L. uliginosus* o fazem preferencialmente com *Bradyrhizobium* sp. (Irisarri et al., 1996).

### **2.3. Fatores que interferem na nodulação e na fixação do N<sub>2</sub>**

Na simbiose das leguminosas com o rizóbio, o nódulo representa um abrigo para a bactéria. Porém, ao se tornar parte do sistema simbiótico, o rizóbio passa a ser afetado por qualquer fator que diminua o vigor da planta,

como deficiências nutricionais, condições ambientais sub-ótimas, entre diversos outros fatores que podem interferir no processo de nodulação e fixação do nitrogênio.

### **2.3.1. Acidez do solo**

Mais de um quarto dos solos cultiváveis do mundo são ácidos, o que torna o estudo dos mecanismos implicados na sobrevivência ao estresse ácido de grande importância para a agricultura (Muglia, 2007). Fatores da acidez do solo, como pH baixo e concentrações elevadas de alumínio tóxico, frequentemente, limitam todas as etapas do processo de infecção das raízes, formação de nódulos e assimilação do N pela planta (Pelegriin et al., 2009). Sendo assim, a capacidade dos rizóbios de se adaptarem a estas condições adversas é fundamental para o estabelecimento de uma simbiose eficiente.

O pH do solo constitui um dos principais fatores limitantes na fixação de nitrogênio pelas leguminosas, devido ao retardamento ou supressão da formação de nódulos. Seus efeitos podem ser diretos, através da influência sobre a sobrevivência da bactéria, ou indiretamente pela maior ou menor disponibilidade de nutrientes e presença de elementos tóxicos. A acidez do solo vem normalmente associada com toxidez de alumínio e manganês, baixa disponibilidade de nutrientes como cálcio, magnésio e molibdênio, essenciais para a simbiose (Vidor et al., 1983; Tsai et al., 1992).

A exposição de isolados de rizóbio à acidez diminui o crescimento, sugerindo que alguns processos citoplasmáticos da bactéria são sensíveis a esse fator. Em meio ácido ocorre uma diminuição da síntese de proteínas pelas bactérias, o que também pode afetar o crescimento bacteriano (Hara e Oliveira, 2004). O número de rizóbios em solos corrigidos chega a  $10^5$  unidades formadoras de colônia (UFC) $g^{-1}$ , enquanto que em solos ácidos esse valor não ultrapassa  $10^2$  UFC. $g^{-1}$  (Brockwell et al., 1991).

Em solos muito ácidos ocorre dissolução de alumínio, que passa a ser um componente de acidez potencial. O alumínio é, assim, causa da acidez excessiva de solos (Bohnen, 1995; Silva et al., 2006). Na maioria dos solos brasileiros, o teor de alumínio livre frequentemente atinge níveis tóxicos para as plantas, sendo muitas vezes, fator limitante ao aumento da produtividade das

culturas (Bertan et al., 2005). Nesses solos, ocorre a diminuição na disponibilidade de alguns nutrientes, como o fósforo, e aumento da disponibilidade do manganês e alumínio, os quais, dependendo do manejo do solo e da adubação utilizada, podem atingir níveis tóxicos às plantas. O alumínio determina pequeno crescimento de raízes, menor volume de solo explorado e prejuízos na absorção de água e nutrientes, o que promove redução no tamanho de folhas e na matéria seca acumulada na parte aérea (Sangoi et al., 2008). O alumínio em solos com pH baixo, geralmente menor que 5,0, provoca decomposição nas estruturas minerais da argila migrando para a fração trocável ou para a solução do solo (Bertan et al., 2005).

Os efeitos do excesso de alumínio no solo, sobre a disponibilidade do nitrogênio simbiótico para as leguminosas, podem ser divididos em: efeito inibitório sobre a formação de nódulos devido aos prejuízos físicos sobre o sistema radicular; efeito inibitório sobre a formação e funcionamento dos nódulos, devido à restrição na absorção e/ou translocação de nutrientes (Vidor et al., 1983). A tolerância de rizóbios ao pH baixo depende da habilidade em manter o pH intracelular entre 7,2 e 7,5 quando o pH externo é ácido. E em relação à tolerância ao alumínio, os mecanismos encontrados em isolados de rizóbios são: diminuição da quantidade de cargas negativas na superfície celular diminuindo a ligação com o alumínio (Bushby, 1990); elevação do pH interno da célula (O'hara et al., 1989); complexação do alumínio por polissacarídeos (Flis et al., 1993); acumulação de fosfato inorgânico no interior da célula (Mukherjee e Asanuma, 1998) neutralizando o efeito do alumínio pela formação de complexo insolúvel biologicamente não tóxico (Blamey et al., 1983).

### **2.3.2. Salinidade do solo**

A salinização do solo constitui uma das mais sérias formas de degradação dos recursos edáficos e, em áreas secas, caracteriza-se como um fenômeno complexo causado pela interação entre fatores biofísicos e sócio-econômicos (Nóbrega et al., 2004). Excessos de sais solúveis afetam mais de  $4 \times 10^6$  km<sup>2</sup> de terras potencialmente aráveis do mundo (Singleton et al., 1982).

O excesso de sais solúveis provoca uma redução do potencial

hídrico do solo (Nóbrega et al., 2004). Em geral, solos salinos contêm valores muito baixos de nitrogênio, não adequados para o cultivo da maioria das plantas (Raij, 1991; Freitas et al., 2007), comprometendo o crescimento e distribuição das raízes assim como a absorção de água e nutrientes, porque a salinidade diminui o potencial osmótico próximo à rizosfera, dificultando o fluxo dos íons até as raízes (Silva et al., 2001).

Uma solução apropriada para a situação é o cultivo da plantas capazes de fixar nitrogênio através da simbiose rizóbio-leguminosa, como por exemplo *Acacia* spp, *Vicia faba*, *Stylosanthes guianensis*, entre outras leguminosas. Entretanto, não somente a maioria das plantas, mas também os rizóbios são sensíveis à salinidade (Nogales et al., 2002; Freitas et al., 2007) tanto na fase de vida livre quanto durante o processo simbiótico (Domínguez-Ferreras et al., 2009).

Os íons tóxicos mais proeminentes em solos salinos são  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{BO}_3^{3-}$  e  $\text{HCO}_3^-$ , sendo que NaCl e KCl apresentam toxicidades semelhantes em diferentes espécies de rizóbios (Elsheikh, 1998).

Condições salinas podem limitar a simbiose afetando a sobrevivência e proliferação de rizóbios no solo e na rizosfera, inibindo o processo de infecção, afetando diretamente a função do nódulo nas raízes ou reduzindo o crescimento das plantas (Singleton et al., 1982; Singh et al., 2008). O excesso de sais podem ter um efeito negativo sobre as populações de rizóbios como resultado de toxicidade direta, bem como através de estresse tanto osmótico quanto iônico (Nogales et al., 2002; Mahmood et al., 2008). A salinidade induz efeitos depressivos sobre a nodulação, leghemoglobina e nitrogenase (Manchanda e Garg, 2008).

O isolamento e a seleção de rizóbios com características de tolerância ao estresse salino vêm revelando alto grau de diversidade nas populações deste grupo de microrganismos nos solos, principalmente em regiões tropicais. O estudo da biodiversidade de rizóbio busca entender suas relações ecológicas e evolutivas, visando encontrar genótipos tolerantes aos distintos estresses ambientais que vão limitar a simbiose, levando a um manejo mais eficiente dessa interação (Freitas et al., 2007).

## 2.4. Produção de melanina

Melaninas são pigmentos de alto peso molecular formados pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos e geralmente de coloração marrom escura ou preta (Jacobson, 2000). Esse pigmento é sintetizado pela enzima tirosinase (Mercado-Blanco et al., 1993). As melaninas são amplamente distribuídas no mundo vivo, presente em tecidos animais, vegetais e em microrganismos.

A melanina, embora não seja essencial ao crescimento dos microrganismos, é formada durante um período de estresse biótico ou abiótico ao qual estão expostos, servindo como uma ferramenta de auxílio no aumento da capacidade de sobrevivência no ambiente e competição em situações particulares (Romero-Martinez et al., 2000). Culturas de várias espécies de rizóbios apresentam a capacidade de produção de melanina após longos períodos de incubação em meio TY sólido (Lamb et al., 1982; Borthakur et al., 1987; Hynes et al., 1988; Cubo et al., 1988; Hawhins et al., 1991; Sá, 2001), e a produção desse pigmento é aumentada quando o meio TY é suplementado com L-tirosina – substrato para a tirosinase, uma enzima que catalisa vários passos da produção de melanina, e  $\text{CuSO}_4$  – cofator da tirosinase (Alves, 2005). A produção de melanina em meio de cultura acontece quando ocorre o rompimento de células velhas, liberando assim a tirosinase, que entra em contato com o substrato, a L-tirosina. Acrescentando-se SDS (dodecil sulfato de sódio) nas culturas, acelera-se a detecção da produção do pigmento, mesmo em colônias jovens, pois a ação detergente do SDS resulta em um rompimento imediato de células (Cubo et al., 1988).

A função da melanina em rizóbios não é clara. Talvez ela seja usada para polimerizar moléculas fenólicas que surjam por ocasião da senescência de nódulos, destoxificando esses compostos que normalmente são letais para a bactéria (Borthakur et al., 1987; Hawkins e Johnston, 1988). Também não foram observadas correlações entre a produção de melanina, competitividade por sítios de nodulação ou especificidade hospedeira (Gao e Borthakur, 1995; Sá, 2001) e fixação de nitrogênio (Lamb et al., 1982; Cubo et al., 1997) embora os genes *mel*, responsáveis pela produção de melanina estejam no plasmídeo simbiótico *sym* (Hawkins et al., 1991).

## 2.5. Produção de sideróforos

O ferro é o segundo metal, após o alumínio, e o quarto elemento mais abundante da crosta terrestre, sendo que apenas uma pequena fração está disponível para ser utilizada pelos seres vivos (Giongo, 2003; Silveira, 2009).

Devido à alta capacidade de aceitar e doar elétrons prontamente, interconvertendo-se entre a forma férrica e ferrosa, o ferro integra diversas metaloproteínas atuando como centro catalítico ou carreador de elétrons (Krewulak e Vogel, 2007). Diversos processos celulares vitais como o transporte de elétrons, a redução de oxigênio durante a síntese de ATP, a fotossíntese e a síntese de aminoácidos, nucleosídeos e DNA, são dependentes de ferro (Ratledge e Dover, 2000; Benite et al., 2002). Sendo assim, o ferro é um elemento limitante para o crescimento de praticamente todas as formas de vida.

Os microrganismos podem empregar uma variedade de estratégias para a aquisição direta de ferro em ambientes com baixa disponibilidade desse elemento. Bactérias são capazes de reduzir o íon férrico a íon ferroso por redutases extracelulares e transportar  $\text{Fe}^{2+}$  pela membrana externa através de porinas; o transporte de  $\text{Fe}^{2+}$  através da membrana citoplasmática ocorre pelo chamado sistema Feo – dependente de ATP (Andrews et al., 2003).

Outro recurso para assimilação de ferro é a utilização direta de moléculas contendo grupamentos heme, os quais possuem um átomo de ferro contido no centro de um grande anel orgânico heterocíclico chamado porfirina. Heme é um grupo prostético constituinte de diversas enzimas tais como hemoglobina (localizada nas células sanguíneas vermelhas) e leg-hemoglobina (encontrada na zona central dos nódulos em leguminosas), ambas relacionadas ao transporte e difusão de oxigênio. O heme é altamente tóxico por ser uma molécula hidrofóbica capaz de realizar reações redox não enzimáticas, sendo, portanto, raramente dissociado das proteínas das quais ele faz parte. A capacidade do uso da leg-hemoglobina como fonte de ferro em condições de baixa concentração desse metal já foi descrita entre alguns gêneros de rizóbios, como *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium* (Noya et al., 1997; Nienaber et al. 2001).

Contudo, entre as estratégias utilizadas para a aquisição de ferro, a produção de sideróforos aparece como a mais comumente empregada (Ferguson e Deisenhofer, 2002). Sideróforos são metabólitos secundários altamente eletronegativos e de alta afinidade por  $\text{Fe}^{3+}$ , sendo produzidos por diversos microrganismos sob condições de indisponibilidade de ferro no ambiente. A maioria das bactérias aeróbias, anaeróbias facultativas e fungos produzem sideróforos quando se multiplicam em ambientes com baixa concentração de ferro (Carrilo e Vazquez, 1992; Neilands, 1993).

A caracterização do tipo de sideróforo utilizado pode ser feita por identificação do grupo funcional utilizado como ferro-ligante: hidroxamatos, catecolatos e hidroxicarboxilatos (Wandersman e Delepelaire, 2004; Krewulak e Vogel, 2007). Após ser secretado para o ambiente externo, o sideróforo solubiliza o íon férrico formando o complexo  $\text{Fe}^{3+}$ -sideróforo, que é transportado de volta à célula para disponibilização do metal ao microrganismo. Algumas vezes o sideróforo é reciclado, podendo ser reutilizado para a mesma função (Dobbelaere et al., 2003).

Um microrganismo, para utilizar um determinado sideróforo, deve possuir um sistema de absorção de ferro específico para o sideróforo, composto por quatro componentes: um receptor de membrana externa de alta afinidade (Reigh e O'Connell, 1993), a proteína TonB ancorada na face interna da membrana externa, uma proteína periplásmica de ligação e várias proteínas associadas à membrana interna (Braun, 1995).

Não existe um procedimento único para determinar-se identificação e produção de sideróforos entre os microrganismos, e estes variam muito em estrutura (Silveira, 2009). Podem-se utilizar métodos químicos, microbiológicos e moleculares para a detecção e caracterização dessas moléculas. Entretanto, o método mais empregado é a utilização de CAS em meio de cultura (Schwyn e Neilands, 1987). O complexo ternário CAS, formado por cromo azurol S, ferro III e brometo de hexadecil trimetil amônio (CTAB), constitui-se em um corante de coloração azulada. Na presença de CAS adicionado a um meio de cultura adequado, bactérias que produzam fortes quelantes (sideróforos) são capazes de se multiplicar devido à remoção do ferro complexado ao corante. O processo de transferência é verificado através da mudança de coloração do meio, observada pela formação de um halo amarelado ao redor das colônias



capazes de produzir sideróforos. A adição do complexo CAS ao meio de cultura é um método eficiente, uma vez que somente sob a produção de sideróforos, o íon férrico poderá ser utilizado pela bactéria (Neilands, 1993; LeVier e Guerinot, 1996).

Uma vez que os sideróforos não são produzidos por todos rizóbios, tal característica pode ser um critério de seleção para a subsistência de linhagens em solos com limitada disponibilidade de ferro (Carson et al., 1992; Derylo e Skorupska, 1992). A capacidade de produzir sideróforos parece ser mais difundida entre as espécies do gênero *Rhizobium* do que as do gênero *Bradyrhizobium*, pois esse gênero evoluiu em solos ácidos, onde o ferro está normalmente mais disponível (LeVier e Guerinot, 1996).

O ferro é indispensável na síntese de um grande número de componentes envolvidos diretamente na fixação biológica de nitrogênio, como por exemplo, as enzimas-chave dinitrogenase e dinitrogênio redutase, e a molécula de leghemoglobina, essencial para o controle da tensão de oxigênio dentro do nódulo. Os nódulos possuem uma concentração de ferro maior do que qualquer tecido da planta, e tanto o início quanto o desenvolvimento da nodulação dependem de um aumento na aquisição desse elemento. Assim, mais ferro é requerido por plantas inoculadas com rizóbios, do que aquelas supridas com adubação nitrogenada (Derylo e Skorupska, 1992; Ragland e Theil, 1993; Yeoman et al., 2000).

Também rizóbios de vida livre formam sideróforos, que desempenham um papel fundamental na competição por ferro desses microrganismos quando na rizosfera (Reigh e O'Connell, 1993; Jurkevitch et al., 1992; Fabiano et al., 1994). Os rizóbios, além disso, podem utilizar sideróforos produzidos por outras estirpes de rizóbios, chamado de sinergismo inter-estirpe, desde que este possua proteínas receptoras na membrana externa específica para o sideróforo em questão (Giongo, 2003).

Embora os sideróforos tenham como papel principal a captação de ferro, é possível que eles desempenhem outras funções. É sabido que sideróforos aumentam a virulência de microrganismos patogênicos e também são capazes de quelar outros íons metálicos, como manganês, níquel, zinco e alumínio, porém, com menor afinidade quando comparados ao íon férrico (Neilands, 1995; Dilworth et al., 1998; Roy e Chakrabartty, 2000). Além disso, a

síntese de sideróforos pelos organismos do solo tem um efeito benéfico nas plantações, embora isso ainda não tenha sido totalmente esclarecido. Como benefício aos vegetais, a capacidade de captar complexos  $\text{Fe}^{3+}$ -sideróforo por determinados microrganismos pode impedir a proliferação de patógenos ao redor das raízes, devido ao sequestro de ferro do ambiente rizosférico.

## **2.6. Germinação e desenvolvimento de plântulas**

A necessidade crescente de utilização de espécies forrageiras de estação fria na região sul do país vem determinando um grande volume de importação de sementes (Infantini et al., 1992). Sendo assim, as espécies leguminosas com potencial forrageiro vêm sendo utilizadas em diversas regiões pecuárias do Brasil, visando maior produção de forragem e aumento no teor protéico da pastagem (Junior et al., 2004). Dentre as leguminosas forrageiras, o cornichão apresenta vantagens na produção de forragens de inverno-primavera-verão devido a sua resistência à seca e ao encharcamento temporário do solo (Carambula, 1977; Infantini et al., 1992; Junior et al., 2004).

Nas leguminosas, quando há dormência das sementes, esta é causada por um bloqueio físico representado pelo tegumento resistente e impermeável que, ao impedir o trânsito da água e as trocas gasosas, não permite a embebição da semente nem a oxigenação do embrião, que por isso permanece latente (Jacob Junior et al., 2004; Deminicis et al., 2006; Melo e Rodolfo Júnior, 2006). Essas sementes, denominadas duras, alcançam grande longevidade (Valentim e Carneiro, 1998), e qualquer procedimento que permita romper o tegumento das sementes, fazendo-as absorver água, promove sua germinação e emergência de plântulas geralmente vigorosas (Grus, 1990). Há vários tratamentos pré-germinativos que permitem a superação da dormência das sementes de leguminosas. Como exemplos, a literatura cita tratamentos com ácidos fortes, imersão em solventes (água, álcool, etc), escarificação mecânica e choque térmico (Mott, 1979; Brasil, 1992; Popinigis, 1985; Copeland e Mc Donald, 1995).

O poder germinativo de um lote de sementes é avaliado pelo teste de germinação, conforme especificações das Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992). Os testes são realizados em condições adequadas de

umidade e temperatura, favorecendo assim a expressão da capacidade germinativa das sementes. As fases iniciais do desenvolvimento no ciclo de vida de uma planta são consideradas cruciais, uma vez que, entre a germinação da semente e o estabelecimento da plântula, ocorrem as maiores taxas de mortalidade (Harper, 1977). Além disso, o vigor da plântula é um fator crítico quando a competição por luz, nutrientes, ar e água começa a se tornar mais acentuada (Biswas et al., 2000).

O vigor das plântulas e a taxa de germinação dependem tanto de fatores genéticos inerentes à semente, quanto de práticas culturais que podem alterá-las. E dentre as práticas culturais, a inoculação com microrganismos, principalmente rizóbios, tem recebido especial atenção nos últimos tempos por se tratar de uma alternativa de baixo custo e ambientalmente favorável, constituindo-se em uma ferramenta importante para o estabelecimento de sistemas agrícolas sustentáveis (Schlindwein et al., 2008). Os microrganismos podem alterar a taxa de germinação por meio da produção de reguladores de crescimento vegetal, tais como auxinas, giberelinas e citocininas (Bialek et al., 1992; Cattelan, 1999; Reis, 2007). Tais efeitos podem ser tanto positivos, resultando em aumento na taxa de germinação e no vigor das plântulas, quanto negativos, diminuindo a taxa de germinação (Schlindwein et al., 2008).

## **2.7. Variabilidade genética dos isolados de rizóbios**

A reação em cadeia de polimerase (PCR, do inglês “polymerase chain reaction”) é uma técnica que possibilita a amplificação *in vitro* de ácidos nucléicos (Mullis et al., 1986). O advento da PCR acelerou os estudos de genomas de vários organismos, pois facilitou a clonagem e o sequenciamento de DNA; a combinação de alta especificidade e sensibilidade tornou a PCR a principal técnica de diagnóstico molecular e ferramenta essencial nos mais diversos campos da investigação genética (Lunge et al., 2003).

A especificidade do teste é obtida a partir da utilização de oligonucleotídeos que funcionam como iniciadores (primers) da síntese e são complementares ao gene ou região de ácido nucléico de interesse. No ensaio de PCR ocorre a hibridização entre os iniciadores e o DNA alvo, seguida da reação de síntese de DNA *in vitro* pela enzima DNA polimerase. A utilização de

dois iniciadores que delimitam uma região do DNA alvo e a repetição da reação de síntese por várias vezes (ciclos) dá origem a bilhões de cópias do alvo, num processo de amplificação (Mullis, 1987; Saiki et al., 1985).

O uso de técnicas moleculares tem estimulado o desenvolvimento de métodos simples e rápidos para a caracterização de populações microbianas. Vários são os estudos relatando a utilização da tecnologia da PCR nos estudos filogenéticos (Eardly et al., 1992; Ueda et al., 1995) e na detecção, identificação e caracterização de rizóbios (Harrison et al., 1992; Laguerre et al., 1994; Giongo et al., 2007).

A amplificação de sequências repetitivas intergênicas conhecidas como ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) e elementos BOX (sequências repetitivas espalhadas no genoma), geram padrões altamente característicos quando separadas em gel de agarose (Selenska-Pobell, 1995). Essas sequências são altamente conservadas entre os rizóbios e já foram utilizadas em pesquisas para distinguir e classificar diferentes estirpes em estudos de diversidade da população de *Bradyrhizobium* em solos na Polônia (Madrzak et al., 1995), para avaliar impacto de parâmetros ambientais em população de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (Labes et al., 1996) e em diversos outros estudos populacionais de rizóbios (de Bruijin, 1992; Selenska-Pobell, 1995; Laguerre et al., 1997; Sikora et al., 2002; Giongo et al., 2007).

Outra técnica utilizada para diferenciação de estirpes de rizóbios é o estudo por RISA (Análise do Espaço Intergênico Ribossomal). O método envolve a amplificação do DNA total da comunidade bacteriana da região intergênica entre a pequena (16S) e grande (23S) subunidades de genes rRNA (Fisher e Triplett, 1999; Straliozzo e Rumjanek, 1999; Ranjard et al., 2000). A região intergênica 16S-23S, que pode codificar tRNAs dependendo da espécie bacteriana, apresenta heterogeneidade significativa no comprimento e na sequência de nucleotídeos. Ambos os tipos de variações têm sido amplamente utilizados para diferenciar estirpes e espécies aparentadas de bactérias (Navarro et al., 1992; Jensen et al., 1993; Scheinert et al., 1996; Aubel et al., 1997; Maes et al., 1997).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram estudados 52 isolados de rizóbios nativos (Tabela 1) para *Lotus* spp da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), que foram isolados por Fontoura (2007) e Frizzo (2007). Entre os isolados estudados 31 eram rizóbios de *Lotus corniculatus*, 3 de *L. glaber*, 6 de *L. subbiflorus* e 12 de *L. uliginosus*. Os rizóbios foram obtidos de isolamentos de amostras de solo de cinco municípios do Rio Grande do Sul: Bagé [31°17'53,7"S, 54°03'07,4"W], Encruzilhada do Sul [30°33'40,4"S, 52°22'22,4"W], Hulha Negra [31°24'20"S, 53°45'13,6"W], Mostardas [31°05'42"S, 50°55'44"W] e Piratini [31°18'58,8"S, 53°00'03,9"].

Os isolados de rizóbios foram inoculados em placas contendo meio extrato de levedura, manitol e ágar (meio LMA – Apêndice 1) (Vincent, 1970), utilizando-se a técnica de esgotamento de inóculo por estriamento, para obtenção de colônias isoladas. Posteriormente, as culturas obtidas foram inoculadas em placas contendo meio LMA com vermelho congo.

Os estudos microbiológicos de resistência à acidez (baixo pH e alumínio tóxico), estresse salino (concentrações de cloreto de sódio e cloreto de potássio), produção de melanina, produção de sideróforos e a caracterização genética foram realizados no Laboratório de Fitopatologia, localizado na Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul (FEPAGRO). Os experimentos com inoculação de plantas foram conduzidos em casa de vegetação da FEPAGRO.

Nos estudos microbiológicos de resistência a acidez e estresse salino utilizou-se como padrão a estirpe de *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 (CIAT 899), por ser resistente a estes fatores (Sá, 2001; Nogales et al., 2002).

Tabela 1 – Isolados de rizóbios nativos para *Lotus* spp da coleção de culturas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul estudados e localidades das amostras de solo de onde foram obtidos.

Isolado	Origem	Isolado	Origem
UFRGS Lc 2	Hulha Negra	UFRGS Lc 605	Bagé
UFRGS Lc 3	Hulha Negra	UFRGS Lc 607	Bagé
UFRGS Lc 4	Hulha Negra	UFRGS Lc 609	Bagé
UFRGS Lc 5	Hulha Negra	UFRGS Lc 610	Bagé
UFRGS Lc 7	Hulha Negra	UFRGS Lc 614	Bagé
UFRGS Lc 8	Hulha Negra	UFRGS Lg 74	Bagé
UFRGS Lc 9	Hulha Negra	UFRGS Lg 85	Bagé
UFRGS Lc 11	Hulha Negra	UFRGS Lg 88	Bagé
UFRGS Lc 322	Hulha Negra	UFRGS Ls 1	Mostardas
UFRGS Lc 329	Hulha Negra	UFRGS Ls 5	Mostardas
UFRGS Lc 336	Hulha Negra	UFRGS Ls 33	Mostardas
UFRGS Lc 340	Hulha Negra	UFRGS Ls 36	Mostardas
UFRGS Lc 348	Hulha Negra	UFRGS Ls 45	Mostardas
UFRGS Lc 356	Hulha Negra	UFRGS Ls 46	Mostardas
UFRGS Lc 372	Hulha Negra	UFRGS Lu 9	Mostardas
UFRGS Lc 516	Bagé	UFRGS Lu 14	Mostardas
UFRGS Lc 517	Bagé	UFRGS Lu 16	Mostardas
UFRGS Lc 520	Bagé	UFRGS Lu 19	Mostardas
UFRGS Lc 523	Bagé	UFRGS Lu 21	Mostardas
UFRGS Lc 547	Encruzilhada do Sul	UFRGS Lu 25	Mostardas
UFRGS Lc 586	Bagé	UFRGS Lu 26	Mostardas
UFRGS Lc 594	Bagé	UFRGS Lu 56	Hulha Negra
UFRGS Lc 596	Bagé	UFRGS Lu 57	Hulha Negra
UFRGS Lc 597	Bagé	UFRGS Lu 59	Hulha Negra
UFRGS Lc 601	Bagé	UFRGS Lu 67	Piratini
UFRGS Lc 602	Bagé	UFRGS Lu 71	Bagé

Legenda: UFRGS = Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Lc = *Lotus corniculatus*; Lg = *Lotus glaber* (sm *L. tenuis*); Ls = *Lotus subbiflorus*; Lu = *Lotus uliginosus*.

### 3.1. Resistência dos rizóbios a pH 4,2

A resistência dos rizóbios a pH 4,2 foi avaliada pela quantificação do crescimento em meio líquido utilizando-se o meio mínimo de Wood e Cooper (1985) modificado (meio MWC) (Sá, 2001). A composição do meio foi modificada substituindo-se a fonte de Fe na forma de Fe-EDTA por FeCl<sub>3</sub>

(Apêndice 2). O crescimento dos rizóbios foi avaliado a pH 4,2 e pH 6,8. O inóculo foi preparado com culturas crescidas em meio líquido triptona levedura (meio TY – Apêndice 3) (Somasegaran e Hoben, 1994), em agitador orbital por sete dias a 28°C. Uma curva de padronização do inóculo foi construída determinando-se o número de células viáveis, por diluição sucessiva e inoculação em placas com meio LMA corado com vermelho congo, e a leitura da absorbância da suspensão de células em espectrofotômetro a 540nm, com o objetivo de padronizar o inóculo em torno do valor da absorbância 0,013nm, que correspondia a cerca de  $10^4$  células viáveis/mL de meio. As culturas foram inoculadas em frascos contendo meio MWC líquido, previamente esterilizados em autoclave a 120°C por quinze minutos, e incubadas em agitação orbital constante de 100rpm durante sete dias a 28°C. Após, determinou-se o número de células viáveis usando-se o método de diluição sucessiva e inoculação em placas com meio LMA com vermelho congo, utilizando-se o método de gotas de Milles e Misra (1938). A contagem do número de colônias formadas foi realizada após 2 dias de incubação em estufa 28°C para os rizóbios de crescimento rápido, e após 7 dias para os de crescimento lento. Foram realizadas três repetições por tratamento e considerados como resistentes à acidez as culturas dos rizóbios que apresentaram número de células viáveis, no mínimo, mil vezes maior do que o inóculo. Determinou-se também o pH do caldo de cultura ao final da incubação, para verificar a possível alteração durante o crescimento bacteriano.

### **3.2. Resistência dos rizóbios a alumínio tóxico**

Esta avaliação foi realizada utilizando-se a mesma metodologia empregada para a avaliação da resistência a baixo pH, descrita no item 3.1. O meio MWC foi preparado a pH 4,2 com posterior adição da solução de  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  5mM para manter uma concentração final de  $50\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$ . A solução de  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  foi preparada em água ultra pura, previamente acidificada a pH 3,0 com HCl, e esterilizada por filtração em membrana  $0,22\mu\text{m}$ . Foram empregados três tratamentos: um com meio MWC líquido a pH 4,2 sem  $\text{Al}^{3+}$ , com meio MWC líquido a pH 4,2 e  $50\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$  e outro com meio MWC líquido a pH 6,8 sem  $\text{Al}^{3+}$ . Assim como na avaliação anterior, foram

realizadas três repetições por tratamento e considerados como resistentes à alumínio tóxico os rizóbios que apresentaram número de células viáveis, no mínimo, mil vezes maior do que o inóculo. Também, determinou-se o pH do caldo de cultura ao final da incubação.

### **3.3. Resistência dos rizóbios a estresse salino por alta concentração de cloreto de sódio e de cloreto de potássio**

A avaliação da resistência dos rizóbios a estresse salino foi realizada pela quantificação do crescimento em meio extrato de levedura e manitol (meio LM – Apêndice 4) líquido. Os experimentos de resistência a salinidade foram conduzidos utilizando-se dois sais: sódio e potássio. Em que, na composição do meio LM líquido adicionou-se 4, 8, 12, 16 e 20g de NaCl por litro, ajustando-se o pH para 6,8 (Freitas et al., 2007), para avaliar a resistência dos rizóbios a estresse salino por alta concentração de cloreto de sódio. Na avaliação da resistência por alta concentração de cloreto de potássio, utilizaram as mesmas concentrações, 4, 8, 12, 16 e 20g de KCl por litro de meio LM líquido, ajustando-se o pH para 6,8. Tendo em vista que as medidas de salinidade do solo são comumente feitas determinando-se a condutividade elétrica ou a pressão osmótica equivalente na solução de saturação do solo (Cardoso, 1992), determinou-se também a condutividade elétrica (CE) em  $\text{dSm}^{-1}$  de cada concentração de NaCl em meio LM líquido (Tabela 2) e de KCl (Tabela 3). O inóculo foi preparado com culturas crescidas em meio líquido TY, em agitador orbital por sete dias a 28°C. Assim como na avaliação de resistência à acidez (baixo pH e alumínio tóxico), uma curva de padronização do inóculo foi construída, através de leitura da absorvância da suspensão de células em espectrofotômetro a 540nm, com o objetivo de padronizar o inóculo em torno do valor de absorvância 0,013nm, que corresponde a cerca de  $10^4$  células viáveis/mL de meio. As culturas foram, então, inoculadas em frascos estéreis com meio LM líquido com os diferentes sais e concentrações, e incubadas em agitação orbital constante de 100rpm durante sete dias a 28°C. Após, determinou-se o número de células viáveis usando-se o método de diluição sucessiva e inoculação em placas com meio LMA com vermelho congo, utilizando-se o método de gotas de Milles e Misra (1938). Após 2 a 7 dias de



incubação em estufa 28°C realizou-se a contagem do número de colônias formadas. Foram realizadas três repetições por tratamento e considerados como resistentes os rizóbios que apresentaram número de células viáveis, no mínimo, mil vezes maior do que o inóculo.

Tabela 2 – Condutividade elétrica das diferentes concentrações de NaCl por litro de meio LM líquido.

Concentração de NaCl	Condutividade elétrica
---- gL <sup>-1</sup> ---	--- dSm <sup>-1</sup> ---
0,1	1,04
4,0	5,66
8,0	9,29
12,0	11,97
16,0	13,58
20,0	15,73

Legenda: NaCl = cloreto de sódio; gL<sup>-1</sup> = grama por litro; dSm<sup>-1</sup> = deciSiemens por metro.

Tabela 3 – Condutividade elétrica das diferentes concentrações de KCl por litro de meio LM líquido.

Concentração de KCl	Condutividade elétrica
---- gL <sup>-1</sup> ---	--- dSm <sup>-1</sup> ---
0*	0,74
4,0	6,09
8,0	10,60
12,0	14,73
16,0	17,42
20,0	19,68

Legenda: KCl = cloreto de potássio; 0\* = sem adição de Cloreto de Potássio (concentração de potássio no meio levedura-manitol igual 0,22 gL<sup>-1</sup>); gL<sup>-1</sup> = grama por litro; dSm<sup>-1</sup> = deciSiemens por metro.

### 3.4. Produção de melanina

A produção de melanina foi avaliada utilizando-se a metodologia proposta por Cubo et al. (1988). Os isolados foram inoculados em meio TY líquido e incubados a 28°C, sob agitação constante a 100 rpm, durante sete dias. Após, foram inoculados em placas de Petri contendo meio TY sólido, acrescido de L-tirosina (600 µg.mL<sup>-1</sup>) e sulfato de cobre (40 µg.mL<sup>-1</sup>), e incubados a 28°C, durante dois (para rizóbios de crescimento rápido) a sete (para de crescimento lento) dias. Em seguida, as colônias foram tratadas com 50µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10% (peso/volume) em tampão TBE. Como controle negativo foi utilizada a estirpe de *Rhizobium tropici* SEMIA 4077

(CIAT 899), conhecida como não produtora de melanina (Cubo et al., 1988; Gao e Borthakur, 1995) e como padrão positivo, os isolados UFRGS Lg 111 e UFRGS Lg 121, rizóbios isolados de *Lotus glaber* (Fontoura, 2007), cedidas pela Coleção de Culturas do Laboratório de Microbiologia do Solo da UFRGS. Após 24 horas de incubação à temperatura ambiente, as colônias que apresentaram um pigmento escuro difuso foram registradas como produtoras de melanina.

### 3.5. Produção de sideróforos

A produção de sideróforos foi avaliada usando-se o corante proposto por Schwyn e Neilands (1987) modificado, que utiliza um complexo corante-ferro. Para o preparo da solução indicadora de Cromoazurol S (CAS), utilizou-se um balão volumétrico de 100mL, em que adicionou-se 6mL da solução de brometo hexadeciltrimetilamonio (HDTMA) 10mM (Apêndice 5) e um pouco de água destilada estéril. Em seguida, sob agitação, adicionou-se lentamente 1,5mL da solução férrica ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1mM e HCl 0,01N) (Apêndice 6) e 7,5mL de uma solução aquosa de cromo azurol S 2mM. Após, adicionou-se a solução contendo 4,307g de piperazina anidra dissolvida em 20mL de água destilada estéril e 6,25mL de HCl concentrado, completou-se, então, o volume do balão volumétrico com água destilada estéril. Os rizóbios em estudo foram inoculados em meio de King B (meio KMB – Apêndice 7) (King et al., 1954), que apresenta deficiência de ferro (Mariano et al., 2000), e incubados a 28°C em agitador orbital por sete dias. Após esse período de incubação, centrifugou-se 1mL da suspensão de células bacterianas a 13.000rpm por 5min. Transferiu-se 100µL do sobrenadante para placas de Elisa, e adicionou-se 100µL da solução indicadora de CAS. Os rizóbios que converteram a cor azul da solução indicadora de CAS para amarelo-avermelhado, dentro de 15 min, foram considerados produtores de sideróforos. Tendo em vista que a maioria das espécies de *Pseudomonas* produz sideróforos (Peixoto, 1997; Zago et al., 2000; Diaz de et al., 2002) utilizou-se como controles positivos duas estirpes de *Pseudomonas* sp. – PSII e PSIII, da coleção do Laboratório de Fitopatologia da FEPAGRO, conhecidas como produtoras de sideróforos.

### 3.6. Avaliação da eficiência dos rizóbios na fixação simbiótica de nitrogênio

Para a avaliação quanto à eficiência na fixação simbiótica de nitrogênio em experimento realizado em casa de vegetação, foram selecionados os isolados UFRGS Lc 5, UFRGS Lc 607, UFRGS Lc 609, UFRGS Lc 614, UFRGS Lu 56, UFRGS Lu 57 e UFRGS Lu 59 que apresentaram resistência aos fatores de acidez (baixo pH e alumínio tóxico) e que produziram nódulos, quando avaliados *in vitro* com o meio de Murashige e Skoog (1962) (meio de MS – Apêndice 8) modificado. A composição do meio foi modificada substituindo a fonte de nitrogênio nas formas de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$  por KCl.

Os vasos foram preenchidos com solo Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico típico, solo arenoso e com baixo teor de matéria orgânica, baixo pH, coletado na Unidade Viamão da FEPAGRO (Tabela 4). As sementes de *Lotus corniculatus* L. cv. São Gabriel, utilizadas no experimento, foram previamente submetidas à desinfestação com álcool 70% (1min) e hipoclorito de sódio (2min), seguida de cinco lavagens com água esterilizada, e, após, inoculadas com 10mL do caldo de culturas de cada estirpe e isolado estudado, crescidos em meio extrato de levedura e manitol (LM), incubado por sete dias a 28°C, sob agitação constante a 100rpm e com cerca de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Em cada vaso, foram colocadas seis sementes pré-germinadas, utilizando-se cinco vasos por tratamento.

Neste experimento, foram utilizadas para comparação as estirpes de *Mesorhizobium loti* SEMIA 806 e SEMIA 816, liberadas para produção de inoculantes para *Lotus corniculatus*, cedidas pela Coleção de Culturas de Rizóbios da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul (FEPAGRO). Além dos tratamentos inoculados, foram conduzidos dois tratamentos controle, um sem adição de nitrogênio e outro com adição de solução de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (27,7 g L<sup>-1</sup>), adicionando 1 mL da solução em cada vaso, aplicados parceladamente a cada quinze dias, ao longo do experimento. Após 20 dias de desenvolvimento, realizou-se o desbaste das plantas, deixando-se duas por vaso. O experimento foi conduzido por 180 dias.

Ao final do período, a parte aérea foi separada do sistema radicular, acondicionada em sacos de papel e submetida à secagem em estufa a 65°C, durante três dias. Uma vez seca, a parte aérea foi pesada, sendo em seguida moída para a determinação química do acúmulo de nitrogênio no tecido, segundo metodologia descrita por Tedesco et al. (1995). Os nódulos foram destacados das raízes, contados e secos em estufa a 65°C por três dias para determinação da massa de nódulos secos. A análise estatística dos dados foi realizada pela análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro, utilizando o programa SISVAR (Sistema de Análise de Variância). Para avaliação da eficiência relativa dos isolados foi utilizado o índice de eficiência relativa de fixação de nitrogênio (EFR), proposto por Brockwell et. al. (1966), através da fórmula descrita abaixo.

$$\text{EFR} = \frac{\text{Ntotal tratamento} - \text{Ntotal T-N}}{\text{Ntotal T+N} - \text{Ntotal T-N}} \times 100$$

Na qual:

Ntotal tratamento = nitrogênio total da planta do tratamento inoculado;

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

Ntotal T+N = nitrogênio total do controle não inoculado e que recebeu suplementação nitrogenada.

Tabela 4 – Características químicas do solo Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico típico coletado na Unidade de Viamão da FEPAGRO.

P	K	Arg	MO	pH	SMP	Al	Ca	Mg	CTC		Sat.	CTC
									pH7,0	Efet.	Al	Bases
mg/dm <sup>3</sup>		-----%-----						-----cmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> -----			----%----	
8,2	75	19	1,3	5,4	6,7	0,0	1,9	1,0	5,0	3,1	0,0	61,4

Obs.: Análise realizada no Laboratório de Química Agrícola da FEPAGRO/Sede – Porto Alegre.

### 3.7. Avaliação da influência dos rizóbios na germinação e no vigor de plântulas

Neste experimento, foram utilizados os isolados UFRGS Lc 5, UFRGS Lc 607, UFRGS Lc 609, UFRGS Lc 614, UFRGS Lu 56, UFRGS Lu 57

e UFRGS Lu 59, as estirpes de *Mesorhizobium loti* liberadas para a produção de inoculantes para cornichão, SEMIA 806 e SEMIA 816, e dois tratamentos controle. As culturas foram crescidas em meio líquido extrato de levedura e manitol (LM) em incubadora com agitação orbital a 100rpm por sete dias à 28°C. Na avaliação do efeito dos isolados de rizóbios sobre a germinação, foram utilizadas sementes de cornichão (*Lotus corniculatus* L. cv. São Gabriel) submetidas previamente a desinfestação com álcool 70% (1min) e hipoclorito de sódio (2min), seguida de cinco lavagens com água esterilizada. Os testes foram conduzidos em *gerboxes* com quatro repetições com 50 sementes cada, colocadas em papel substrato *germitest* estéril umedecido com 16mL de água destilada estéril, de meio de cultura LM estéril ou contendo um dos rizóbios testados. Após a montagem dos testes, as sementes foram colocadas em germinadores com luz constante e temperatura de 20°C, conforme regras internacionais para análise de sementes (ISTA, 1996). De modo a avaliar a influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação, foram utilizados como parâmetros a porcentagem final de sementes germinadas e o índice de velocidade de germinação com base nas sementes germinadas (IVG%), calculado pela soma do número de sementes germinadas a cada dia, e dividido pelo respectivo número de dias transcorridos a partir da semeadura, conforme Maguire (1962). Os dados foram obtidos a partir de contagens diárias após a emergência da plântula. Ao final de doze dias, o teste de germinação foi concluído. Então, de cada unidade experimental, foram avaliadas 10 plântulas quanto à massa seca e ao comprimento, em cm, da raiz e da parte aérea, com o objetivo de avaliar a influência dos rizóbios sobre o vigor de plântulas. A análise estatística dos dados foi realizada pela análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro, utilizando o programa SISVAR (Sistema de Análise de Variância).

### **3.8. Caracterização genética dos isolados de rizóbios**

Para a determinação da caracterização genética dos isolados de rizóbios e das estirpes liberadas para produção de inoculantes, realizou-se a análise do perfil eletroforético da amplificação dos fragmentos de DNA pela

reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores BOX A1-R, ERIC e RISA.

### 3.8.1. Extração do DNA genômico dos rizóbios

Os 52 isolados de rizóbios e as estirpes de *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 e de *Mesorhizobium loti* SEMIA 806, SEMIA 816, SEMIA 830, SEMIA 839 e SEMIA 849, recomendadas para produção de inoculantes das espécies de *Lotus* foram inoculados em meio TY líquido e incubados sob agitação constante a 100rpm por 48 horas a 28°C. Posteriormente, efetuou-se a extração e purificação do DNA, utilizando-se o protocolo de extração com *kit* de colunas da *Genomic DNA Extraction* Bioamerica.

Para avaliação da qualidade do DNA extraído, as amostras de DNA foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X em voltagem constante (70V). O carregamento do gel foi realizado preparando-se uma mistura de 6µL de amostra de DNA mais 1µL de tampão de carregamento (*Blue Green Loading Dye I*).

### 3.8.2. Amplificação do DNA genômico por oligonucleotídeos iniciadores BOX A1-R, ERIC e RISA

Após a verificação do produto da extração, foram realizadas as amplificações dos fragmentos de DNA, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores BOX A1-R (5' – CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G – 3') e ERIC1-R (5' – ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C – 3'), ERIC-2 (5' – AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G – 3') e SD-Bact-1522-bS-20 (5' – TGC GGC TGG ATC CCC TCC TT – 3'), LD-Bact-132-aA-18 (5' – CCG GGT TTC CCC ATT CGG – 3').

A reação de amplificação para PCR-BOX A1-R utilizada continha: 2µL de DNA molde, 2,5µL de tampão de PCR 10X, 0,25µL de uma solução com 0,25mmol L<sup>-1</sup> de cada DNTP, 1,5 de MgCl<sub>2</sub>, 1µL de DMSO, 1,25µL de oligonucleotídeo BOX A1-R 20mmol L<sup>-1</sup>, 0,2µL de Taq polimerase, e água ultra pura estéril para o volume final de 25µL. A amplificação foi realizada com um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por sete minutos, seguido por 34 ciclos de

amplificação, sendo cada ciclo composto por uma fase com duração de um minuto a 94°C, uma fase de um minuto a 53°C e uma fase de oito minutos a 65°C; para extensão final procedeu-se a um ciclo extra a 65°C por quinze minutos (Vargas et al., 2007).

Para PCR-ERIC, a reação de amplificação utilizada continha: 2µL de DNA molde, 2,5µL de tampão de PCR 10X, 0,25µL de uma solução com 0,25mmol L<sup>-1</sup> de cada DNTP, 1,5 de MgCl<sub>2</sub>, 1µL de DMSO, 1,25µL de oligonucleotídeo ERIC1-R 20mmol L<sup>-1</sup>, 1,25µL de oligonucleotídeo ERIC-2 20mmol L<sup>-1</sup>, 0,2µL de Taq polimerase, e água ultra pura estéril para o volume final de 25µL. A amplificação foi realizada com um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por sete minutos, seguido por 30 ciclos de amplificação, sendo cada ciclo composto por uma fase com duração de um minuto a 94°C, uma fase de um minuto a 52°C e uma fase de oito minutos a 65°C; para extensão final procedeu-se a um ciclo extra a 65°C por dezesseis minutos (Sá, 2001; Giongo, 2007).

A reação de amplificação para PCR-RISA continha: 2µL de DNA molde, 2,5µL de tampão de PCR 10X, 0,25µL de uma solução com 0,25mmol L<sup>-1</sup> de cada DNTP, 1,5 de MgCl<sub>2</sub>, 1µL de DMSO, 1,25µL de oligonucleotídeo SD-Bact-1522-bS-20 20mmol L<sup>-1</sup>, 1,25µL de oligonucleotídeo LD-Bact-132-aA-18 20mmol L<sup>-1</sup>, 0,2µL de Taq polimerase, e água ultra pura estéril para o volume final de 25µL. A amplificação foi realizada com um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por dois minutos, seguido por 30 ciclos de amplificação, sendo cada ciclo composto por uma fase com duração de quinze segundos a 94°C, uma fase de quinze segundos a 55°C e uma fase de quarenta e cinco segundos a 72°C; para extensão final procedeu-se a um ciclo extra a 72°C por dois minutos (Fisher e Triplett, 1999).

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 1X em voltagem constante (70V). O perfil de bandas no gel foi transformado em uma matriz binária bidimensional, pelo programa Gel-Pro Analyser 3.1, onde 0 (zero) indicava a ausência de banda e 1 (um) à presença. A similaridade/dissimilaridade genética entre os isolados foi medida pelo coeficiente de Jaccard. As matrizes foram analisadas em conjunto pelo programa PAST – Palaeontological STatistic ver.1,96 e o dendrograma

obtido pelo método de agrupamento *Unweighted Pair-Group Average* (UPGMA) pelo programa *Multivar Cluster Analysis* do PAST (Hammer et al., 2007).

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



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Resistência dos rizóbios a pH 4,2 e a alumínio tóxico

Entre os 52 isolados de *Lotus* estudados, 20 deles (UFRGS Lc 2, Lc 3, Lc 4, Lc 5, Lc 9, Lc 11, Lc 322, Lc 329, Lc 356, Lc 372, Lc 596, Lc 601, Lc 605, Lc 607, Lc 609, Lc 614, Lu 56, Lu 57, Lu 59 e Lu 67) foram resistentes a pH 4,2 em meio de cultura. Sendo que 16 (31%) desses vinte isolados (UFRGS Lc 2, Lc 4, Lc 5, Lc 9, Lc 322, Lc 329, Lc 356, Lc 372, Lc 596, Lc 601, Lc 607, Lc 609, Lc 614, Lu 56, Lu 57 e Lu 59) foram também resistentes à concentração de 50 $\mu$ M de alumínio em meio de cultura, produzindo populações, ao final do período de incubação de sete dias, da ordem de 10<sup>7</sup> até 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> (Tabela 5) enquanto que, 4 isolados (8%) (UFRGS Lc 3, Lc 11, Lc 605 e Lu 67) foram resistentes, somente, a pH 4,2 em meio de cultura, com populações da ordem de 10<sup>7</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, mas não foram resistentes à 50 $\mu$ M de Al<sup>3+</sup>. Os outros 32 isolados estudados, 61% do total, mostraram-se sensíveis a pH 4,2. Resultados semelhantes foram obtidos por Marriel (1984), Hara e Oliveira (2004) e Vargas et al. (2007), em estudos com rizóbios, bem como no trabalho de Wood e Cooper (1985), em que relatam que estirpes de rizóbios para *Lotus* foram tolerantes com 20 e 50 $\mu$ M de alumínio a pH 5,5. Entretanto, nos estudos de Räsänen e Lindström (1997) 20 $\mu$ M de alumínio em meio de cultura inibiu a multiplicação de células de *Rhizobium galegae* em pH baixo e segundo Wood e Cooper (1988) 50 $\mu$ M de alumínio causou inibição da multiplicação de *R. leguminosarum* bv. *trifoli* na faixa de pH 4,6 – 5,6. Thornton e Davey (1983) relataram que estirpes de *R. phaseoli* mostraram-se sensíveis para 5 $\mu$ M de alumínio em pH 4,4.

Tabela 5 – Crescimento de rizóbios de *Lotus* spp em meio com pH 4,2 e com 50µM de alumínio tóxico, após sete dias de incubação em meio MWC modificado.

Rizóbio	Tratamentos		
	pH 6,8	pH 4,2	pH 4,2 + Al <sup>3+</sup>
<b>Estirpes</b>	-----UFC.mL <sup>-1</sup> -----		
SEMIA 4077	1,3.10 <sup>7</sup>	1,2.10 <sup>7</sup>	1,2.10 <sup>7</sup>
SEMIA 806	1,5.10 <sup>8</sup>	1,2.10 <sup>6</sup>	9,5.10 <sup>4</sup>
SEMIA 816	1,6.10 <sup>7</sup>	7,2.10 <sup>5</sup>	8,7.10 <sup>5</sup>
SEMIA 830	1,6.10 <sup>7</sup>	-	-
SEMIA 839	3,5.10 <sup>7</sup>	-	-
SEMIA 849	8,8.10 <sup>7</sup>	8,2.10 <sup>7</sup>	6,5.10 <sup>3</sup>
<b>Isolados</b>			
UFRGS Lc 2	6,2.10 <sup>8</sup>	7,2.10 <sup>7</sup>	7,2.10 <sup>7</sup>
UFRGS Lc 3	5,7.10 <sup>7</sup>	8,6.10 <sup>7</sup>	6,9.10 <sup>4</sup>
UFRGS Lc 4	2,8.10 <sup>7</sup>	2,9.10 <sup>7</sup>	1,5.10 <sup>7</sup>
UFRGS Lc 5	1,4.10 <sup>8</sup>	3,1.10 <sup>7</sup>	3,1.10 <sup>7</sup>
UFRGS Lc 7	7,8.10 <sup>7</sup>	1,4.10 <sup>4</sup>	-
UFRGS Lc 8	2,2.10 <sup>7</sup>	1,9.10 <sup>5</sup>	1,3.10 <sup>4</sup>
UFRGS Lc 9	2,5.10 <sup>8</sup>	1,2.10 <sup>8</sup>	9,8.10 <sup>7</sup>
UFRGS Lc 11	2,2.10 <sup>8</sup>	1,0.10 <sup>7</sup>	8,4.10 <sup>6</sup>
UFRGS Lc 322	2,5.10 <sup>7</sup>	1,4.10 <sup>7</sup>	2,0.10 <sup>7</sup>
UFRGS Lc 329	2,4.10 <sup>8</sup>	1,4.10 <sup>8</sup>	2,3.10 <sup>7</sup>
UFRGS Lc 336	3,7.10 <sup>7</sup>	-	-
UFRGS Lc 340	8,3.10 <sup>7</sup>	2,2.10 <sup>5</sup>	3,1.10 <sup>5</sup>
UFRGS Lc 348	6,3.10 <sup>7</sup>	-	-
UFRGS Lc 356	9,7.10 <sup>7</sup>	6,9.10 <sup>7</sup>	1,3.10 <sup>7</sup>
UFRGS Lc 372	1,2.10 <sup>8</sup>	1,6.10 <sup>8</sup>	1,8.10 <sup>8</sup>
UFRGS Lc 516	1,5.10 <sup>8</sup>	1,8.10 <sup>4</sup>	-
UFRGS Lc 517	7,9.10 <sup>7</sup>	2,3.10 <sup>4</sup>	-
UFRGS Lc 520	6,5.10 <sup>7</sup>	6,7.10 <sup>6</sup>	7,1.10 <sup>4</sup>
UFRGS Lc 523	8,4.10 <sup>7</sup>	8,7.10 <sup>3</sup>	-
UFRGS Lc 547	8,7.10 <sup>7</sup>	9,8.10 <sup>5</sup>	2,5.10 <sup>4</sup>
UFRGS Lc 586	1,2.10 <sup>7</sup>	-	-
UFRGS Lc 594	2,2.10 <sup>7</sup>	8,3.10 <sup>4</sup>	-
UFRGS Lc 596	6,9.10 <sup>7</sup>	3,0.10 <sup>7</sup>	2,2.10 <sup>7</sup>
UFRGS Lc 597	9,6.10 <sup>6</sup>	6,7.10 <sup>4</sup>	-
UFRGS Lc 601	1,5.10 <sup>8</sup>	6,9.10 <sup>7</sup>	1,6.10 <sup>7</sup>

Tabela 5 – Continuação.

Rizóbio	Tratamentos		
	pH 6,8	pH 4,2	pH 4,2 + Al <sup>3+</sup>
<b>Isolados</b>	-----UFC.mL <sup>-1</sup> -----		
UFRGS Lc 602	9,0.10 <sup>7</sup>	2,1.10 <sup>5</sup>	1,4.10 <sup>5</sup>
UFRGS Lc 605	1,4.10 <sup>8</sup>	6,6.10 <sup>7</sup>	1,3.10 <sup>6</sup>
UFRGS Lc 607	1,0.10 <sup>8</sup>	7,0.10 <sup>7</sup>	6,9.10 <sup>7</sup>
UFRGS Lc 609	1,9.10 <sup>8</sup>	9,3.10 <sup>7</sup>	8,9.10 <sup>7</sup>
UFRGS Lc 610	9,5.10 <sup>7</sup>	-	-
UFRGS Lc 614	1,0.10 <sup>8</sup>	8,7.10 <sup>7</sup>	7,1.10 <sup>7</sup>
UFRGS Lg 74	7,2.10 <sup>7</sup>	1,4.10 <sup>6</sup>	8,7.10 <sup>3</sup>
UFRGS Lg 85	7,5.10 <sup>7</sup>	8,6.10 <sup>3</sup>	7,9.10 <sup>3</sup>
UFRGS Lg 88	6,8.10 <sup>7</sup>	9,4.10 <sup>5</sup>	6,9.10 <sup>4</sup>
UFRGS Ls 1	2,2.10 <sup>7</sup>	-	-
UFRGS Ls 5	1,8.10 <sup>7</sup>	-	-
UFRGS Ls 33	1,6.10 <sup>7</sup>	-	-
UFRGS Ls 36	1,2.10 <sup>7</sup>	-	-
UFRGS Ls 45	1,8.10 <sup>7</sup>	-	-
UFRGS Ls 46	8,1.10 <sup>7</sup>	-	-
UFRGS Lu 9	1,5.10 <sup>7</sup>	-	-
UFRGS Lu 14	1,7.10 <sup>7</sup>	-	-
UFRGS Lu 16	1,7.10 <sup>7</sup>	-	-
UFRGS Lu 19	1,8.10 <sup>7</sup>	-	-
UFRGS Lu 21	1,4.10 <sup>7</sup>	-	-
UFRGS Lu 25	1,3.10 <sup>7</sup>	1,9.10 <sup>6</sup>	1,0.10 <sup>6</sup>
UFRGS Lu 26	7,1.10 <sup>7</sup>	-	-
UFRGS Lu 56	6,8.10 <sup>8</sup>	7,4.10 <sup>7</sup>	7,7.10 <sup>7</sup>
UFRGS Lu 57	6,7.10 <sup>8</sup>	6,9.10 <sup>7</sup>	5,2.10 <sup>7</sup>
UFRGS Lu 59	7,0.10 <sup>7</sup>	7,0.10 <sup>7</sup>	7,6.10 <sup>7</sup>
UFRGS Lu 67	1,9.10 <sup>7</sup>	2,0.10 <sup>7</sup>	6,5.10 <sup>6</sup>
UFRGS Lu 71	7,3.10 <sup>7</sup>	-	-

Legenda: MWC = Meio de Wood e Cooper; UFC = Unidades formadoras de colônias; mL = mililitros; SEMIA = Sessão de Microbiologia Agrícola (Coleção Brasileira Oficial de rizóbios); UFRGS = Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Lc = *Lotus corniculatus*; Lg = *Lotus glaber* (sm *L. tenuis*); Ls = *Lotus subbiflorus*; Lu = *Lotus uliginosus*.

Tendo em vista, os resultados obtidos neste experimento, em que 20 dos 52 isolados estudados foram resistentes a pH 4,2 e, dentre os resistentes, 16 foram também resistentes a 50µM de alumínio tóxico, pode-se observar que

a resistência dos rizóbios a baixo pH é indicativo de resistência a alumínio. Resultados semelhantes foram obtidos por Thornton e Davey (1983) e Marriell (1984), mas, no entanto, é necessário que o organismo seja resistente e cresça em pH baixo antes de se avaliar sua resistência ao alumínio tóxico (Sá, 2001). Diferentes mecanismos de resistência à acidez e ao alumínio tóxico têm sido encontrados em isolados de rizóbio (Cunningham e Munns, 1984; Bushby, 1990; Mukherjee e Asanuma, 1998; Macció et al., 2002; Watkin et al., 2003 e Barberi et al., 2004), como a diminuição da quantidade de carga negativa na superfície celular, diminuindo a ligação com o alumínio; a acumulação de fosfato inorgânico no interior da célula, neutralizando o efeito do alumínio pela formação de complexos insolúveis biologicamente não tóxicos; o aumento dos níveis de potássio e fósforo ligados à manutenção do pH interno e maior produção de exopolissacarídeos.

A ausência de crescimento de 32 dos isolados de rizóbios estudados, pode ter sido causada por diversos fatores, como, por exemplo, a diminuição da síntese de proteínas pelas bactérias, o que, segundo Aarons e Graham (1991), pode afetar o crescimento bacteriano. Esta ausência do crescimento de rizóbio perante a exposição à acidez sugere que alguns processos citoplasmáticos da bactéria são sensíveis a esse fator (Hungria e Vargas, 2000). Peick et al. (1999) mostraram que a redução do pH afetou a síntese de diferentes proteínas em estirpes de *Rhizobium tropici* e *R. etli*. Por outro lado, para Correa e Barneix (1997) a resistência à acidez, por estirpes de *R. loti* é um fenômeno complexo que envolve mecanismos constitutivos tais como permeabilidade da membrana externa como resposta adaptativa ao pH do meio, incluindo o estágio de crescimento do rizóbio e mudanças na expressão de proteínas.

Entre as estirpes liberadas para produção de inoculantes para *Lotus* spp, as cinco estudadas – SEMIA 806, SEMIA 816, SEMIA 830, SEMIA 839 e SEMIA 849 – foram sensíveis à concentração de 50 $\mu$ M de alumínio tóxico, e somente a estirpe de *Mesorhizobium loti*, SEMIA 849, apresentou resistência a pH 4,2. A estirpe de *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 (CIAT 899), utilizada como padrão, se mostrou resistente tanto ao pH ácido como ao alumínio tóxico. Resultado semelhante foi obtido por Sá (2001), no estudo de isolados de feijoeiros em solos ácidos do Cunha (SP), em que observou que a SEMIA 4077

apresenta resistência à acidez e ao alumínio. Graham et al. (1982), Graham et al. (1994) e Riccillo et al. (2000 a, b), também, relataram que em seus estudos a estirpe de *R. tropici* tolera vários estresses abióticos, incluindo baixo pH e alumínio tóxico.

Ao final do período de incubação, observou-se que o pH do caldo (Tabela 6) de todas as culturas se manteve entre 4,2 a 4,8. Estes resultados mostram que a resistência ao pH baixo das bactérias estudadas parece não envolver mecanismos relacionados ao aumento do pH do meio, que pode ser um mecanismo de resistência ao alumínio de alguns rizóbios (Wood,1995). Ribeiro Júnior et al. (1988), durante o estudo da tolerância de *Bradyrhizobium* sp. de Mimosoideae à acidez em meio de cultura, observaram que as estirpes tolerantes cresceram em meio ácido com ou sem alumínio, sem induzir modificações iniciais ou posteriores no pH do meio, obtendo assim resultados semelhantes ao do presente estudo. Segundo Graham et al. (1994), a tolerância ao pH ácido em rizóbio depende da habilidade em manter o pH intracelular entre 7,2 e 7,5 quando o pH externo é ácido.

#### **4.2. Resistência dos rizóbios ao estresse salino por alta concentração de cloreto de sódio e de cloreto de potássio**

No experimento para avaliação da resistência dos 52 isolados de rizóbios para *Lotus* spp ao estresse salino por diferentes concentrações de sódio, na forma de NaCl (cloreto de sódio), em meio LM, observou-se que alguns dos isolados de rizóbios estudados apresentaram resistência na faixa de 4 a 12 gL<sup>-1</sup> de NaCl (Tabela 7), com condutividade elétrica entre 5,66 a 11,97 dSm<sup>-1</sup>. Por outro lado, ao se avaliar o crescimento dos rizóbios nas concentrações de 16 a 20 gL<sup>-1</sup> de NaCl (condutividade elétrica de 13,56 e 15,73 dSm<sup>-1</sup>, respectivamente) no meio de cultura, observou-se que alguns isolados não apresentaram crescimento, enquanto que outros obtiveram crescimento de populações da ordem de 10<sup>3</sup> até 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, mostrando-se assim não resistentes. De modo geral, muitos dos rizóbios diminuíram o crescimento de 10<sup>9</sup> para até 10<sup>3</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> conforme a concentração de NaCl no meio de cultura. Entre os 52 isolados de rizóbios para *Lotus* sp., 39 cresceram até a concentração de 4 gL<sup>-1</sup> de NaCl. Destes, 27 cresceram até 8

Tabela 6 – Valores do pH do caldo por rizóbios de *Lotus* spp ao final do período de incubação (7 dias).

Rizóbios	Meio pH 6,8	Meio pH 4,2	Meio pH 4,2 + 50 $\mu$ M Al <sup>3+</sup>
<b>Estirpes</b>			
SEMIA 4077	7,8	4,7	4,8
SEMIA 806	7,1	4,3	4,3
SEMIA 816	7,6	4,4	4,4
SEMIA 830	7,0	4,3	4,3
SEMIA 839	6,7	4,4	4,3
SEMIA 849	8,0	4,3	4,4
<b>Isolados</b>			
UFRGS Lc 2	7,5	4,5	4,4
UFRGS Lc 3	7,3	4,6	4,4
UFRGS Lc 4	6,6	4,3	4,3
UFRGS Lc 5	7,4	4,3	4,3
UFRGS Lc 7	7,4	4,3	4,2
UFRGS Lc 8	7,0	4,3	4,3
UFRGS Lc 9	6,8	4,3	4,3
UFRGS Lc 11	7,1	4,6	4,5
UFRGS Lc 322	7,5	4,3	4,3
UFRGS Lc 329	7,2	4,3	4,3
UFRGS Lc 336	6,6	4,1	4,0
UFRGS Lc 340	7,3	4,3	4,3
UFRGS Lc 348	7,1	4,3	4,3
UFRGS Lc 356	7,6	4,3	4,3
UFRGS Lc 372	7,4	4,4	4,4
UFRGS Lc 516	7,3	4,3	4,2
UFRGS Lc 517	7,4	4,2	4,2
UFRGS Lc 520	7,5	4,2	4,2
UFRGS Lc 523	7,1	4,2	4,2
UFRGS Lc 547	7,3	4,9	4,3
UFRGS Lc 586	7,4	4,2	4,2
UFRGS Lc 594	7,1	4,2	4,2
UFRGS Lc 596	7,4	4,3	4,3
UFRGS Lc 597	7,0	4,3	4,2
UFRGS Lc 601	7,3	4,3	4,2
UFRGS Lc 602	7,3	4,3	4,3
UFRGS Lc 605	7,3	4,3	4,2
UFRGS Lc 607	7,7	4,4	4,4
UFRGS Lc 609	7,2	4,3	4,3
UFRGS Lc 610	7,0	4,3	4,2
UFRGS Lc 614	7,2	4,4	4,3

Tabela 6 – Continuação.

Rizóbios	Meio pH 6,8	Meio pH 4,2	Meio pH 4,2 + 50 $\mu$ M Al <sup>3+</sup>
<b>Isolados</b>			
UFRGS Lg 74	7,3	4,3	4,2
UFRGS Lg 85	7,0	4,3	4,3
UFRGS Lg 88	7,0	4,3	4,3
UFRGS Ls 1	7,2	4,3	4,2
UFRGS Ls 5	7,2	4,2	4,2
UFRGS Ls 33	6,9	4,3	4,2
UFRGS Ls 36	7,0	4,2	4,2
UFRGS Ls 45	7,2	4,2	4,0
UFRGS Ls 46	7,5	4,2	4,2
UFRGS Lu 9	6,6	4,2	4,1
UFRGS Lu 14	6,5	4,2	4,0
UFRGS Lu 16	6,3	4,2	4,2
UFRGS Lu 19	7,1	4,2	4,2
UFRGS Lu 21	7,0	4,3	4,2
UFRGS Lu 25	6,4	4,2	4,2
UFRGS Lu 26	7,1	4,2	4,2
UFRGS Lu 56	7,5	4,5	4,4
UFRGS Lu 57	7,4	4,5	4,4
UFRGS Lu 59	7,6	4,6	4,5
UFRGS Lu 67	6,8	4,3	4,2
UFRGS Lu 71	7,2	4,2	4,2

Legenda: SEMIA = Sessão de Microbiologia Agrícola (Coleção Brasileira Oficial de rizóbios); UFRGS = Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Lc = *Lotus corniculatus*; Lg = *Lotus glaber* (sm *L. tenuis*); Ls = *Lotus subbiflorus*; Lu = *Lotus uliginosus*.

gL<sup>-1</sup>, e apenas 11 (UFRGS Lc 7, Lc 11, Lc 340, Lc 348, Lc 372, Lc 516, Lc 520, Lc 523, Lc 547, Lu 56 e Lu 59) cresceram até a concentração de 12 gL<sup>-1</sup> de NaCl, com populações da ordem de 10<sup>7</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. Nesta avaliação, 12 rizóbios (UFRGS Lc 2, Lc 3, Lc 4, Lc 596, Lc 602, Lc 614, Lg 88, Ls 45, Ls 46, Lu 25 e Lu 67) foram considerados sensíveis, pois não apresentaram crescimento bacteriano a partir da concentração de 4 gL<sup>-1</sup> de NaCl em meio de cultura. Resultados semelhantes foram obtidos por Freitas et al. (2007), em que nos testes de resistência à salinidade com sódio, observaram que os isolados de rizóbios apresentavam crescimentos até o nível de 12 gL<sup>-1</sup> de NaCl nos meios ajustados para pH 6,8, e a sensibilidade ao sal foi verificada a partir da adição de 16 gL<sup>-1</sup>. Por outro lado, Medeiros et al. (2007) obtiveram, no estudo de tolerância de rizóbios à salinidade do município de Mossoró (RN), isolados que

Tabela 7 – Crescimento de rizóbios de *Lotus* spp em meio levedura-manitol com diferentes concentrações de NaCl, após sete dias de incubação.

Rizóbios	Concentrações de NaCl (gL <sup>-1</sup> )					
	0,1	4	8	12	16	20
<b>Estirpes</b>	-----UFC.mL <sup>-1</sup> -----					
SEMIA 4077	7,9.10 <sup>8</sup>	6,0.10 <sup>8</sup>	7,6.10 <sup>8</sup>	8,8.10 <sup>7</sup>	8,2.10 <sup>7</sup>	7,2.10 <sup>7</sup>
SEMIA 806	2,1.10 <sup>8</sup>	2,1.10 <sup>8</sup>	1,8.10 <sup>8</sup>	-	-	-
SEMIA 816	9,7.10 <sup>7</sup>	9,2.10 <sup>7</sup>	8,4.10 <sup>7</sup>	6,4.10 <sup>7</sup>	8,8.10 <sup>5</sup>	9,0.10 <sup>4</sup>
SEMIA 830	8,7.10 <sup>8</sup>	1,3.10 <sup>9</sup>	1,0.10 <sup>9</sup>	8,9.10 <sup>7</sup>	-	-
SEMIA 839	2,1.10 <sup>7</sup>	4,8.10 <sup>3</sup>	-	-	-	-
SEMIA 849	8,5.10 <sup>7</sup>	8,0.10 <sup>7</sup>	8,7.10 <sup>7</sup>	8,3.10 <sup>7</sup>	6,7.10 <sup>8</sup>	3,4.10 <sup>7</sup>
<b>Isolados</b>						
UFRGS Lc 2	6,2.10 <sup>8</sup>	6,9.10 <sup>3</sup>	5,5.10 <sup>3</sup>	-	-	-
UFRGS Lc 3	7,5.10 <sup>7</sup>	6,4.10 <sup>4</sup>	7,0.10 <sup>6</sup>	8,4.10 <sup>6</sup>	-	-
UFRGS Lc 4	7,3.10 <sup>8</sup>	2,9.10 <sup>6</sup>	8,7.10 <sup>6</sup>	6,8.10 <sup>4</sup>	-	-
UFRGS Lc 5	7,8.10 <sup>7</sup>	6,1.10 <sup>7</sup>	1,1.10 <sup>7</sup>	6,5.10 <sup>4</sup>	-	-
UFRGS Lc 7	8,7.10 <sup>8</sup>	6,3.10 <sup>8</sup>	6,1.10 <sup>8</sup>	6,0.10 <sup>7</sup>	7,9.10 <sup>5</sup>	1,7.10 <sup>5</sup>
UFRGS Lc 8	5,8.10 <sup>7</sup>	5,8.10 <sup>6</sup>	5,7.10 <sup>7</sup>	6,7.10 <sup>5</sup>	7,8.10 <sup>3</sup>	3,7.10 <sup>3</sup>
UFRGS Lc 9	8,0.10 <sup>8</sup>	7,6.10 <sup>8</sup>	6,2.10 <sup>8</sup>	7,6.10 <sup>6</sup>	-	-
UFRGS Lc 11	2,2.10 <sup>8</sup>	7,5.10 <sup>8</sup>	5,7.10 <sup>8</sup>	6,7.10 <sup>7</sup>	2,4.10 <sup>5</sup>	1,6.10 <sup>4</sup>
UFRGS Lc 322	3,7.10 <sup>7</sup>	2,4.10 <sup>8</sup>	2,1.10 <sup>8</sup>	1,3.10 <sup>6</sup>	9,6.10 <sup>5</sup>	1,2.10 <sup>5</sup>
UFRGS Lc 329	2,6.10 <sup>8</sup>	1,2.10 <sup>8</sup>	3,4.10 <sup>6</sup>	8,1.10 <sup>6</sup>	-	-
UFRGS Lc 336	1,6.10 <sup>8</sup>	2,0.10 <sup>8</sup>	3,3.10 <sup>6</sup>	2,2.10 <sup>6</sup>	-	-
UFRGS Lc 340	6,3.10 <sup>8</sup>	7,1.10 <sup>8</sup>	7,2.10 <sup>8</sup>	5,5.10 <sup>7</sup>	1,5.10 <sup>5</sup>	1,5.10 <sup>5</sup>
UFRGS Lc 348	8,4.10 <sup>8</sup>	8,0.10 <sup>8</sup>	1,1.10 <sup>8</sup>	6,4.10 <sup>7</sup>	-	-
UFRGS Lc 356	8,3.10 <sup>7</sup>	8,7.10 <sup>7</sup>	8,1.10 <sup>7</sup>	1,4.10 <sup>4</sup>	-	-
UFRGS Lc 372	6,1.10 <sup>8</sup>	6,4.10 <sup>8</sup>	1,0.10 <sup>8</sup>	9,7.10 <sup>7</sup>	1,1.10 <sup>5</sup>	-
UFRGS Lc 516	9,3.10 <sup>8</sup>	7,1.10 <sup>8</sup>	6,2.10 <sup>8</sup>	9,4.10 <sup>7</sup>	1,4.10 <sup>5</sup>	-
UFRGS Lc 517	7,4.10 <sup>8</sup>	6,7.10 <sup>8</sup>	5,8.10 <sup>8</sup>	9,1.10 <sup>7</sup>	-	-
UFRGS Lc 520	6,4.10 <sup>8</sup>	8,8.10 <sup>7</sup>	1,4.10 <sup>7</sup>	9,9.10 <sup>7</sup>	-	-
UFRGS Lc 523	2,0.10 <sup>8</sup>	8,9.10 <sup>7</sup>	1,0.10 <sup>8</sup>	8,3.10 <sup>7</sup>	-	-
UFRGS Lc 547	1,0.10 <sup>9</sup>	8,4.10 <sup>8</sup>	6,9.10 <sup>8</sup>	1,0.10 <sup>7</sup>	-	-
UFRGS Lc 586	9,0.10 <sup>8</sup>	1,5.10 <sup>8</sup>	1,2.10 <sup>8</sup>	8,0.10 <sup>5</sup>	2,1.10 <sup>5</sup>	1,6.10 <sup>5</sup>
UFRGS Lc 594	1,3.10 <sup>9</sup>	1,1.10 <sup>9</sup>	1,0.10 <sup>9</sup>	1,5.10 <sup>6</sup>	1,3.10 <sup>6</sup>	-
UFRGS Lc 596	7,5.10 <sup>7</sup>	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 597	1,3.10 <sup>9</sup>	1,2.10 <sup>9</sup>	7,8.10 <sup>8</sup>	1,6.10 <sup>6</sup>	2,2.10 <sup>6</sup>	8,8.10 <sup>5</sup>
UFRGS Lc 601	1,3.10 <sup>9</sup>	8,1.10 <sup>8</sup>	1,5.10 <sup>8</sup>	1,5.10 <sup>6</sup>	1,9.10 <sup>6</sup>	1,6.10 <sup>5</sup>



Tabela 7 – Continuação.

Rizóbios	Concentrações de NaCl (gL <sup>-1</sup> )					
	0,1	4	8	12	16	20
<b>Isolados</b>	-----UFC.mL <sup>-1</sup> -----					
UFRGS Lc 602	6,1.10 <sup>7</sup>	6,5.10 <sup>5</sup>	-	-	-	-
UFRGS Lc 605	9,5.10 <sup>7</sup>	9,0.10 <sup>4</sup>	8,1.10 <sup>4</sup>	-	-	-
UFRGS Lc 607	1,2.10 <sup>9</sup>	8,8.10 <sup>8</sup>	6,7.10 <sup>7</sup>	8,2.10 <sup>5</sup>	1,8.10 <sup>5</sup>	1,1.10 <sup>4</sup>
UFRGS Lc 609	1,1.10 <sup>8</sup>	1,3.10 <sup>7</sup>	1,1.10 <sup>7</sup>	9,2.10 <sup>6</sup>	8,6.10 <sup>5</sup>	7,6.10 <sup>5</sup>
UFRGS Lc 610	2,2.10 <sup>8</sup>	9,6.10 <sup>8</sup>	6,0.10 <sup>8</sup>	1,2.10 <sup>6</sup>	1,5.10 <sup>5</sup>	-
UFRGS Lc 614	7,5.10 <sup>7</sup>	6,5.10 <sup>3</sup>	4,9.10 <sup>3</sup>	-	-	-
UFRGS Lg 74	1,1.10 <sup>8</sup>	8,7.10 <sup>7</sup>	1,0.10 <sup>8</sup>	6,5.10 <sup>5</sup>	-	-
UFRGS Lg 85	1,4.10 <sup>8</sup>	9,5.10 <sup>7</sup>	1,2.10 <sup>7</sup>	-	-	-
UFRGS Lg 88	1,1.10 <sup>7</sup>	8,6.10 <sup>6</sup>	-	-	-	-
UFRGS Ls 1	1,3.10 <sup>8</sup>	9,8.10 <sup>7</sup>	-	-	-	-
UFRGS Ls 5	6,1.10 <sup>8</sup>	5,5.10 <sup>8</sup>	-	-	-	-
UFRGS Ls 33	9,0.10 <sup>8</sup>	2,5.10 <sup>8</sup>	-	-	-	-
UFRGS Ls 36	2,7.10 <sup>8</sup>	2,5.10 <sup>8</sup>	-	-	-	-
UFRGS Ls 45	1,3.10 <sup>7</sup>	2,1.10 <sup>4</sup>	1,0.10 <sup>4</sup>	1,6.10 <sup>4</sup>	-	-
UFRGS Ls 46	8,1.10 <sup>7</sup>	8,2.10 <sup>4</sup>	-	-	-	-
UFRGS Lu 9	2,8.10 <sup>8</sup>	3,0.10 <sup>8</sup>	-	-	-	-
UFRGS Lu 14	2,6.10 <sup>8</sup>	2,2.10 <sup>8</sup>	-	-	-	-
UFRGS Lu 16	6,8.10 <sup>8</sup>	2,6.10 <sup>8</sup>	-	-	-	-
UFRGS Lu 19	3,2.10 <sup>8</sup>	3,1.10 <sup>8</sup>	-	-	-	-
UFRGS Lu 21	2,9.10 <sup>8</sup>	2,8.10 <sup>8</sup>	-	-	-	-
UFRGS Lu 25	1,7.10 <sup>7</sup>	1,4.10 <sup>5</sup>	-	-	-	-
UFRGS Lu 26	8,1.10 <sup>8</sup>	6,0.10 <sup>8</sup>	-	-	-	-
UFRGS Lu 56	7,1.10 <sup>7</sup>	7,6.10 <sup>7</sup>	7,8.10 <sup>7</sup>	6,3.10 <sup>7</sup>	-	-
UFRGS Lu 57	1,3.10 <sup>9</sup>	7,4.10 <sup>7</sup>	6,4.10 <sup>7</sup>	6,4.10 <sup>6</sup>	-	-
UFRGS Lu 59	1,1.10 <sup>9</sup>	8,4.10 <sup>8</sup>	5,3.10 <sup>8</sup>	7,5.10 <sup>7</sup>	5,9.10 <sup>3</sup>	4,7.10 <sup>3</sup>
UFRGS Lu 67	7,1.10 <sup>7</sup>	-	-	-	-	-
UFRGS Lu 71	7,4.10 <sup>8</sup>	1,1.10 <sup>8</sup>	1,1.10 <sup>6</sup>	-	-	-

Legenda: NaCl = Cloreto de Sódio; gL<sup>-1</sup> = grama por litro; UFC = Unidades formadoras de colônias; mL = mililitros; SEMIA = Sessão de Microbiologia Agrícola (Coleção Brasileira Oficial de rizóbios); UFRGS = Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Lc = *Lotus corniculatus*; Lg = *Lotus glaber* (sm *L. tenuis*); Ls = *Lotus subbiflorus*; Lu = *Lotus uliginosus*.

apresentaram crescimento na concentração 15,47 gL<sup>-1</sup> de NaCl, em 28°C, enquanto que os isolados de rizóbios dos municípios de Alto do Rodrigues (RN) e Ceará-Mirim (RN) obtiveram crescimento na concentração 12,84 e 7,28

$\text{gL}^{-1}$  de NaCl, respectivamente, sendo portanto, menos tolerantes à salinidade. Singh et al. (2008), relatam que estirpes de *Rhizobium* para a espécie de *Trigonella foenumgraecum* foram capazes de crescer em meio de cultura contendo 1% de NaCl, mas foram incapazes de crescer em concentrações mais altas, mostrando assim que os isolados eram sensíveis ao sal, enquanto que, as concentrações toleradas de NaCl pelas estirpes, de estudo dos autores Nóbrega et al. (2004), variaram de 2 até  $30 \text{ gL}^{-1}$ . Assim é possível observar que existem resultados bem diversificados quanto a informações sobre as diferentes capacidades de bactérias diazotróficas em tolerar salinidade (Chen et al., 1995; Sherebn et al., 1998; Rasa et al., 2001; Tamimi, 2001; Hungria et al., 2001), e as faixas de tolerância das espécies diazotróficas simbióticas variaram de 0 a  $60 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl.

Entre as estirpes de *Mesorhizobium loti* liberadas para a produção de inoculantes, somente a SEMIA 849 apresentou resistência em todas as concentrações testadas (4 a  $20 \text{ gL}^{-1}$ ), enquanto que, as SEMIA 816 e SEMIA 830 apresentaram crescimento nas concentrações de 4 a  $12 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl, a SEMIA 806 com crescimento até a concentração de  $8 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl, e a SEMIA 839 foi considerada sensível ao estresse salino por NaCl, pois apresentou populações da ordem de  $10^3 \text{ UFC.mL}^{-1}$  na concentração de  $4 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl e não desenvolveu crescimento bacteriano nas concentrações de 8 a  $20 \text{ gL}^{-1}$  de NaCl.

Em relação ao estresse salino por diferentes concentrações de potássio, na forma de KCl (cloreto de potássio), em meio LM, observou-se que os 52 isolados de rizóbios para *Lotus sp.*, variaram seu crescimento entre as concentrações de 4 a  $20 \text{ gL}^{-1}$  (Tabela 8). Sendo que, assim como, no estudo de resistência ao estresse salino por sódio, o crescimento bacteriano das células viáveis dos isolados de rizóbios apresentou diminuição com o aumento da concentração de KCl no meio de cultura, produzindo populações da ordem de  $10^9$  para até  $10^3 \text{ UFC.mL}^{-1}$ . Dos 52 isolados para *Lotus sp.*, 46 cresceram na concentração de  $4 \text{ gL}^{-1}$ . Destes, 28 cresceram em  $8 \text{ gL}^{-1}$ , 19 em  $12 \text{ gL}^{-1}$ , 12 em  $16 \text{ gL}^{-1}$  e 6 cresceram na concentração de  $20 \text{ gL}^{-1}$  de KCl, sendo UFRGS Lc 2, Lc 3, Lc 372, Lc 516, Lc 517, Lc 520. E, ainda, 6 isolados foram considerados sensíveis, UFRGS Lu 21, Lu 26, Lu 56, Lu 67, Lc 348, Lc 602.

Tabela 8 – Crescimento de rizóbios de *Lotus* spp em meio levedura-manitol com diferentes concentrações de KCl, após sete dias de incubação.

Rizóbios	Concentrações de KCl (gL <sup>-1</sup> )					
	0*	4	8	12	16	20
<b>Estirpes</b>	-----UFC.mL <sup>-1</sup> -----					
SEMIA 4077	1,1.10 <sup>9</sup>	1,3.10 <sup>9</sup>	9,4.10 <sup>8</sup>	8,1.10 <sup>8</sup>	3,2.10 <sup>8</sup>	1,4.10 <sup>8</sup>
SEMIA 806	1,5.10 <sup>9</sup>	1,0.10 <sup>9</sup>	6,8.10 <sup>8</sup>	1,4.10 <sup>8</sup>	8,8.10 <sup>6</sup>	1,3.10 <sup>5</sup>
SEMIA 816	1,1.10 <sup>9</sup>	2,1.10 <sup>9</sup>	1,6.10 <sup>9</sup>	1,6.10 <sup>9</sup>	1,5.10 <sup>6</sup>	-
SEMIA 830	5,3.10 <sup>8</sup>	1,4.10 <sup>9</sup>	1,6.10 <sup>9</sup>	1,7.10 <sup>9</sup>	9,6.10 <sup>8</sup>	1,0.10 <sup>5</sup>
SEMIA 839	7,8.10 <sup>8</sup>	1,2.10 <sup>8</sup>	2,0.10 <sup>4</sup>	1,3.10 <sup>4</sup>	-	-
SEMIA 849	1,3.10 <sup>9</sup>	1,4.10 <sup>9</sup>	9,5.10 <sup>8</sup>	1,1.10 <sup>9</sup>	8,6.10 <sup>8</sup>	1,3.10 <sup>8</sup>
<b>Isolados</b>						
UFRGS Lc 2	1,2.10 <sup>9</sup>	1,1.10 <sup>9</sup>	1,2.10 <sup>9</sup>	9,2.10 <sup>8</sup>	9,6.10 <sup>8</sup>	7,5.10 <sup>8</sup>
UFRGS Lc 3	1,2.10 <sup>9</sup>	8,7.10 <sup>8</sup>	7,9.10 <sup>8</sup>	6,8.10 <sup>8</sup>	6,2.10 <sup>8</sup>	2,5.10 <sup>7</sup>
UFRGS Lc 4	1,5.10 <sup>9</sup>	1,2.10 <sup>9</sup>	6,8.10 <sup>8</sup>	1,0.10 <sup>7</sup>	7,2.10 <sup>6</sup>	-
UFRGS Lc 5	1,0.10 <sup>9</sup>	1,1.10 <sup>9</sup>	1,2.10 <sup>9</sup>	2,2.10 <sup>7</sup>	3,8.10 <sup>6</sup>	9,4.10 <sup>5</sup>
UFRGS Lc 7	1,2.10 <sup>9</sup>	9,1.10 <sup>8</sup>	1,3.10 <sup>9</sup>	1,9.10 <sup>7</sup>	1,4.10 <sup>6</sup>	1,4.10 <sup>6</sup>
UFRGS Lc 8	1,5.10 <sup>9</sup>	1,2.10 <sup>9</sup>	1,7.10 <sup>9</sup>	2,4.10 <sup>8</sup>	1,0.10 <sup>7</sup>	1,3.10 <sup>6</sup>
UFRGS Lc 9	1,5.10 <sup>9</sup>	1,2.10 <sup>9</sup>	9,2.10 <sup>8</sup>	2,3.10 <sup>6</sup>	9,7.10 <sup>6</sup>	2,3.10 <sup>6</sup>
UFRGS Lc 11	1,9.10 <sup>9</sup>	1,1.10 <sup>9</sup>	1,1.10 <sup>9</sup>	8,2.10 <sup>8</sup>	2,2.10 <sup>6</sup>	2,4.10 <sup>5</sup>
UFRGS Lc 322	1,5.10 <sup>9</sup>	8,8.10 <sup>8</sup>	1,4.10 <sup>9</sup>	8,2.10 <sup>8</sup>	9,6.10 <sup>8</sup>	7,2.10 <sup>6</sup>
UFRGS Lc 329	1,2.10 <sup>9</sup>	7,3.10 <sup>8</sup>	8,1.10 <sup>7</sup>	7,2.10 <sup>7</sup>	1,4.10 <sup>8</sup>	2,3.10 <sup>6</sup>
UFRGS Lc 336	3,3.10 <sup>8</sup>	5,9.10 <sup>8</sup>	1,0.10 <sup>5</sup>	1,6.10 <sup>4</sup>	6,2.10 <sup>8</sup>	8,1.10 <sup>5</sup>
UFRGS Lc 340	9,9.10 <sup>8</sup>	6,6.10 <sup>8</sup>	8,1.10 <sup>7</sup>	6,7.10 <sup>5</sup>	1,0.10 <sup>6</sup>	1,2.10 <sup>5</sup>
UFRGS Lc 348	7,4.10 <sup>7</sup>	1,2.10 <sup>5</sup>	1,0.10 <sup>4</sup>	-	-	-
UFRGS Lc 356	8,2.10 <sup>8</sup>	8,2.10 <sup>7</sup>	6,1.10 <sup>8</sup>	6,5.10 <sup>6</sup>	8,6.10 <sup>5</sup>	1,2.10 <sup>5</sup>
UFRGS Lc 372	1,6.10 <sup>9</sup>	1,2.10 <sup>9</sup>	1,0.10 <sup>9</sup>	8,2.10 <sup>8</sup>	9,4.10 <sup>7</sup>	7,2.10 <sup>7</sup>
UFRGS Lc 516	1,9.10 <sup>9</sup>	1,5.10 <sup>9</sup>	1,0.10 <sup>9</sup>	1,5.10 <sup>9</sup>	1,2.10 <sup>9</sup>	8,3.10 <sup>7</sup>
UFRGS Lc 517	1,4.10 <sup>9</sup>	1,6.10 <sup>9</sup>	1,3.10 <sup>9</sup>	1,1.10 <sup>9</sup>	9,9.10 <sup>8</sup>	8,1.10 <sup>8</sup>
UFRGS Lc 520	1,2.10 <sup>9</sup>	1,2.10 <sup>9</sup>	1,1.10 <sup>9</sup>	1,1.10 <sup>9</sup>	7,7.10 <sup>8</sup>	8,7.10 <sup>7</sup>
UFRGS Lc 523	1,5.10 <sup>9</sup>	8,2.10 <sup>8</sup>	2,2.10 <sup>8</sup>	1,6.10 <sup>8</sup>	7,2.10 <sup>6</sup>	7,0.10 <sup>4</sup>
UFRGS Lc 547	9,1.10 <sup>8</sup>	7,9.10 <sup>8</sup>	1,2.10 <sup>8</sup>	8,9.10 <sup>4</sup>	3,8.10 <sup>4</sup>	9,5.10 <sup>3</sup>
UFRGS Lc 586	1,2.10 <sup>9</sup>	8,1.10 <sup>8</sup>	1,1.10 <sup>8</sup>	1,0.10 <sup>6</sup>	-	-
UFRGS Lc 594	1,0.10 <sup>9</sup>	1,6.10 <sup>8</sup>	8,1.10 <sup>6</sup>	2,5.10 <sup>5</sup>	7,7.10 <sup>4</sup>	1,9.10 <sup>4</sup>
UFRGS Lc 596	1,4.10 <sup>9</sup>	2,3.10 <sup>8</sup>	1,1.10 <sup>7</sup>	7,4.10 <sup>4</sup>	-	-
UFRGS Lc 597	1,7.10 <sup>9</sup>	7,3.10 <sup>7</sup>	1,4.10 <sup>6</sup>	-	-	-
UFRGS Lc 601	1,1.10 <sup>9</sup>	8,5.10 <sup>8</sup>	1,2.10 <sup>6</sup>	1,1.10 <sup>4</sup>	2,5.10 <sup>4</sup>	-

Tabela 8 – Continuação.

Rizóbios	Concentrações de KCl (gL <sup>-1</sup> )					
	0*	4	8	12	16	20
<b>Isolados</b>	-----UFC.mL <sup>-1</sup> -----					
UFRGS Lc 602	6,3.10 <sup>8</sup>	7,5.10 <sup>6</sup>	9,1.10 <sup>4</sup>	-	-	-
UFRGS Lc 605	8,2.10 <sup>8</sup>	7,2.10 <sup>8</sup>	9,6.10 <sup>6</sup>	6,9.10 <sup>4</sup>	1,2.10 <sup>5</sup>	9,4.10 <sup>4</sup>
UFRGS Lc 607	7,6.10 <sup>8</sup>	7,2.10 <sup>8</sup>	6,9.10 <sup>5</sup>	-	-	-
UFRGS Lc 609	1,4.10 <sup>9</sup>	7,7.10 <sup>8</sup>	2,5.10 <sup>7</sup>	7,9.10 <sup>3</sup>	1,2.10 <sup>5</sup>	2,9.10 <sup>4</sup>
UFRGS Lc 610	1,8.10 <sup>9</sup>	1,3.10 <sup>9</sup>	1,5.10 <sup>9</sup>	9,6.10 <sup>5</sup>	2,5.10 <sup>5</sup>	-
UFRGS Lc 614	2,4.10 <sup>9</sup>	1,3.10 <sup>9</sup>	1,5.10 <sup>8</sup>	4,2.10 <sup>5</sup>	8,0.10 <sup>5</sup>	-
UFRGS Lg 74	1,7.10 <sup>9</sup>	2,0.10 <sup>9</sup>	1,8.10 <sup>9</sup>	1,4.10 <sup>9</sup>	1,6.10 <sup>8</sup>	6,5.10 <sup>6</sup>
UFRGS Lg 85	9,8.10 <sup>8</sup>	6,3.10 <sup>8</sup>	7,6.10 <sup>7</sup>	6,9.10 <sup>7</sup>	8,7.10 <sup>4</sup>	-
UFRGS Lg 88	4,7.10 <sup>8</sup>	7,6.10 <sup>7</sup>	6,5.10 <sup>7</sup>	7,6.10 <sup>7</sup>	-	-
UFRGS Ls 1	5,5.10 <sup>8</sup>	2,4.10 <sup>8</sup>	3,7.10 <sup>3</sup>	-	-	-
UFRGS Ls 5	3,4.10 <sup>8</sup>	2,1.10 <sup>8</sup>	2,3.10 <sup>4</sup>	5,9.10 <sup>3</sup>	-	-
UFRGS Ls 33	8,9.10 <sup>8</sup>	8,5.10 <sup>8</sup>	2,5.10 <sup>5</sup>	4,9.10 <sup>5</sup>	-	-
UFRGS Ls 36	9,9.10 <sup>8</sup>	8,7.10 <sup>8</sup>	2,6.10 <sup>5</sup>	9,5.10 <sup>3</sup>	-	-
UFRGS Ls 45	6,9.10 <sup>8</sup>	3,2.10 <sup>8</sup>	9,0.10 <sup>4</sup>	2,0.10 <sup>4</sup>	-	-
UFRGS Ls 46	7,8.10 <sup>8</sup>	6,9.10 <sup>8</sup>	3,4.10 <sup>5</sup>	-	-	-
UFRGS Lu 9	1,1.10 <sup>9</sup>	1,6.10 <sup>8</sup>	2,1.10 <sup>5</sup>	1,8.10 <sup>5</sup>	-	-
UFRGS Lu 14	2,3.10 <sup>8</sup>	1,6.10 <sup>8</sup>	1,2.10 <sup>5</sup>	1,1.10 <sup>4</sup>	-	-
UFRGS Lu 16	3,3.10 <sup>8</sup>	1,7.10 <sup>8</sup>	1,7.10 <sup>5</sup>	2,2.10 <sup>4</sup>	-	-
UFRGS Lu 19	2,4.10 <sup>8</sup>	1,3.10 <sup>8</sup>	8,2.10 <sup>4</sup>	-	-	-
UFRGS Lu 21	3,2.10 <sup>7</sup>	2,6.10 <sup>6</sup>	-	-	-	-
UFRGS Lu 25	2,0.10 <sup>8</sup>	1,3.10 <sup>8</sup>	-	-	-	-
UFRGS Lu 26	6,4.10 <sup>8</sup>	4,9.10 <sup>6</sup>	6,2.10 <sup>5</sup>	2,6.10 <sup>3</sup>	-	-
UFRGS Lu 56	9,7.10 <sup>7</sup>	9,4.10 <sup>6</sup>	7,1.10 <sup>5</sup>	8,5.10 <sup>3</sup>	8,1.10 <sup>3</sup>	7,9.10 <sup>3</sup>
UFRGS Lu 57	5,1.10 <sup>8</sup>	6,7.10 <sup>8</sup>	6,6.10 <sup>8</sup>	8,6.10 <sup>7</sup>	7,6.10 <sup>7</sup>	7,7.10 <sup>4</sup>
UFRGS Lu 59	1,4.10 <sup>9</sup>	1,0.10 <sup>9</sup>	8,4.10 <sup>8</sup>	5,8.10 <sup>8</sup>	8,1.10 <sup>6</sup>	9,2.10 <sup>5</sup>
UFRGS Lu 67	9,3.10 <sup>7</sup>	1,2.10 <sup>4</sup>	1,4.10 <sup>4</sup>	-	-	-
UFRGS Lu 71	1,1.10 <sup>9</sup>	8,3.10 <sup>8</sup>	1,9.10 <sup>6</sup>	2,2.10 <sup>4</sup>	2,2.10 <sup>4</sup>	7,7.10 <sup>3</sup>

Legenda: KCl = Cloreto de Potássio; gL<sup>-1</sup> = grama por litro; 0\* = sem adição de Cloreto de Potássio (concentração de potássio no meio levedura-manitol igual 0,22 gL<sup>-1</sup>); UFC = Unidades formadoras de colônias; mL = mililitros; SEMIA = Sessão de Microbiologia Agrícola (Coleção Brasileira Oficial de rizóbios); UFRGS = Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Lc = *Lotus corniculatus*; Lg = *Lotus glaber* (sm *L. tenuis*); Ls = *Lotus subbiflorus*; Lu = *Lotus uliginosus*.

Em relação às estirpes liberadas para a produção de inoculantes de *Lotus* spp, assim como observado no estudo com NaCl, somente a SEMIA 849 apresentou crescimento de células viáveis em todas as concentrações testadas (4 a 20 gL<sup>-1</sup>) SEMIA 830 obteve crescimento nas concentrações de 4 a 16 gL<sup>-1</sup> de KCl, enquanto que SEMIA 806 e SEMIA 816 apresentaram semelhante crescimento bacteriano entre si nas concentrações de 4 a 12 gL<sup>-1</sup>, com populações na ordem de 10<sup>9</sup> e 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>, e SEMIA 839 demonstrou ser resistente somente na concentração de 4 gL<sup>-1</sup>, obtendo populações na ordem de 10<sup>8</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>.

Os isolados de rizóbios UFRGS Lc 602 e Lu 67 foram sensíveis ao estresse salino tanto em concentrações altas de NaCl quanto de KCl. Segundo Mary et al. (1986), tanto o NaCl quanto o KCl apresentam toxicidade similar em diferentes espécies de rizóbios, o que foi observado nos resultados de 18 isolados de rizóbios para *Lotus* spp neste estudo, sendo eles UFRGS Lc 7, Lc 9, Lc 11, Lc 356, Lc 523, Lc 586, Lc 609, Lc 610, Ls 1, Ls 5, Ls 33, Ls 36, Lu 9, Lu 14, Lu 16, Lu 19, Lu 59, Lu 71. Upchurch e Elkan (1977), relataram, em seu estudo, que KCl apresentou efeito mais inibitório de que NaCl em mesmas concentrações para quatro estirpes de *Rhizobium japonicum*, atualmente denominado *Bradyrhizobium japonicum*, mas, esse efeito não foi observado neste trabalho (Figura 1). Pelo contrário, dentre os 52 isolados de rizóbios para *Lotus* sp. estudados, 21 (40%) rizóbios (UFRGS Lc 2, Lc 3, Lc 4, Lc 5, Lc 8, Lc 322, Lc 329, Lc 372, Lc 516, Lc 517, Lc 520, Lc 596, Lc 602, Lc 614, Lg 74, Lg 85, Lg 88, Ls 45, Ls 46, Lu 25, Lu 57) demonstraram que o NaCl apresentou efeito inibitório mais significativo que o KCl sobre o crescimento de células viáveis. Resultados semelhantes foram obtidos pelos autores Elsheikh e Wood (1990), estudando o efeito de diferentes concentrações de sódio e potássio na forma de NaCl e KCl, respectivamente, no crescimento de *Rhizobium* sp. para grão-de-bico, estirpe Ch192 e *R. fredii* para soja, estirpe USDA 201 os autores observaram, também, que no meio salino contendo potássio, na forma de KCl, ocorreu crescimento maior das estirpes do que no meio salino com sódio, na forma de NaCl, em que as estirpes foram resistentes em concentração de 2,5% de KCl enquanto que em NaCl na concentração de 2,0%.

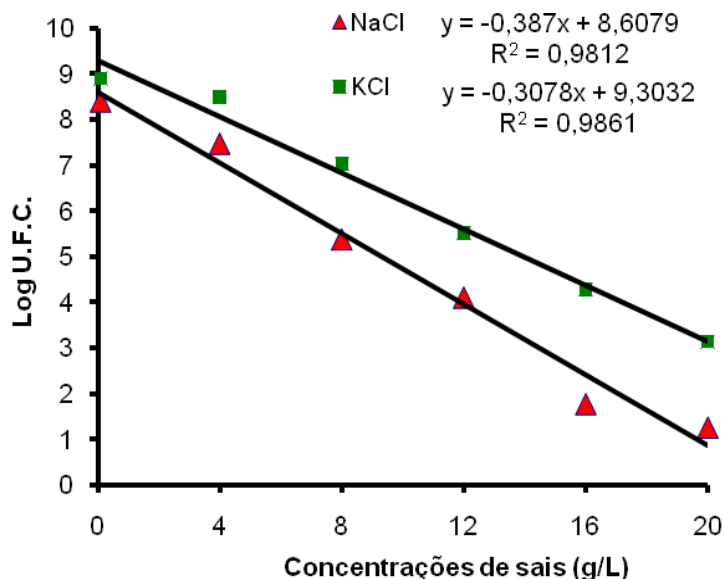


Figura 1 – Regressão linear das diferentes concentrações de NaCl e de KCl, em meio levedura e manitol, sobre os isolados e estirpes de rizóbios de *Lotus* spp.

#### 4.3. Produção de melanina

A formação de melanina em placas contendo meio TY suplementado com L-tirosina e  $\text{CuSO}_4$  não foi observada em nenhum dos 52 isolados de rizóbios para *Lotus* spp, assim como, em nenhuma das estirpes de *Mesorhizobium loti* liberadas para a produção de inoculantes de espécies de *Lotus*, nem no controle negativo, a estirpe de *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 (CIAT 899), conhecida por não produzir melanina (Cubo et al., 1988; Gao e Borthakur, 1995; Sá, 2001). Foi observada apenas nos controles positivos os isolados UFRGS Lg 111 e UFRGS Lg 121, rizóbios isolados de *Lotus glaber*, como havia sido demonstrado por Fontoura (2007). Wang et al. (1999), obtiveram resultados similares, em solos do México, em que 50 rizóbios isolados de *Mimosa affinis*, selecionados aleatoriamente entre 140 isolados, não foram capazes de produzir melanina. Giongo (2003) também observou que nenhum dos 86 rizóbios isolados de *Phaseolus vulgaris* foram capazes de produzir melanina em meio sólido. Aparentemente estes rizóbios ou não apresentam o gene *mel* (Cubo et al., 1997) ou falharam na expressão do mesmo.

A produção de melanina pôde ser visualizada em torno de uma hora após o tratamento das colônias com SDS 10% para os controles positivos UFRGS Lg 111 e UFRGS Lg 121. Esse comportamento também foi observado por Cubo et al. (1988) avaliando a capacidade de produção de melanina por diferentes espécies do gênero *Rhizobium*.

#### 4.4. Produção de sideróforos

A produção de sideróforos foi verificada pelo cultivo dos isolados em meio de cultura deficiente em ferro, meio King B (King et al., 1954), e o complexo CAS (Schwyn e Neilands, 1987). A produção de sideróforos foi considerada positiva para aqueles isolados de rizóbios e estirpes que converteram a cor azul da solução indicadora de CAS para amarelo-avermelhado, denominado cor ocre. Isso acontece quando um ligante forte seqüestra e complexa o Fe. O corante assim é liberado, o que causa mudança de cor (Cattelan, 1999). A produção de sideróforo não foi observada em nenhum dos 52 isolados de rizóbios para *Lotus* spp, o que possivelmente pode ser atribuído a incapacidade de retirarem ferro do meio de cultura. Resultado semelhante foi obtido no trabalho de Giongo (2003), em que nenhum dos rizóbios isolados de *Phaseolus vulgaris*, foram capazes de produzir sideróforos. Assim como no estudo de Singh et al. (2008), em que células de *Rhizobium* cultivados em meio King B, também não apresentaram produção de sideróforos. Entretanto, Silveira (2009) analisando a produção de sideróforos em *Bradyrhizobium*, verificou que todas as sete estirpes de *B. elkanii* avaliadas apresentaram-se como produtoras de sideróforos, e que ao contrário, dentre dez linhagens de *B. japonicum*, apenas duas tiveram produção positiva.

Entre as estirpes, liberadas para produção de inoculantes de *Lotus*, também não foi observada a produção de sideróforos. As estirpes de *Pseudomonas* sp., PSII e PSIII, utilizadas como controle positivo, converteram a cor azul da solução indicadora de CAS para amarelo-avermelhado, indicando assim produção de sideróforos; também, observou-se que a estirpe de *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 (CIAT 899) converteu a cor azul da solução indicadora de CAS para amarelado, confirmando a característica já conhecida (Sá, 2001).

#### **4.5. Avaliação da eficiência dos rizóbios na fixação simbiótica de nitrogênio**

Os sete isolados (UFRGS Lc 5, Lc 607, Lc 609, Lc 614, Lu 56, Lu 57 e Lu 59) de rizóbios testados em plantas de *Lotus corniculatus* L. cv São Gabriel quanto à sua eficiência de fixação biológica de nitrogênio foram selecionados entre os 16 isolados resistentes tanto a pH 4,2 quanto a alumínio tóxico. Estes foram os que formaram nódulos nas plântulas quando avaliados *in vitro* com o meio de Murashige e Skoog (1962) modificado, com formação de nódulos vermelhos, indicando a presença de leghemoglobina que é sintetizada nos nódulos de raiz de plantas leguminosas durante a fixação simbiótica de nitrogênio. Os rizóbios selecionados para ensaio de eficiência, bem como as estirpes liberadas para produção de inoculantes SEMIA 806 e SEMIA 816, induziram nodulação e fixaram nitrogênio em simbiose com plantas de *Lotus corniculatus* L. cv. São Gabriel em condições de casa de vegetação, utilizando o solo Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico típico, coletado na Unidade Viamão da FEPAGRO (Tabela 9).

As plantas inoculadas com o isolado UFRGS Lu 59 produziram o maior número médio de nódulos por vaso (316), seguido dos isolados UFRGS Lu 56 e UFRGS Lc 614, com 281 e 215 de nódulos por vaso. Esses valores foram superiores aos produzidos pelas inoculadas com as estirpes recomendadas SEMIA 806 e SEMIA 816, enquanto que plantas inoculadas com o isolado UFRGS Lu 57 apresentaram o menor número médio de nódulos, 52 nódulos por vaso. Nos tratamentos controles, com e sem adição de nitrogênio, não foi observada a formação de nódulos radiculares, o que demonstra que o solo utilizado no estudo não apresentava população de rizóbios noduladores de cornichão. Dessa forma, não houve competição dos isolados e estirpes com a população nativa do solo no processo de formação do nódulo. De acordo com Herridge e Bergensen (1988), quando existe no solo população naturalizada de rizóbio, os mesmos competem com os rizóbios que estão sendo introduzidos.



Tabela 9 – Número de nódulos e da massa seca de nódulos, e produção de massa seca e nitrogênio total da parte aérea de plantas de *Lotus corniculatus* L. cv. São Gabriel inoculados com isolados de rizóbios e estirpes liberadas para produção de inoculantes.

Tratamentos	Nº de nódulos	Massa seca de nódulos	Massa seca da	Nitrogênio Total
			parte aérea	
			-----mg.vaso <sup>-1</sup> -----	
T+N	-	-	900,8 a	47,5 a
Lu 56	281 b	72,7 a	829,0 a	21,8 b
Lc 5	98 e	35,8 b	917,6 a	20,9 b
Lu 57	52 f	10,7 c	827,0 a	20,6 b
Lc 614	215 c	54,8 b	727,2 a	19,5 b
Lc 607	131 d	60,8 b	709,6 a	18,9 b
Lu 59	316 a	51,2 b	675,0 a	18,3 b
Lc 609	145 d	81,4 a	684,8 a	18,3 b
SEMIA 806	113 e	57,8 b	466,7 b	11,2 c
SEMIA 816	141 d	52,4 b	590,0 b	13,1 c
T-N	-	-	288,4 c	3,8 d
Média	136	43,4	696,5	19,6
C.V.(%)	13,65	41,45	24,77	28,37

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade. Legenda: T+N = controle com adição de nitrogênio; T-N = sem adição de nitrogênio.

Os isolados neste trabalho, apresentaram grande capacidade de induzir nodulação em *Lotus corniculatus*, quando comparado com os resultados obtidos por Frizzo (2007), que observou a formação de até 81 nódulos, e pelos obtidos por Barrientos et al. (2002) com isolados autóctones de regiões do Chile, cuja maior nodulação foi de dois nódulos por planta. O isolado que apresentou o maior número médio de nódulos por vaso, UFRGS Lu 59, foi isolado de uma planta de *Lotus uliginosus*, o que demonstra que rizóbios de *L. uliginosus* podem nodular plantas de *L. corniculatus*. Situação essa que também foi observada por Tonon (2008), no estudo de compatibilidade simbiótica de rizóbios de *Lotus* spp, em que foram inoculados isolados de rizóbios obtidos de *L. uliginosus* em plantas de *L. corniculatus*, e estes induziram a formação de nódulos e dos 35 isolados estudados, 12 apresentaram capacidade de fixar nitrogênio simbioticamente.

Em relação à massa seca de nódulos observou-se que, na maioria, não houve correlação com o número de nódulos. O isolado UFRGS Lc 609, por

exemplo, foi o que apresentou o maior valor de massa seca de nódulos, 81,4 mg.vaso<sup>-1</sup>, contendo menos da metade do número médio de nódulos que o isolado UFRGS Lu 59, o qual apresentou uma massa de nódulos equivalente a 51,2 mg.vaso<sup>-1</sup>, indicando a formação de nódulos maiores e mais pesados pelo isolado UFRGS Lc 609. Entretanto, o isolado UFRGS Lu 57 além do menor número médio de nódulos por vaso (52 nódulos) entre os isolados e estirpes, também apresentou a menor massa seca de nódulos, correspondente a 10,7 mg.vaso<sup>-1</sup>.

Não se observou também correlação entre a massa seca de nódulos com a massa seca da parte aérea das plantas. Observação semelhante foi realizada por Frizzo (2007) no estudo de 15 isolados de rizóbios em plantas de *Lotus corniculatus* em casa de vegetação. Fato também constatado por Brose (1992) em um trabalho com 16 estirpes de *Rhizobium loti*, denominado atualmente de *Mesorhizobium loti*, inoculadas em plantas de *L. corniculatus*, cultivadas em vasos contendo solo da Unidade de Mapeamento Vacaria (Latossolo Bruno), em condições de casa de vegetação.

A massa seca da parte aérea não diferiu entre os isolados testados neste experimento, que se igualaram ao tratamento controle com adubação nitrogenada e superaram as estirpes recomendadas SEMIA 806 e SEMIA 816. Estas, por sua vez, não diferiram entre si, mas superaram o tratamento sem inoculação e sem adubação nitrogenada. Estes resultados mostram que as estirpes SEMIA 806 e SEMIA 816, nas condições do experimento, foram ineficientes em suprir nitrogênio para o crescimento da parte aérea da planta. Resultado semelhante foi encontrado por Frizzo (2007) que também constatou a ineficiência da estirpe SEMIA 806.

Avaliando-se os valores de acúmulo de nitrogênio total na parte aérea das plantas, observa-se que o tratamento controle com adição de nitrogênio acumulou teor de nitrogênio superior ao dos demais tratamentos. Os tratamentos inoculados com os isolados de rizóbios não diferiram entre si, sendo superiores aos tratamentos inoculados com as estirpes liberadas para a produção de inoculantes de *L. corniculatus* e ao tratamento controle sem adição de nitrogênio. Cabe ressaltar que o tratamento controle com adição de nitrogênio, mesmo apresentando nitrogênio total na parte aérea superior aos demais tratamentos, não diferiu dos tratamentos inoculados na massa seca da

parte aérea, o que pode indicar que nem sempre uma maior absorção de nutriente vai resultar em maior acúmulo de massa, porque isto depende também da maneira de como será utilizado essa fonte pela planta. De acordo com Epstein (1972), pode haver consumo de luxo, em que a planta absorve o nutriente e isto não é traduzido em aumento de rendimento. No caso do experimento, o solo utilizado não foi corrigido, o que pode ter ocasionado falta de nutrientes e, assim, ter feito com que o nitrogênio a mais não se convertesse em massa seca.

Os índices de eficiência relativa na fixação simbiótica de nitrogênio, apresentados na Figura 2, indicam a porcentagem da contribuição, em termos de nitrogênio fixado, do tratamento inoculado em relação aos tratamentos controle com adição de nitrogênio, de acordo com a fórmula empregada por Brockwell et al. (1966). Os índices de eficiência relativa calculados para os tratamentos inoculados variaram de 45% a 19%. Na Figura 2, observa-se que os tratamentos inoculados com os isolados UFRGS Lc 5 apresentaram índice de eficiência relativa de 44,8%, com UFRGS Lu 56 de 44,6% e com Lu 57 de 40,8%. Os demais apresentaram índice de eficiência relativa abaixo de 40%, sendo que os inoculados com as estirpes SEMIA 816 e SEMIA 806 apresentaram índice em torno de 20%.

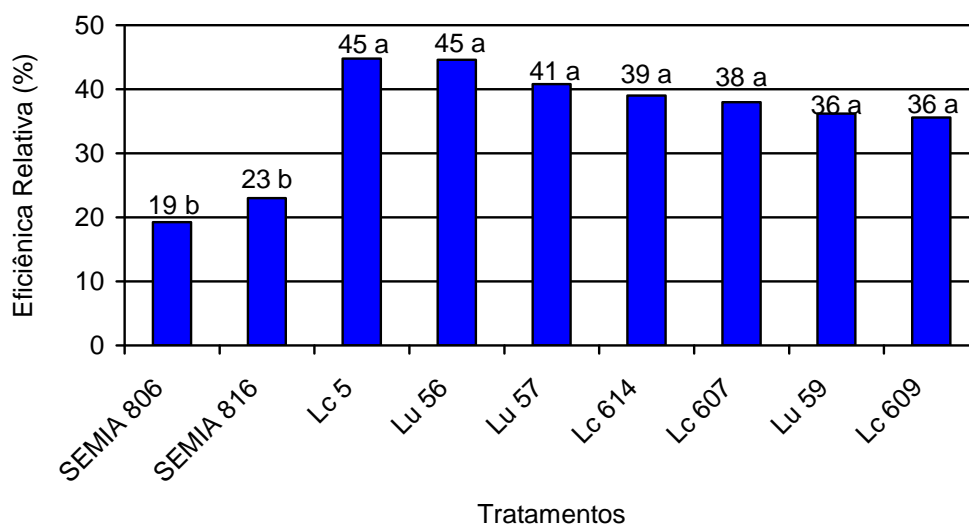


Figura 2 – Índice de eficiência relativa na fixação simbiótica de nitrogênio em plantas de *Lotus corniculatus* inoculadas com isolados de rizóbios e estirpes SEMIA 806 e SEMIA 816 (Médias comparadas pelo teste de Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade).

As estirpes SEMIA 816 e SEMIA 806, liberadas para produção de inoculantes para *L. corniculatus*, apresentaram desempenho insatisfatório no experimento. SEMIA 806 que teve a menor contribuição em termos de matéria seca e nitrogênio total na parte aérea, não diferindo do tratamento controle sem nitrogênio, evidenciando uma provável perda de eficiência desta estirpe. Resultado semelhante foi encontrado por Frizzo (2007), que verificou que a estirpe SEMIA 806 apresentou menor contribuição em termos de acúmulo de matéria seca e teor de nitrogênio total na parte aérea, assim como baixo índice de eficiência relativa e baixo número de nódulos e massa seca de nódulos. Alguns autores, como Date (1982) e Barrientos et al. (2002) já relataram a perda de eficiência de estirpes devido a mutações espontâneas.

#### **4.6. Avaliação dos rizóbios na germinação e no desenvolvimento de plântulas**

Os rizóbios que foram testados em sementes de *Lotus corniculatus* L. cv. São Gabriel quanto o seu efeito na germinação e o desenvolvimento de plântulas foram os mesmos que haviam sido selecionados para a avaliação de eficiência na fixação simbiótica de nitrogênio em casa de vegetação. Na Tabela 10, se pode observar que, em relação à germinação inicial, os isolados UFRGS Lc 5 e Lu 56 apresentaram valores acima de 80%, sendo semelhantes ao valor de germinação inicial do tratamento controle não inoculado que somente recebeu água destilada estéril, diferindo do tratamento controle não inoculado que somente recebeu meio de cultura líquido LM, com valor abaixo de 70%. Entretanto, no que se refere à germinação final e ao índice de velocidade de germinação (IVG%), não se verificou diferença entre os tratamentos inoculados com rizóbios e os tratamentos não inoculados demonstrando que os microrganismos não ocasionaram interferência direta na germinação das sementes de cornichão.

Tabela 10 – Efeito da inoculação com rizóbios sobre a germinação e o desenvolvimento de plântulas de *Lotus corniculatus* L. cv. São Gabriel.

Tratamentos	Germinação			Comprimento		Massa Seca Parte Aérea
	Inicial	Final	IVG	Parte Aérea	Raiz	
	-----%-----			-----cm-----		mg
T+Água	84,0 a	86,5 a	21,3 a	1,70 d	1,69 a	25,5 b
Lc 5	82,0 a	88,5 a	21,3 a	2,93 a	0,90 b	28,5 b
Lu 57	81,0 a	84,5 a	20,8 a	2,47 c	0,58 c	35,2 a
Lu 56	75,0 b	83,0 a	20,3 a	2,55 b	0,68 c	33,7 a
Lc 609	75,0 b	79,5 a	19,3 a	2,33 c	0,86 b	26,5 b
Lu 59	75,0 b	89,0 a	21,2 a	2,95 a	0,76 b	28,7 b
Lc 614	74,0 b	83,0 a	19,8 a	2,14 c	0,58 c	31,0 a
Lc 607	71,0 b	85,0 a	20,4 a	2,31 c	0,84 b	26,5 b
SEMIA 806	78,0 a	89,0 a	21,3 a	2,05 c	0,50 c	30,7 a
SEMIA 816	71,0 b	84,5 a	20,2 a	2,42 c	0,62 c	27,5 b
T+LM	64,5 b	72,5 a	17,4 a	2,19 c	0,57 c	27,7 b
Média	75,5	84,1	20,3	2,37	0,78	29,2
C.V. (%)	8,74	7,87	7,62	9,72	18,02	14,39

Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Scott Knott, ao nível de 5% de probabilidade. Legenda: T+Água = tratamento controle não inoculado que somente recebeu água destilada estéril; T+LM = tratamento controle não inoculado que somente recebeu meio de cultura líquido LM.

A avaliação dos parâmetros de desenvolvimento de plântulas mostrou diferenças significativas entre os tratamentos testados. As plantas inoculadas com os isolados de rizóbios UFRGS Lc 5 e Lu 59 apresentaram maior crescimento da parte aérea, seguido do tratamento com o isolado UFRGS Lu 56. Já as plantas do tratamento controle sem inoculação que somente recebeu água destilada estéril apresentaram menor crescimento da parte aérea. A influência no desenvolvimento de plântulas, observada neste trabalho poderia ser atribuída a mecanismos de promoção de crescimento vegetal por microrganismos (Marchioro, 2005), através da síntese de fitohormônios, como auxina, citocinina, giberelina e etileno. Em que, as giberelinas atuam estimulando o crescimento da parte aérea, tendo pouco efeito sobre o crescimento das raízes, enquanto que a auxina tem como principal efeito promover o crescimento de raízes (Marchioro, 2005). Entretanto, a ação dos hormônios depende de outros mecanismos que regulam sua liberação da forma conjugada para livre entre os tecidos de reserva e as demais partes da planta.

#### 4.7. Caracterização genética dos isolados de rizóbios

As ampliações do DNA genômico com oligonucleotídeos iniciadores BOX A 1-R, ERIC (ERIC1-R e ERIC-2) e RISA (SD-Bact-1522-bS-20 e LD-Bact-132-aA-18), submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5%, permitiu a obtenção de perfis característicos para as estirpes e isolados estudados neste trabalho. A análise dos padrões de bandas, formadas a partir da amplificação com BOX A 1-R (Figura 3), revelou a inexistência de bandas comuns a todos os 52 isolados de rizóbios para *Lotus* sp. e estirpes. O tamanho das bandas de ocorrência mais frequente foi em torno de 6.500 pares de base (pb), observada em 22 rizóbios, 1.650 pb (observada em 17 rizóbios) e 1.200 pb (observada em 17 rizóbios). Alguns rizóbios apresentaram perfis de bandas semelhantes: UFRGS Lc 8 e UFRGS Lc 9; UFRGS Ls 46 e UFRGS Lu 14; UFRGS Lc 322 e UFRGS Lc 329; UFRGS Lc 597, UFRGS Lc 602, UFRGS Lc 605, UFRGS Lc 607 e UFRGS Lc 609.

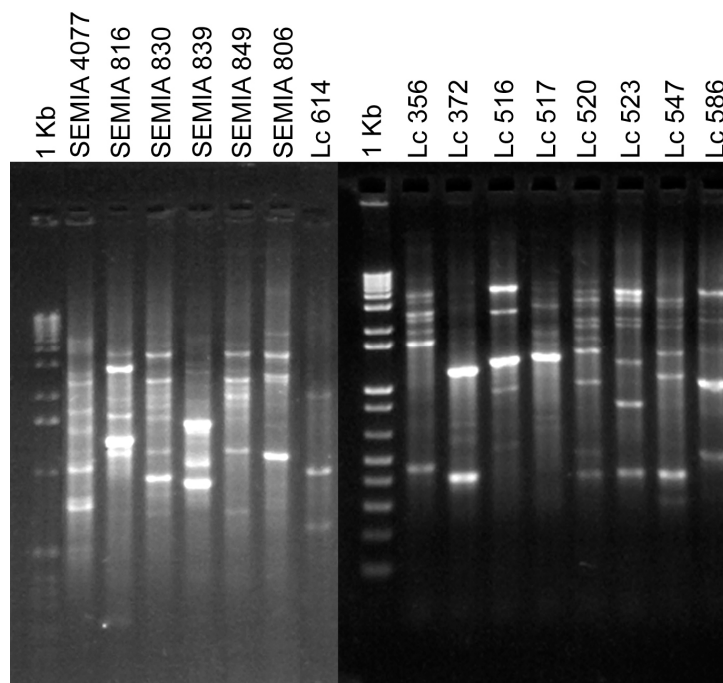


Figura 3 – Exemplos de géis contendo o perfil eletroforético de bandas do produto da amplificação do DNA genômico por PCR com o oligonucleotídeo iniciador BOX A 1-R. Legenda: 1Kb = padrão 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen).

Analisando-se os padrões de bandas formadas pela amplificação com ERIC (Figura 4), também se observa, assim como no PCR-BOX, a inexistência de bandas comuns a todos os isolados de rizóbios e estirpes. As bandas de ocorrência mais freqüente foram 1.200 pb (presente em 20 rizóbios) e 1.000 pb (presente em 19 rizóbios). Os isolados UFRGS Lc 597 e UFRGS Lc 601 apresentaram perfis de bandas semelhantes entre si.

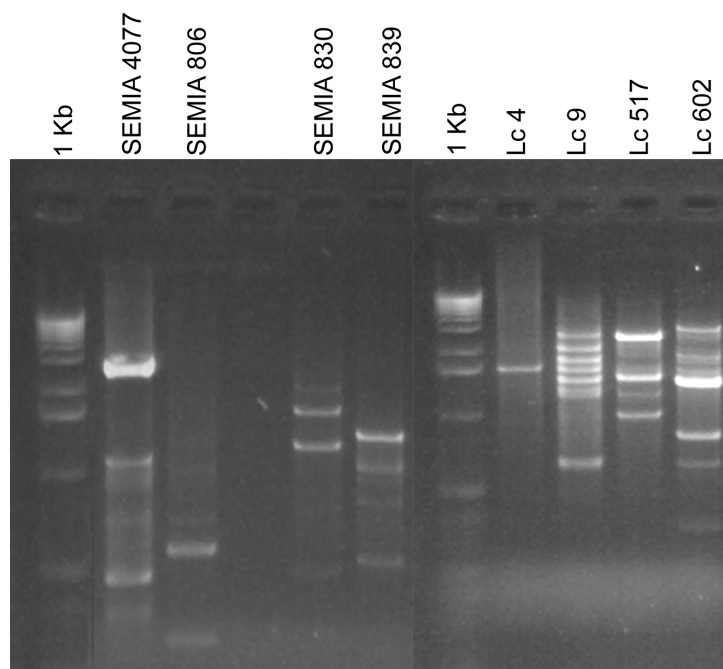


Figura 4 – Exemplos de géis contendo o perfil eletroforético de bandas do produto da amplificação do DNA genômico por PCR com os oligonucleotídeos iniciadores ERIC (ERIC1-R e ERIC-2). Legenda: 1Kb = padrão 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen).

Na análise do padrão de bandas, formadas a partir da amplificação do DNA genômico com RISA (Figura 5) observa-se a formação de uma única banda em cada isolado e estirpe. O tamanho dos fragmentos variou de 1.500 pb até 600 pb, dependendo do rizóbio avaliado.

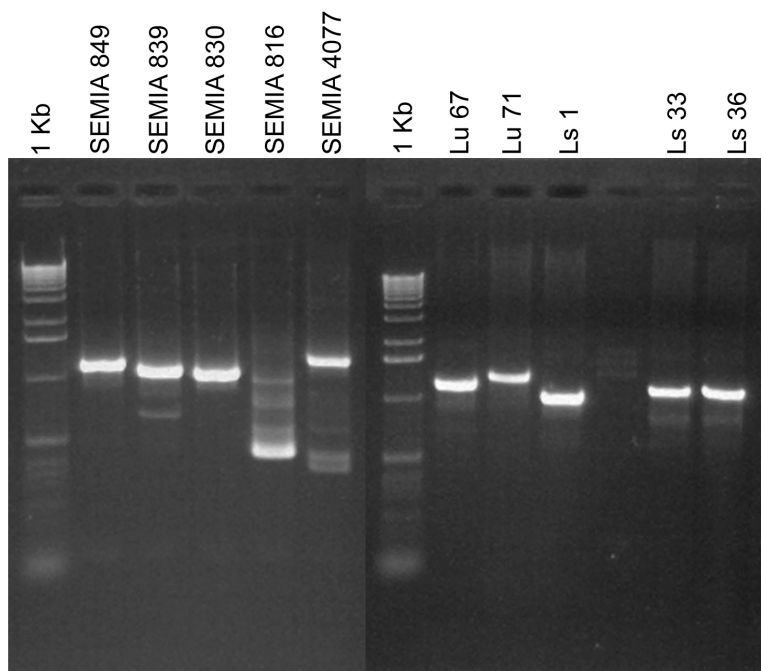


Figura 5 – Exemplos de géis contendo o perfil eletroforético de bandas do produto da amplificação do DNA genômico por PCR com os oligonucleotídeos iniciadores RISA (SD-Bact-1522-bS-20 e LD-Bact-132-aA-18). Legenda: 1Kb = padrão 1Kb plus DNA ladder (Invitrogen).

Da análise da matriz binária conjunta dos perfis eletroforéticos dos produtos da amplificação com os oligonucleotídeos iniciadores BOX A 1-R, ERIC e RISA, foi elaborado um dendrograma de similaridade/dissimilaridade (Figura 6), utilizando-se o coeficiente de Jaccard. No dendrograma observa-se que apenas dois isolados, UFRGS Lc 597 e UFRGS Lc 601, apresentaram grau de similaridade acima de 70%. Não foram encontrados isolados com 100% de similaridade com qualquer das estirpes liberadas para a produção de inoculantes, indicando que os isolados obtidos de amostras de solos de diversas localidades do Rio Grande do Sul não são reisolamentos das estirpes utilizadas nos inoculantes. O grau máximo de similaridade entre as estirpes liberadas para a produção de inoculantes para *Lotus* spp e um isolado foi de 38%, entre a estirpe SEMIA 830 e isolado UFRGS Lc 586. Outros três grupos envolvendo as estirpes recomendadas para *Lotus* sp. foram formados, como SEMIA 806 e SEMIA 816, SEMIA 839 e UFRGS Lu 9, SEMIA 849 e UFRGS Lc 596, apresentado grau de similaridade menor do que 30%. A formação dos grupos não esteve ligada diretamente aos locais de origem dos isolados, bem como as espécies de *Lotus* de cujos nódulos se obtiveram os isolados.



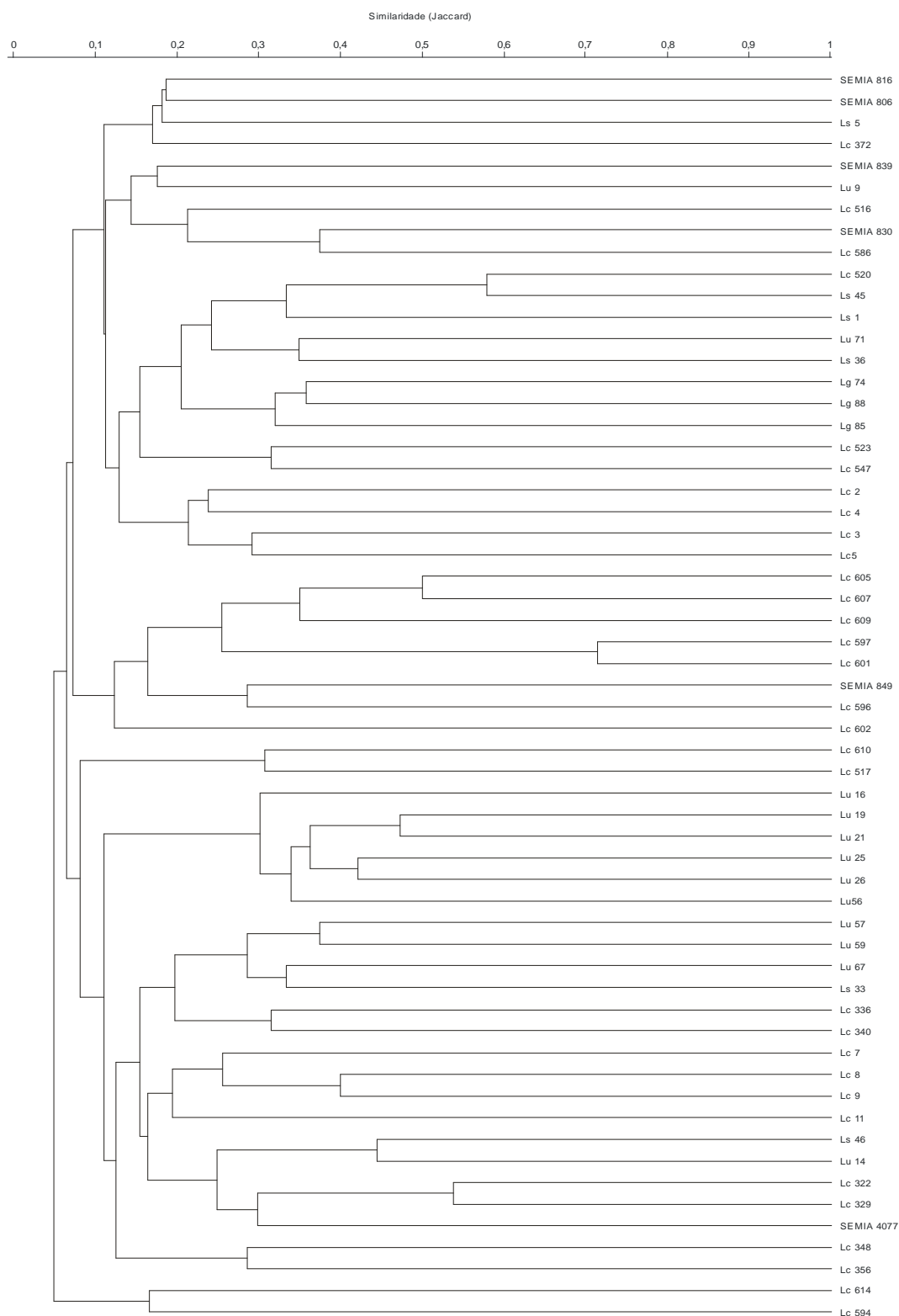


Figura 6 – Dendrograma de genotipagem de estirpes e isolados de rizóbios, autóctones em solos do Rio Grande do Sul, simbiotes em quatro espécies de *Lotus*. Agrupamento obtido pelo coeficiente de Jaccard, para perfil de bandas obtido a partir da PCR com os oligonucleotídeos iniciadores BOX A1-R, ERIC e RISA.

O índice de diversidade de Shannon, calculado a partir do número de grupos e número de indivíduos por grupo, foi de 4,05. Resultados semelhantes foram obtidos por Vargas et al. (2007) que encontrou um índice de 4,3 estudando a diversidade genética de rizóbios noduladores de acácia-negra no Rio Grande do Sul. Lõhmus et al. (2006) também obtiveram índices de Shannon de 4,63 e de 4,56 entre as comunidades bacterianas extraídas de solos cultiváveis. Giongo (2007) encontrou índices entre 4,41 e 6,17 estudando a diversidade de *Bradyrhizobium elkanii* e *B. japonicum* que nodulam soja em solos do Rio Grande do Sul. Entretanto, Andrade et al. (2002), Borges et al. (2003) e Dilly et al. (2004) encontraram índices de diversidade menores avaliando a diversidade de isolados de rizóbios noduladores de feijão, de *Escherichia coli* em águas ambientais e de populações bacterianas em solos, respectivamente. Fontoura (2007) obteve índices de Shannon 2,098 e 2,053 estudando a diversidade dos rizóbios isolados de *Lotus glaber* e *L. subbiflorus*. Frizzo (2007), estudando a diversidade dos rizóbios isolados de *L. corniculatus* e *L. uliginosus*, obteve índices de diversidades de 2,56 e 2,79. O alto índice de Shannon encontrado neste estudo indica elevada diversidade entre os isolados de rizóbios de *Lotus* spp em solos do Rio Grande do Sul, demonstrando ser essa uma fonte potencial para a seleção de novas estirpes mais eficientes do que as atualmente liberadas para a produção de inoculantes.

## 5. CONCLUSÕES

- a) Entre os isolados e estirpes estudados, é possível a seleção de rizóbios para *Lotus* spp autóctones em solos do Rio Grande do Sul resistentes a acidez e salinidade do solo;
- b) Os rizóbios estudados não apresentam produção de melanina nem produção de sideróforos;
- c) Os rizóbios selecionados, para ensaio de eficiência na fixação simbiótica de nitrogênio sob condição de casa de vegetação, induzem nodulação e fixam nitrogênio em simbiose com plantas de *Lotus corniculatus*;
- d) Existe uma alta diversidade entre os rizóbios autóctones em solos do Rio Grande do Sul simbiontes em *L. corniculatus*, *L. glaber*, *L. subbiflorus* e *L. uliginosus* indicando que os rizóbios estudados não são reisolamentos de estirpes utilizadas em inoculantes para as espécies de *Lotus* estudadas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARONS, S.R.; GRAHAM, P.H. Response of *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* to acidity. **Plant and Soil**, Sprinder Netherlands, n.134, p.145-151, 1991.

ALLEN, O.N.; ALLEN, O.K. **The leguminosae**. Madison: University of Wisconsin Press, 1981. p.401-405.

ALVES, J.B. **Seleção de rizóbios para trevo branco**. 2005. 78f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

ANDRADE, D.S.; MURPHY, P.J.; GILLER, K.E. The diversity of *Phaseolus*-nodulating rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.8, p.4025-4034, 2002.

ANDREWS, S.C.; ROBINSON, A.K.; RODRIGUEZ-QUINONES, F. Bacterial iron homeostasis. **FEMS Microbiology Review**, England, n.27, p.215-237, 2003.

AUBEL, D.; RENAUD, F. N. R.; FRENEY, J. Genomic diversity of several *Corynebacterium* species identified by amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer regions. **International Journal of Systematic Bacteriology**, United Kingdom, n.47, p.767–772, 1997.

AYALA, W.; BERMÚDEZ, R. Caracterização produtiva de melhoramentos de campo em base a *Lotus el rincón* e *Lotus maku*. In: MANCUELLO, C. **Jornada de Utilización de Mejoramientos de Campo en La Zona Este Del País**. Rocha: Facultad de Agronomía, 2001. 30p.

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.

BARBERI, A.; MOREIRA, F.M.S.; FLORENTINO, L.A.; RODRIGUES, M.I.D. Crescimento de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe BR 29 em meios de cultivo com diferentes valores de pH inicial. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.2, p.397-405, 2004.

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**, Chile, v.62, n.2, p.226-236, 2002.

BENITE, A.M.C.; MACHADO, S.P.; MACHADO, B.C. Sideróforos: “uma resposta dos microrganismos”. **Química Nova**, Rio de Janeiro, n.25, p.1155-1164, 2002.

BERTAN, I.; CARVALHO, F.I.F.; OLIVEIRA, A.C.; OLIVEIRA, P.H.; SILVA, J.A.G.; BENIN, G.; SILVA, G.O.; HARTWIG, I.; PADILHA, E.B. Caracteres associados à tolerância ao alumínio tóxico em genótipos de trigos sul brasileiros. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v.11, n.2, p.149-154, 2005.

BIALEK, K.; MICHALCZUK, L.; COHEN, J.D. Auxin biosynthesis during seed germination in *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, United States, v.100, n.1, p.509-517, 1992.

BISWAS, J.C. et al. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of Rice. **Agronomy Journal**, Madison, v.92, n.5, p.880-886, 2000.

BLAMEY, F.P.C.; EDWARDS, D.G.; ASHER, C.J. Effects of aluminum, OH:Al and P:Al molar ratios and ionic strength on soybean root elongation in solution culture. **Soil Science**, Philadelphia, n.136, p.197-207, 1983.

BLUMENTHAL, M.J.; MCGRAW, R.L. Lotus adaptation, use and management. In: BEUSELINCK P.R. (Ed.) **Trefoil: The Science and Technology of Lotus**, 28 ed., Madison: ASA, 1999. p.97-119.

BOHNEN, H. Acidez e calagem. In: GIANELLO, C., BISSANI, C.A.; TEDESCO, M.J. (eds) **Princípios de fertilidade de solo**. Porto Alegre: Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia, UFRGS, 1995. p.51-76.

BORGES, L.G.D.A.; VECHA, V.D.; CORÇÃO, G. Characterization and genetic diversity via REP-PCR of *Escherichia coli* isolates from polluted waters in southern Brazil. **FEMS Microbiology Ecology**, England, n.45, p.178-180, 2003.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.

BRAUN, V. Energy-coupled transport and signal transduction through the gram-negative outer membranes via TonB-ExbB-EcbC-dependent receptor proteins. **FEMS Microbiology Letters**, England, n.16, p.295-307, 1995.

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, p.365-370, 1966.

BROCKWELL, J.; PILKA, A.; HOLLIDAY, R.A. Soil pH is a major determinant of the numbers of naturally-occurring *Rhizobium meliloti* in non-cultivated soil of New South Wales. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, Victoria, v.31, n.2, p.211-219, 1991.

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

BUSHBY, H.V.A. The role of bacterial surface charge in the ecology of root nodule bacteria: a hypothesis. **Soil Biology and Biochemistry**, United States, v.22, n.1, p.1-9, 1990.

CARAMBULA, M. **Produccion y manejo de pasturas forrajeras**. Montevideo: Hemisferio Sur, 1977. 519p.

CARAMBULA, M.; CARRIQUIRY, E.; AYALA, W. **Mejoramientos de campo com *Lotus subbiflorus* cv. el rincón**. Montevideo, Uruguai: INIA – Instituto Nacional de Investigación Agropecuária, 1994. 21p.

CARDOSO, E.J.B.N. (Coord). **Microbiologia do solo**. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. 360p.

CARRILO, G.C.; VAZQUEZ, M.R.G. Comparative study of siderophore-like activity of *Rhizobium phaseoli* and *Pseudomonas fluorescens*. **Journal of Plant Nutrition**, United Kingdom, n.15, p.579-590, 1992.

CARSON, K.C.; DILOWRTH, M.J.; GLENN, A.R. Siderophore production and iron transport in *Rhizobium leguminosarum* bv viande MNF710. **Journal of Plant Nutrition**, United Kingdom, n.15, p.2203-2220, 1992.

CATTELAN, A.J. Métodos quantitativos para determinação de características bioquímicas e fisiológicas associadas com bactérias promotoras do crescimento vegetal. **Embrapa Soja Documentos**, Londrina, n.139, 36p. 1999.

CHEN, W.; WANG, E.; WANG, S.; LI, Y.; CHEN, X.; LI, Y. Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, people's republic of China. **International Journal of Systematic Bacteriology**, United Kingdom, v.45, n.1, p.153-159, 1995.

COPELAND, L.O.; McDONALD, M.B. Seed dormancy. In: **Seed science and technology**, New York, c.6, 1995. p.27-152.

CORREA, O.S; BARNEIX, A.J. Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loci*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v.13, n.2, p.153-157, 1997.

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

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

CUMMINGUAM, S.D.; MUNNS, D.N. The correlation between, extracellular polysaccharide production and acid tolerance in *Rhizobium*. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.48, p.1273-1276, 1984.

DATE, R.A. Collection, isolation, characterization and conservation of *Rhizobium*. In: VICENT, J.M. (Ed.) **Nitrogen Fixation in Legums**. Academic Press, Canberra, Australia, 1982. p.95-109.

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

DEMİNİCİS, B.B.; ALMEIDA, J.C.C.; BLUME, M.C.; ARAÚJO, S.A.C.; PÁDUA, F.T.; ZANINE, A.M. JACCOUD, C.F. Superação da dormência de sementes de oito leguminosas forrageiras tropicais. **Archivos de Zootecnia**, Universidade de Córdoba, Espanha, vol.55, n.212, p.401-404, 2006.

DERYLO, M.; SKORUPSKA, A. Rhizobial siderophore as an iron source for clover. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v.85, n.3, p.549-553, 1992.

DIAZ de, V.M.E.; VILLA, P.; FRÍAS, A. Evaluación de la producción de sideróforos por *Pseudomonas aeruginosa* PSS. **Revista Latinoamericana de Microbiología**, Ecuador, v.44, n.3-4, p.112-117, 2002.

DILLY, O.; BLOEM, J.; VOS, A.; MUNCH, J.C. Bacterial diversity in agro-cultural soils during litter decomposition. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, n.1, p.468-474, 2004.

DILWORTH, M.J.; CARSON, K.C.; GILES, R.G.F.; BYRNE, L.T.; GLENN, A.R. *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* produces a novel cyclin trihydroxamate siderophore, vicibactin. **Microbiology**, United Kingdom, n.144, p.781-791, 1998.

DOBBELAERE, S.; VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Philadelphia, v.22, n.2, p.107-149, 2003.

DOMINGUÉZ-FERRERAS, A.; MUÑOZ, S.; OLIVARES, J.; SOTO, M.J.; SANJUÁN, J. Role of potassium uptake systems in *Sinorhizobium meliloti* osmoadaptation and symbiotic performance. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.191, n.7, p.2133-2143, 2009.

EARDLY, B.D.; YOUNG, J.P.W.; SELANDER, R.K. Phylogenetic position of *Rhizobium* sp. strain Or 191, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, based on partial sequences of the 16S rRNA and *nifH* genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.1809-1815, 1992.

ELSHEIKH, E.A.E. Effects of salt on rhizobia and bradyrhizobia: a review. **Annals of Applied Biology**, United Kingdom, n.132, p.507-524, 1998.

ELSHEIKH, E.A.E.; WOOD, M. Salt effects on survival and multiplication of chickpea and soybean rhizobia. **Soil Biology and Biochemistry**, United States, v.22, n.3, p. 343-347, 1990.

EPSTEIN, E. **Mineral nutrition of plants: principles and perspectives**. New York: J. Wiley, 1972. 412p.

FABIANO, E.; GUALTIERI, G.; PRITSCH, C.; POLLA, G.; ARIAS, A. Extent of high-affinity iron transport systems in fields isolates of rhizobia. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.164, p.177-185, 1994.

FAGAN, E.B.; MEDEIROS, S.L.P.; MANFRON, P.A.; CASAROLIL, D.; SIMON, J.; NETO, D.D.; Van LIER, Q.J.; SANTOS, O.S.; MÜLLER, L. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em soja. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v.14, n.1, p.89-106, 2007.

FERGUSON, A.D.; DEISENHOFER, J. TonB-dependent receptors-structural perspectives. **Biochimica et Biophysica Acta**, New York, n.1565, p.318-332, 2002.

FISHER, M.M.; TRIPLETT, E.W. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, n.10, p.4630-4636, 1999.

FLIS, S.E.; GLEN, A.R.; DILWORTH, M.J. The interaction between aluminium and root nodule bacteria. **Soil Biology and Biochemistry**, United States, v.25, n.4, p.403-417, 1993.

FONTOURA, R.A. **Seleção de rizóbios nativos, de solos do Rio Grande do Sul, para *Lotus glaber* e *Lotus subbiflorus***. 2007. 94f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

FREIRE, J.R.J. Fixação do Nitrogênio pela Simbiose Rizóbio/Leguminosas. In: CARDOSO, E.J.B.N. (coord.) **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 1992.

FREITAS, A.D.S.; VIEIRA, C.L.; SANTOS, C.E.R.S.; STAMFORD, N.P.; LYRA, M.C.C.P. Caracterização de rizóbios isolados de jacatupé cultivado em solo



salino do estado de Pernambuco, Brasil. **Bragantia**, Campinas, 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.** 2007. 81f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

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

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

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

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

GRAHAM, P.H.; DRAEGER, K.J.; FERREY, M.L.; CONRAY, M.J.; HAMMER, B.E.; MARTINEZ, E.; AARONS, S.R.; QUINTINO, C. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR 1899. **Canadian Journal of Microbiology**, Saskatoon, n.40, p.198-207, 1994.

HAMMER, O.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. **PAST** – Palaeontological Statistic, ver. 1.69, 2007.

HARA, F.A.S.; OLIVEIRA, L.A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álidos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazonica**, Amazonas, v.34, n.2, p.343-357, 2004.

HARPER, J.L. **Population biology of plants.** London: Academic, 1977. 892p.

HARRISON, S.P.; MYTTON, L.R.; SKOT, L.; DYE, M.; CRESSWELL, A. Characterization of *Rhizobium* isolates by amplification of DNA polymorphisms using random primers. **Canadian Journal of Microbiology**, Saskatoon, n.38, p.1009-1015, 1992.

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

HAWKINS, F.K.L.; KENNEDY, C.; JOHNSTON, A.W.B. A *Rhizobium leguminosarum* gene required for symbiotic nitrogen fixation, melanin synthesis and normal growth on certain growth media. **Journal of General Microbiology**, United Kingdom, n.137, p.1721-1728, 1991.

HAYNES, J.G.; CZYMMEK, K.J.; CARLSON, C.A.; VEERESHINGAM, H.; DICKSTEIN, R.; SHERRIER, D.J. Rapid analysis of legume root nodule development using confocal microscopy. **New Phytologist**, Oxford, n.163, p.661-668, 2004.

HERRIDGE, D.F.; BERGENSEN, F.J. Symbiotic nitrogen fixation. In: WILSON, J.R. (ed.) **Advances in nitrogen cycling and agricultural ecosystems**. Symposium on Advances in Nitrogen Cycling in Agricultural Ecosystems. 1987. Brisbane: CAB, 1988. p.46-65.

HUNGRIA, M.; CAMPO, R.J. Fixação biológica do nitrogênio em sistemas agrícolas. **Anais XXX Congresso Brasileiro de Ciência do Solo**, Recife, 2005.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L.M.O.; RAQUEL, G.C.; MANUEL, M. Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soyabean nodules in Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.33, n.10, p.1349-1361, 2001.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.T.A. Environmental factors affecting grain legumes in the tropics, with emphasis on Brazil. **Field Crops Research**, New York, n.65, p.151-164, 2000.

HYNES, M.F.; KRUCKSCH, K.; PRIEFER, U. Melanin production encoded by a cryptic plasmid in a *Rhizobium leguminosarum* strain. **Archives of Microbiology**, Berlin, v.150, p.326-332, 1988.

INFANTINI, A.S.G.; IRIGON, D.L.; MELLO, V.D.C.; SANTOS, D.S.B.; ZONTA, É.P. Qualidade física e fisiológica de sementes de cornichão beneficiadas na máquina de ar e peneira e na mesa de gravidade. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.14, n.2, p.131-134, 1992.

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

ISTA – **International rules for seed testing. Seed Science and Technology**. Zurich, 1996. 335p.

IZAGUIRRE, P; BEYHAUT, R. **Las leguminosas en Uruguay y regiones vecinas. Parte 1 – Papilionidae.** Montevideo, Uruguay: Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L., 1998. 326p.

JACOB JÚNIOR, E.A.; MENEGHELLO, G.E.; MELO, P.T.B.S.; MAIA, M.S. Tratamentos para superação de dormência em sementes de cornichão anual. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.26, n.2, p.15-19, 2004.

JACOBSON, E.S. Pathogenic roles for fungal melanins. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.13, n.4, p.708-717, 2000.

JENSEN, M.A.; WEBSTER, J.A.; STRAUS, N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.945–952 1993.

JUNIOR, E.A.J.; MENEGHELLO, G.E.; MELO, P.T.P.S.; MAIA, M.S. Tratamentos para superação de dormência em sementes de cornichão anual. **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v.26, n.2, p.15-19, 2004.

JURKEVITCH, E.; HADARM, Y.; CHEN, Y. Differential siderophore utilization and iron uptake by soil and rhizosphere bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.119-124, 1992.

KING, E.O.; WARD, M.K.; RANEY, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, New York, n.44, p.301-307, 1954.

KREWULAK, K.D.; VOGEL, H.J. Structural biology of bacterial iron uptake. **Biochimica et Biophysica Acta**, New York, n.1778, p.1781-1804, 2007.

LABANDERA, C. **Metodologías aplicadas a la evaluación de Rhizobios para inoculantes para leguminosas forrajeras en Uruguay. Trabajos Técnicos.** Departamento de Microbiología de Suelos, 2007. Disponível em : <http://www.chasque.net/microlab/LMSCI/TraTe/metaplic.htm>. Acesso em: 27. nov. 2009.

LABES, G.; ULRICH, A.; LENTZSCH, P. Influence of bovine slurry deposition on the structure of nodulating *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* soil populations in a natural habitat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.1717–1722, 1996.

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

LAGUERRE, G.; van BERKUM, P.; AMARGER, N.; PREVOST, D. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the general *Astragalus*, *Oxytropis* and *Onobrychis*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, p.4748-4758, 1997.

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

LeVIER, K.; GUERINOT, M.L. The *Bradyrhizobium japonicum* fegA gene encodes as iron regulated outer membrane protein with similarity to hydroxamate-type siderophore receptors. **Journal of Bacteriology**, Washington, n.23, p.7265-7275, 1996.

LÖHMUS, K.; TRUU, M.; TRUU, J.; OSTONEN, I.; KAAR, E.; VARES, A.; URI, V.; ALAMA, S.; KANAL, A. Functional diversity of culturable bacterial communities in the rhizosphere in relation to fine-root and soil parameters in alder stands on forest, abandoned agricultural, and oil shale mining areas. **Plant and Soil**, Sprinder Netherlands, n.283, p.1-10, 2006.

LUNGE, V.R.; SIMON, D.; IKUTA, N. Métodos de diagnóstico genético-molecular. In: MARQUES, E.K. (org.) **Diagnóstico Genético-Molecular**. Canoas: Ed. ULBRA, 2003.

MACCIÓ, D.; FABRA, A.; CASTRO, S. Acidity and calcium interaction affect the growth of *Bradyrhizobium* sp. and the attachment to peanut roots. **Soil Biology and Biochemistry**, United States, n.34, p.201-208, 2002.

MADRZAK, C.J.; GOLINSKA, B.; KROLICZAK, J.; PUDELKO, K.; LAZEWSKA, D.; LAMPKA, D.; SADOWSKY, M.J. Diversity among field populations of *Bradyrhizobium japonicum* in Poland. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.1194-1200, 1995.

MAES, N.; GHELDRE, Y.D.; RYCK, R.D.; VANEECHOUTTE, M.; MEUGNIER, H.; ETIENNE, J.; STRUELENS, M.J. Rapid and accurate identification of *Staphylococcus* species by tRNA intergenic spacer length polymorphism analysis. **Journal of Clinica Microbiology**, Washington, v.35, p.2477-2481, 1997.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination – and in selection for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v.2, n.2, p.176-177, 1962.

MAHMOOD, A.; ATHAR, M.; QADRI, R.; MAHMOOD, N. Effect of NaCl salinity on growth, nodulation and total nitrogen content in *Sesbania sesban*. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, Zagreb, v.73, n.3, p.137-141, 2008.

MANCHANDA, G.; GARG, N. Salinity and its effects on the funcional biology of legumes. **Acta Physiologia Plantarum**, Berlin, n.30, p.595-618, 2008.

MARCHIORO, L.E.T. **Produção de ácido indol acetic e derivados por bactérias fixadoras de nitrogênio**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2005. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas), UFPR, Curitiba, 2005.

MARIANO, R.L.R.; ASSIS, S.M.P.; SILVEIRA, E.B.; GOMES, A.M.A. Mecanismos de ação de bactérias promotoras de crescimento. In: MARIANO,

R.L.R. (Coord), **Manual de práticas em fitobacteriologia**. Recife: UFRPE, 2000. 171p.

MAROSO, R.P. **Morfofisiologia comparada de *Lotus* spp. de diferentes hábitos de crescimento**. 2006. 127f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2006.

MARRIEL, I.E. **Efeitos de fatores limitantes sobre o crescimento de *Rhizobium japonicum* (Kirchner) buchana e de soja (*Glycine max.* (L.) Merrill)**. 1984. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1984.

MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F.M.; FRANCO, A. A.; GRAHAM, P.; PARDO, M.A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, United Kingdom, v.41, n.3, p.417-426, 1991.

MARY, P.; OCHIN, D.; TAILLIEZ, R. Growth status of rhizobia in relation to their tolerance to low water activities and desiccation stress. **Soil Biology and Biochemistry**, United States, v.18, p.179-184, 1986.

MATIRU, V.N.; DAKORA, F.D. Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.3, n.1, p.1-7, 2004.

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

MELO, R.R.; RODOLFO JÚNIOR, F. Superação de dormência em sementes e desenvolvimento inicial de canafistula (*Cassia grandis* L.f.). **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, São Paulo, ano IV, n.7, 2006.

MENDOZA, R.; ESCUDERO, V.; GARCÍA, I. Plant growth, nutrient acquisition and mycorrhizal symbioses of a waterlogging tolerant legume (*Lotus glaber* Mill.) in a saline-sodic soil. **Plant and Soil**, Springer Netherlands, v.275, p.305-315, 2005.

MERCADO-BLANCO, J.; GARCÍA, F.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, M.; OLIVARES, J. Melanin production by *Rhizobium meliloti* GR4 is linked to nonsymbiotic plasmid PRMEGR4B: cloning, sequencing, and expression of the tyrosinase gene *MEPA*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.175, n.17, p.5403-5410, 1993.

MILES, A. A.; MISRA, S. S. The estimation of the bacterial Power of blood. **Journal of hygiene**, Cambridge, v.38, p.732-749, 1938.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2.ed.atual e ampl., Lavras: Editora UFLA, 2006. 729p.

MOTT, J.J. High temperature contact treatment of hard seed in *Stylosanthes*. **Australian Journal of Agricultural Research**, Melbourne, v.30, n.5, p.847-854, 1979.

MUGLIA, C.I.; GRASSO, D.H., AGUILAR, O.M. *Rhizobium tropici* response to acidity involves activation of glutathione synthesis. **Microbiology**, United Kingdom, n.153, p.1286-1296, 2007.

MUKHERJEE, K.; ASANUMA, S. Possible role of cellular phosphate pool and subsequent accumulation of inorganic phosphate on the aluminium tolerance in *Bradyrhizobium japonicum*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.30, n.12, p.1511-1516, 1998.

MULLIS, K.B. Process for amplifying nucleic acid sequences. **US Patent** 4.683.202, 1987.

MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, United States, n.51, p.263-273, 1986.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Plant Physiology**, Washington, v.15, n.3, p.473-497, 1962.

NAVARRO, E.; SIMONET, P.; NORMAND, P.; BARDIN, R. Characterization of natural populations of *Nitrobacter* spp. using PCR/RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer. **Archives of Microbiology**, Berlin, v.157, p.107-115, 1992.

NEILANDS, J.B. Siderophores. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, n.1, p.1-3, 1993.

NEILANDS, J.B. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. **Journal of Biological Chemistry**, United States, n.270, p.26723-26732, 1995.

NIENABER, A.; HENNECKE, H.; FISHER, H.M. Discovery of a haem uptake system in the soil bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. **Molecular Microbiology**, Manchester, v.41, p.787-800, 2001.

NÓBREGA, R.S.A.; MOTTA, J.S.; LACERDA, A.M.; MOREIRA, F.M.S. Tolerância de bactérias diazotróficas simbióticas à salinidade *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.4, p.899-905, 2004.

NOGALES, J.; CAMPOS, R.; ABDELKHALEK, H.B.; OLIVARES, J.; LLUCH, C.; SANJUAN, J. *Rhizobium tropici* genes involved in free-living salt tolerance are required for the establishment of efficient nitrogen-fixing symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, United States, v.15, n.3, p.225-232, 2002.

NOYA, F.; ARIAS, A.; FABIANO, E. Heme compounds as iron sources for nonpathogenic *Rhizobium* bacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington, n.179, p.3076-3078, 1997.

O'HARA, G.W.; GOSS, T.J.; DILWORTH, M.J.; GLENN, R. Maintenance of intracellular pH and acid tolerance *Rhizobium meliloti*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.55, p.1870-1876, 1989.

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

PEICK, B.; GRAUMANN, P.; SCHMID, R.; MARAHIEL, M.; WERNER, D. Differential pH-induced proteins in *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium etli* CIAT 611. **Soil Biology and Biochemistry**, United States, v.31, p.189-194, 1999.

PEIXOTO, A. R. Controle biológico da murcha bacteriana do tomateiro, por *Pseudomonas* spp. fluorescentes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.27, n.1, p.153-160, 1997.

PELEGRIN, R.; MERCANTE, F.M.; OTSUBO, I.M.N.; OTSUBO, A.A. Resposta da cultura do feijoeiro à adubação nitrogenada e à inoculação com rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, n.33, p.219-226, 2009.

POPINIGIS, F. **Fisiologia de sementes**. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289p.

RAGLAND, M.; THEIL, E.C. Ferritin messenger RNA, protein and iron concentrations during soybean nodule development. **Plant Molecular Biology**, Springer Netherlands, n.21, p.555-560, 1993.

RAIJ, B.V. **Fertilidade do solo e adubação**. São Paulo, Piracicaba: Ceres, Potafos, 1991. 343p.

RANJARD, L.; BROTHIER, E.; NAZARET, S. Sequencing bands of ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints for characterization and microscale distribution of soil bacterium populations responding to mercury spiking. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, n.12, p.5334-5339, 2000.

RASA, S.; JORNSGARD, B.; ABOU-TALEB, H.; CHRISTIANSEN, J.L. Tolerance of *Bradyrhizobium* sp. (Lupini) strains to salinity, pH, CaCO<sub>3</sub> and antibiotics. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.32, n.6, p.379-383, 2001.

RÄSÄNEN, L.A.; LINDSTRÖM, K. Stability of short and long O-chain lipopolysaccharide types in *Rhizobium galegae* and their correlation with symbiotic properties and growth conditions, tolerance of low pH, aluminum and salt in the growth medium. **FEMS Microbiology Letters**, England, n.155, p.17-22, 1997.

RATLEDGE, C.; DOVER, L.G. Iron metabolism in pathogenic bacteria. **Annual Review of Microbiology**, United States, n.54, p.881-941, 2000.

REIGH, G.; O'CONNELL, M. Siderophore-mediated iron transport correlates with the presence of specific iron-regulated proteins in the outer membrane of *Rhizobium meliloti*. **Journal of Bacteriology**, Washington, p.94-102, 1993.

REIS, V.M. **Uso de bactérias fixadoras de nitrogênio como inoculante para aplicação em gramíneas**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2007.

RIBEIRO JÚNIOR, W.Q.; FRANCO, A.A.; LOPES, E.S. Tolerância de *Bradyrhizobium* sp. de Mimosoidea à acidez em meio de cultura. **Bragantia**, Campinas, v.47, n.2, p.333-340, 1988.

RICCILLO, P. M.; COLLAVINO, M. M.; GRASSO, D. H.; ENGLAND, R.; DE BRUIJN, F. J.; AGUILAR, O. M. A *guaB* mutant of *Rhizobium tropici* CIAT899 pleiotropically defective in thermal tolerance and symbiosis **Molecular Plant-Microbe Interactions**, United States, n.13, p.1228-1236, 2000a.

RICCILLO, P. M.; MUGLIA, C. I.; DE BRUIJN, F. J.; ROE, A. J.; BOOTH, I. R.; AGUILAR, O. M. Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance. **Journal of Bacteriology**, Washington, n.182, 1748-1753, 2000b.

RISSO, D.F.; CARÁMBULA, M. **Lotus el rincón** – producción y utilización de los mejoramientos. Montevideo: INIA – Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, 1998. 34p.

ROMERO-MARTINEZ, R.; WHEELER, M.H.; GUERRERO-PLATA, A.; RICO, G.; TORRES-GUERRERO, H. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. **Infection and Immunity**, Washington, v.68, p.3696-3703, 2000.

ROY, N.; CHAKRABARTTY, P.K. Effect of aluminum on the production of siderophore by *Rhizobium* sp. (*Cicer arietinum*). **Current Microbiology**, New York, n.41, p.5-10, 2000.

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

SAIKI, R.K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIN, H. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, v.230, p.1350-1354, 1985.

SANGOI, L.; ALMEIDA, M.L.; PUCCI, A.L.R.; STRIEDER, M.; ZANIN, C.G.; SILVA, L.C.; VIEIRA, R.J. A aplicação precoce de nitrogênio em cobertura não



umenta o rendimento de grãos de trigo cultivado na presença do alumínio. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.4, p.912-920, 2008.

SANTOS, A. Una visión global del género *Lotus* (Loteae, Fabaceae). **Lotus Newsletter**, Uruguay, v.37, n.2, p.52-53, 2007.

SANTOS, A.M.; DALL'AGNOL, M.; BISSANI, C.A.; SAWASATO, J.T.; BORTOLINI, F.; FLORES, R.A.; BROCCA, L.A.; ROCHA, E.A.; HUBER, K.G.C. Desenvolvimento de metodologia e avaliação preliminar de *Lotus corniculatus* cv. São Gabriel em resposta ao pH do solo. **Anais da XXI Reunião do Grupo Técnico em Forrageiras do Cone Sul** – Grupo Campos Desafios e Oportunidades do Bioma Campos Frente à Expansão e Intensificação Agrícola, 2006.

SCHEFFER-BASSO, S.M.; VENDRUSCOLO, M.C.; BÁREA, K.; BENINCÁ, R.C.; LUBENOW, R.; CECCHETTI, D. Comportamento de leguminosas (*Adesmia*, *Lotus*, *Trifolium*) em mistura com festuca. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.31, n.6, p.2197-2203, 2002.

SCHEFFER-BASSO, S.M.; VENDRUSCOLO, M.C.; CECCHETTI, D. Desempenho de leguminosas nativas (*Adesmia*) e exóticas (*Lotus*, *Trifolium*), em função do estágio fenológico no primeiro corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.34, n.6, p.1871-1880, 2005.

SCHEINERT, P.; KRAUSSE, R.; ULLMAN, U.; SOLLER, R.; KRUPP, G. Molecular differentiation of bacteria by PCR amplification of the 16S-23S Rna spacer. **Journal of Microbiological Methods**, New York, v.26, p.103-117, 1996.

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 plântulas de alfaca. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, n.3, p.658-664, 2008.

SCHWYNN, B.; NEILANDS, J.B. Universal chemical analysis for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.160, p.47-56, 1987.

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

SHANNON, C.E. The Mathematical Theory of Communication. **Bell System Technical Journal**, Illinois, v.27, p.379-423, 1948.

SHEREBEN, A.; ANSARI, R.; NAQVI, S.S.M.; SOOMRO, A.Q. Effect of salinity on *Rhizobium* sp., nodulation and growth of soybean (*Glycine max.* L.). **Pakistan Journal of Botany**, Pakistan, v.30, n.1, p.75-81, 1998.

SIKORA, S.; DEDZEPOVIC, S.; BRADIC, M. Genomic fingerprinting of *Bradyrhizobium japonicum* isolates by RAPD and rep-PCR. **Microbiological Research**, New York, v.157, p.213-219, 2002.

SILVA, M.A.G.; BOARETTO, A.E.; FERNANDES, H.G.; SCIVITTARO, W.B. Efeito do cloreto de potássio na salinidade de um solo cultivado com pimentão, *Capsicum annuum* L., em ambiente protegido. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.23, n.5, p.1085-1089, 2001.

SILVA, R.P. **Inoculação com rizóbio em caupi no sertão da Paraíba**. 2006. 41f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2006.

SILVA, V.N.; SILVA, L.E.S.F.; FIGUEIREDO, M.V.B. Atuação de rizóbios com rizobactéria promotora de crescimento em plantas na cultura do caupi (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v.28, n.3, p-407-412, 2006.

SILVEIRA, A.A. **Análise genética e funcional de genes relacionados à captação de sideróforos em *Bradyrhizobium elkanii***. 2009. 93f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Instituto Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

SIMMS, E.L.; TAYLOR, D.L. Partner choice in nitrogen-fixation mutualisms of legumes and rhizobia. **Integrative and Comparative Biology**, Oxford, v.42, n.2, p.369-380, 2002.

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

SINGLETON, P.W.; SWAIFY, S.A.; BOHLOOL, B.B. Effect of salinity on *Rhizobium* growth and survival. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.44, n.4, p.884-890, 1982.

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**, Viçosa, v.33, n.6, p.1654-1661, 2004.

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N.G. Aplicação e evolução dos métodos moleculares para o estudo da biodiversidade do rizóbio. **Documento Embrapa**, Seropédica, n.93, p.1-58, 1999.

TAMIMI, S.M. Genetic diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from root nodules of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in the soils of the Jordan Valley. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.19, p.183-190, 2001.

TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S.J. **Análise de solo, planta e outros materiais**. 2<sup>o</sup> ed., Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS, 1995. 174p.

THORNTON, F.C.; DAVEY, C.B. Acid tolerance of *Rhizobium trifolii* in culture media. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.47, p.496-501, 1983.

TONON, B.C. **Compatibilidade simbiótica e caracterização de rizóbios de *Lotus spp.*, isolados de solos do Rio Grande do Sul**. 2008. 80f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

TSAI, S.M.; BARAIBAR, A.V.L.; ROMANI, V.L.M. Efeito de fatores do solo. In: CARDOSO, E.J.B.N. (coord.) **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 1992.

UEDA, T.; SUGA, Y.; YAHIRO, N.; MATSUGUCHI, T. Phylogeny of sym plasmids of rhizobia by PCR-based sequencing of a *nodC* segment. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.177, p.468-472, 1995.

UPCHURCH, R.G.; ELKAN, G.H. Comparison of colony morphology, salt-tolerance and effectiveness in *Rhizobium japonicum*. **Canadian Journal of Microbiology**, Saskatoon, n.23, p.1118-1122, 1977.

VALENTIM, J.F.; CARNEIRO, J.C. Quebra da dormência e plantio de puerária em sistemas de produção agropecuários e agroflorestais. **Instruções Técnicas**: EMBRAPA, Brasília, n.17, p.1-3, 1998.

VARGAS, L.K.; LISBOA, B.B.; SCHOLLES, D.; SILVEIRA, J.R.P.; JUNG, G.C.; GRANADA, C.E.; NEVES, A.G.; BRAGA, M.M.; NEGREIROS, T. Diversidade genética e eficiência simbiótica de rizóbios noduladores de acácia-negra de solos do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, n.31, p.647-654, 2007.

VIDOR, C.; KOLLING, J.; FREIRE, J.R.J.; SCHOLLES, D.; BROSE, E.; PEDROSO, M.H.T. Fixação biológica do nitrogênio pela simbiose entre *Rhizobium* e leguminosas. **Boletim Técnico IPAGRO**, Porto Alegre, n.11, p.1-52, 1983.

VINCENT, J.M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific, 1970. 164p.

WANDERSMAN, C.; DELEPELAIRE, P. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. **Annual Review of Microbiology**, United States, n.58, p.611-647, 2004.

WANG, E.T.; ROGEL, M.A.; SANTOS, A.G.de los; MARTINEZ-ROMERO, J.; CEVALLOS, M.A.; MARTINEZ-ROMERO, E. *Rhizobium etli* bv. *mimosae*, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, United Kingdom, v.49, p.1479-1491, 1999.

WATKIN, E.L.J.; O'HARA, G.W.; GLENN, A.R. Physiological responses to acid stress of an acid-soil sensitive strain of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. **Soil Biology and Biochemistry**, United States, n.35, p.621-624, 2003.

WOOD, M. A mechanism of aluminium toxicity to soil bacteria and possible ecological implications. **Plant and Soil**, Sprinder Netherlands, v.17, p.63-69, 1995.

WOOD, M.; COOPER, J.E. Screening clover and *Lotus* rhizobia for tolerance of acidity and aluminium. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.17, n.4, p.493-497, 1985.

WOOD, M.; COOPER, J.E. Acidity, aluminium and multiplication of *Rhizobium trifolii*: effects of initial inoculum density and growth phase. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.20, p.83-87, 1988.

YEOMAN, K.H.; WISNIEWSKI-DYE, F.; TIMONY, C.; STEVENS, J.B.; DELUCA, N.G.; DOWNIE, J.A.; JOHNSTON, A.W.B. Analysis of the *Rhizobium leguminosarum* siderophore-uptake gene *fhuA*: differential expression in free-living bacteria and nitrogen-fixing bacteroids and distribution of an *fhuA* pseudogene in different strains. **Microbiology**, United Kingdom, n.146, p.829-837, 2000.

ZAGO, V.C.P.; DE-POLLI, H.; RUMJANEK, N.G. *Pseudomonas* spp. fluorescentes – bactérias promotoras de crescimento de plantas e biocontroladoras de fitopatógenos em sistemas de produção agrícola. **Documentos**, Embrapa Agrobiologia, Seropédia, n.127, p.1-34, 2000.

## 7. APÊNDICES

## Apêndice 1 – Meio extrato de levedura, manitol, ágar – LMA (Vincent, 1970)

Composição	Concentração (gL <sup>-1</sup> )
Manitol	10,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
NaCl	0,1
Extrato de levedura	0,4
Ágar	15,0
Água destilada	1000mL

Obs.: Ajustar pH em 6,8;

Se necessário, acrescentar 5mL de corante Azul de Bromotinol (0,5g azul de bromotinol e 100mL etanol) ou Vermelho Congo (0,5g vermelho congo e 100mL água destilada) por litro de meio LMA antes da medição de pH.

## Apêndice 2 – Composição do meio de cultura MWC\*

Composição	Concentração (µM)
CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1000
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	500
KCl	50
FeEDTA**	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> .2H <sub>2</sub> O	25
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	5
Glutamato de sódio***	1,8g/L
Arabinose***	0,3g/L
Galactose***	0,3g/L
Tiamina HCl***	100µg/L
Biotina***	250µg/L

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

## Apêndice 3 – Meio triptona levedura – TY (Somasegaram e Hoben, 1994)

Composição	Concentração (gL <sup>-1</sup> )
Triptona	5,0
Extrato de levedura	3,0
Cloreto de Cálcio	0,87
Água destilada	1000mL

Obs.: Ajustar pH em 6,8;

Para elaboração de meio sólido, acrescentar 15g de ágar por litro de meio.



## Apêndice 4 – Meio extrato de levedura e manitol – LM (Vincent, 1970)

Composição	Concentração (gL <sup>-1</sup> )
Manitol	10,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
NaCl	0,1
Extrato de levedura	0,4
Água destilada	1000mL

Obs.: Ajustar pH em 6,8.

#### Apêndice 5 – Solução de brometo hexadeciltrimetilamonio (HDTMA) 10mM

Em um balão volumétrico de 1000mL dissolver 3,645g de HDTMA em um pouco de água destilada estéril, agitar e completar o volume.

#### Apêndice 6 – Solução Férrica ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1mM e HCl 0,01N)

Solução de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1mM: em um balão volumétrico de 1000mL, dissolver 0,270g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  em um pouco de água destilada estéril, agitar e completar o volume;

Solução de HCl 0,01N: em um balão volumétrico de 1000mL, adicionar um pouco de água destilada estéril, em seguida, adicionar 0,82mL de HCl concentrado (36,5% a 38%), agitar e completar o volume com água destilada estéril.

## Apêndice 7 – Meio de King B – KMB (King et al., 1954)

Composição	Concentração (gL <sup>-1</sup> )
Proteose petona #3	20,0
Glicerol	10,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,5
Água destilada	1000mL

Obs.: Ajustar pH em 7,2;

Para elaboração de meio sólido, acrescentar 15g de Bacto Ágar por litro de meio.

## Apêndice 8 – Meio de Murashige e Skoog (1962) – MS

Composição	Concentração (mgL <sup>-1</sup> )
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> *	1650
KNO <sub>3</sub> *	1900
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	22,3
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6
KI	0,83
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
CoCl.6H <sub>2</sub> O	0,025
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37,25
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,85
Tiamina HCl	0,1
Ácido Nicotínico	0,5
Piridoxina HCl	0,5
Glicina	2,0
Mio-Inositol	100
Sacarose	30
Ágar	7,0
Água destilada	1000mL

\* \*\*Foram substituído por KCl.

Obs.: Ajustar pH em 5,8.