

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**ESPECIFICIDADE HOSPEDEIRA DE RIZÓBIOS AUTÓCTONES DOS  
SOLOS DO RIO GRANDE DO SUL, DOS ISOLADOS DE *Lotus corniculatus*,  
*L. glaber* e *L. uliginosus***

SILVIANE BARRA FERREIRA  
Bióloga (PUCRS)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Curso de Microbiologia Agrícola e do Ambiente como um dos requisitos para a obtenção de título de Mestre na área de Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Porto Alegre, RS, Brasil  
Novembro de 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO  
AMBIENTE

**ESPECIFICIDADE HOSPEDEIRA DE RIZÓBIOS AUTÓCTONES DOS  
SOLOS DO RIO GRANDE DO SUL, DOS ISOLADOS DE *Lotus corniculatus*,  
*L. glaber* e *L. uliginosus***

Silviane Barra Ferreira  
Bióloga (PUCRS)

Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá  
Orientador

Porto Alegre, RS, Brasil  
Novembro 2015

Dedico esse trabalho aos meus pais Acylio Olindo Ferreira, *in memoriam* e Ninpha Teresinha Barra Ferreira, e a minha irmã Anelise Barra Ferreira, que sempre me mostraram o caminho e me deram força, amor e carinho e me incentivaram para que eu seguisse uma carreira promissora.

## **AGRADECIMENTOS**

Á Deus que me concedeu a oportunidade de estar nessa vida, de ter saúde e força para seguir o meu caminho.

Ao Professor e Orientador Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá, pela paciência, orientação, amizade, compreensão, por todo o empenho, e acima de tudo, pela exigência. Seus ensinamentos foram fundamentais para a minha formação acadêmica.

Ao Professor Dr. João Ruy Jardim Freire que sempre me incentivou com suas palavras e ensinamentos a nunca desistir da pesquisa e a fazer esse curso como forma de ampliar os meus conhecimentos na área de Microbiologia Agrícola.

A comissão do Curso de Pós-Graduação de Microbiologia Agrícola e do Ambiente (PPGMAA) da Universidade Federal do Rio Grande (UFRGS) por me oportunizar a realização desse curso.

A minha amiga, colega e chefe do Laboratório de Microbiologia Agrícola da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO) Dra. Anelise da Silveira Beneduzzi pelo incentivo e compreensão que foram fundamentais para a realização nesse curso.

Ao meu amigo e colega de trabalho, da FEPAGRO, José da Silva Ferreira pela ajuda na casa de vegetação da UFRGS que foi sempre espontânea, ensinamentos que foram importantes para a realização desse trabalho e pela amizade.

Ao meu amigo, colega de trabalho da FEPAGRO, Gilmário Marques Silva, pelos ensinamentos ao longo de todo o período que me dediquei a pesquisa, que foram de grande valia para a realização desse trabalho, e pela amizade, parceria e paciência.

A minha amiga e colega da FEPAGRO, Eliane Villamil Bangel pelo incentivo, força nos momentos difíceis, ensinamentos e compreensão.

A minha amiga e colega da FEPAGRO, Fernanda Bertolo pela amizade colaboração, troca de conhecimentos e pela força nos momentos difíceis.

Aos meus amigos, colegas de bancada do Laboratório de Microbiologia do Solo e de aula da UFRGS, Victor L. Bassani, Vitor, Bruna Winck, Franquiéli Bonilha da Silva, Franciane Lemes Santos, Renata Bataioli, Márcia Orantas, Vanessa Silva, Taís Backers, Clarissa Borges pela parceria, carinho e amizade.

Ao meu colega e amigo Márcio Silveira do Laboratório de Microbiologia da UFRGS pelos ensinamentos, apoio e amizade.

Aos componentes da banca Dr. Gleidson Rieff, Professora Dr<sup>a</sup>. Sueli Van e a Dr<sup>a</sup>. Anelise Beneduzzi da Silveira, pela paciência, dedicação e sobretudo colaboração, incentivo, que foi fundamental para a conclusão desse trabalho.

A minha colega de FEPAGRO. Andréia Borges pela dedicação, paciência e empenho.

Ao meu namorado, parceiro e amigo Pedro Paulo Rael Schroeder pela paciência, força, amizade, carinho, colaboração, compreensão e dedicação em todos os momentos.

Ao pessoal da secretaria, biblioteca e a todos os professores do Curso de PGMAA pelo apoio, colaboração, dedicação, paciência e incentivo.

Obrigada!

# ESPECIFICIDADE HOSPEDEIRA DE RIZÓBIOS AUTÓCTONES DOS SOLOS DO RIO GRANDE DO SUL, DOS ISOLADOS DE *Lotus corniculatus*, *L. glaber* e *L. uliginosus*<sup>1</sup>

Autor: Silviane Barra Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá

## RESUMO

O estudo da simbiose entre leguminosas e bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico especificamente os rizóbios é de grande importância para o desenvolvimento de tecnologias que facilitem a adaptação de novas espécies, aumentem a produtividade e diminuam os custos de produção com o mínimo impacto ao solo e o ambiente. O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade dos rizóbios isolados de plantas de *Lotus corniculatus*, *L. glaber* e *Lotus uliginosus*, autóctones de solos do Estado do Rio Grande do Sul, em estabelecer simbiose em diferentes plantas hospedeiras. Estes isolados foram caracterizados fenotipicamente e testados quanto à capacidade de solubilização de fosfato de cálcio dibásico. Após essa etapa, os isolados foram avaliados, quanto a capacidade de induzir a formação de nódulos e a fixar biologicamente nitrogênio em plantas de *Lotus corniculatus* (cornichão), *L. glaber*, *L. uliginosus*, *Desmodium incanum* (pega-pega), *Macroptilium atropurpureum* Siratro), *Phaseolus vulgaris* (feijão-preto), *Mucuna deeringiana* (mucuna-anã) e *Cicer arietinum* (grão-de-bico). Esse fato evidenciou que a baixa especificidade hospedeira é uma característica bastante encontrada entre os rizóbios estudados. Os rizobios isolados mais promissores nessa etapa foram avaliados quanto à eficiência simbiótica em plantas de feijão preto em experimento em casa de vegetação. Avaliou-se o número e a massa seca dos nódulos e a parte aérea das plantas. As bactérias fixadoras de nitrogênio podem contribuir de forma significativa com maior fornecimento de N para a planta e, conseqüentemente, com aumento de massa seca da planta como demonstrado nesse trabalho. Existe grande variação na especificidade hospedeira de rizóbios autóctones isolados de plantas de *L. corniculatus*, de *L. glaber* e de *L. uliginosus*.

**Palavras-chave:** nodulação – rizóbios - especificidade

---

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, Brasil (p.) Novembro, 2015.

# HOST SPECIFICITY OF RHIZOBIA NATIVES OF SOIL SOUTHERN RIO GRANDE DO SUL, OF ISOLATES FROM *Lotus corniculatus*, *L. uliginosus* AND *L. glaber*

Author: Silviane Barra Ferreira

Adviser: Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá

## ABSTRACT

The study of the symbiosis of legumes plants and atmospheric nitrogen fixing bacteria, specifically rhizobia, has great importance to the development of technologies that facilitate the adaptation of new species, increase productivity and reduce production costs with minimal impact to the soil and environment. The objective of this study was to evaluate the ability of rhizobia, native from soils of Rio Grande do Sul State, in establishing symbiosis in different host plants. These isolates were phenotypically characterized and tested for dibasic calcium phosphate solubilization capability. After this step the isolates were evaluated for their ability to induce the nodule formation and nitrogen fixation in birds foot trefoil plants (*Lotus corniculatus*), *Lotus glaber*, *Lotus uliginosus*, “pega-pega” (*Desmodium incanum*), Siratro (*Macroptilium atropurpureum*) black beans (*Phaseolus vulgaris*), dwarf velvet bean (*Mucuna deeringiana*) and chickpea (*Cicer arietinum*) The most promising isolates were evaluated for symbiotic efficiency of black bean plants in an experiment in a greenhouse. We evaluated the number of nodules, dry mass of the nodules and the shoot. There is wide variation in the host specificity of indigenous rhizobia of birds foot trefoil plants (*L. corniculatus*), *L. glaber* and *L. uliginosus*. The rhizobia from *Lotus* sp plants are able to form symbiosis with plant *Desmodium incanum*, *Macroptilium atropurpureum*, *Phaseolus vulgaris*, *Mucuna deeringiana* and *Cicer arietinum*. The nitrogen fixing bacteria may contribute significantly to higher N supply to the plant and hence with increased dry weight of the plant as demonstrated in this work The low host specificity is a characteristic frequently found among the rhizobia isolates of birds foot trefoil plants (*L. corniculatus*), *L. glaber* and *L. uliginosus*.

**Keywords:** nodulation - rhizobia - specificity

---

<sup>1</sup>Master's thesis at the Graduate Program in Agricultural Microbiology and Environment - To obtain the degree of Master of Agricultural Microbiology and the Environment - Institute of Health Basic Sciences Federal University of Rio Grande do Sul Porto Alegre, RS. Brazil ( p.) September, 2015.

## SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Características dos Rizóbios.....	3
2.1.1 Especificidade hospedeira .....	4
2.2 Fixação Biológica do Nitrogênio.....	4
2.3 Simbiose rizóbio-leguminosa.....	5
2.4 Características de plantas estudadas.....	9
2.4.1 Características de plantas de <i>Lotus</i> spp.....	9
2.4.1.1 Características de <i>Lotus corniculatus</i> .....	10
2.4.1.2 Características de <i>Lotus uliginosus</i> .....	11
2.4.1.3 Características de <i>Lotus glaber</i> .....	12
2.5 Características de <i>Desmodium incanum</i> (pega-pega).....	13
2.6 Características das plantas de <i>Mucuna deeringena</i> ( <i>Mucuna</i> -anã) .....	14
2.7 Características das plantas de <i>Phaseolus vulgares</i> (feijão- preto).....	15
2.8 Características das plantas de grão-de-bico ( <i>Circe</i> <i>arietinum</i> ).....	16
2.9 Características das plantas de siratro ( <i>Macroptilium</i> <i>atropopureum</i> ).....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1 Caracterização fenotípica dos isolados de rizóbios.....	21
3.1.1 Avaliação da capacidade de solubilização de fosfato de cálcio dibásico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) dos isolados de rizóbios de <i>Lotus</i> spp.....	21
3.1.2 Reação de pH dos isolados de rizóbios em meio de cultura.....	23
3.2 Avaliação da capacidade dos rizóbios isolados de <i>Lotus</i> em induzir a formação de nódulos e a fixação biológica de nitrogênio em diferentes plantas hospedeiras .....	23
3.3 Avaliação dos rizóbios isolados de plantas de <i>Lotus</i> spp. quanto à eficiência na fixação simbiótica de nitrogênio em plantas de feijão preto ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) cultivados em vasos em casa de vegetação.....	24
3.4 Análise estatística.....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
4.1. Caracterização fenotípica dos isolados de rizóbios.....	28
4.1.1 Reação de pH dos isolados de rizóbios em meio de cultura.....	35
4.1.2. Capacidade de Solubilização de fosfato de cálcio dibásico pelos rizóbios estudados .....	31
4.2. Avaliação da compatibilidade dos rizóbios estudados com plantas hospedeiras.....	35



4.2.1	Compatibilidade hospedeira dos rizóbios isolados de plantas de <i>L. glaber</i> .....	46
4.2.2	Compatibilidade hospedeira dos rizóbios isolados de plantas de <i>L. uliginosus</i> .....	49
4.3	Avaliação dos isolados de rizóbios de <i>Lotus</i> quanto à eficiência simbiótica em plantas <i>Phaseolus vulgaris</i> (feijão-preto) em experimento em casa de vegetação.....	54
5.	CONCLUSÕES.....	58
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
7.	APÊNDICES .....	70
	APÊNDICE 1 - Características fenotípicas dos rizóbios isolados de plantas de <i>L. corniculatus</i> avaliados neste trabalho: diâmetro da colônia, tempo de crescimento, forma, consistência, densidade ótica, coloração da colônia em meio de cultura levedura manitol (LM) com vermelho Congo e ágar e a reação de pH em meio de LM com indicador azul de bromotimol.....	71
	APÊNDICE 2 - Características fenotípicas dos rizóbios isolados de plantas de <i>L. uliginosus</i> avaliados neste trabalho: diâmetro da colônia, tempo de crescimento, forma, consistência, densidade ótica, cromatografia da colônia em meio de cultura levedura manitol (LM) com vermelho Congo e ágar e a reação de pH em meio de cultivo LM com indicativo azul de bromotimol.....	72
	APÊNDICE 3 - Características fenotípicas dos rizóbios isolados de plantas de <i>L. glaber</i> avaliados neste trabalho: diâmetro da colônia, tempo de crescimento, forma, consistência, densidade ótica, coloração da colônia em meio de cultura levedura manitol (LM) com vermelho Congo e ágar e a reação de pH em meio de cultura LM com indicativo azul de bromotimol.....	76
	APÊNDICE 4 – Meio de levedura manitol (LM).....	77
	APÊNDICE 5 – Meio de Levedura Manitol Vermelho Congo (LMV).....	78
	APÊNDICE 6 - Meio de Levedura Manitol com Indicador de Azul de Bromotimol (ABT).....	79
	APÊNDICE 7 – Meio de Solubilização de Fosfato de cálcio dibásico.....	80
	APENDICE 8 – Solução Nutritiva de Sarruge (1975).....	81

## RELAÇÃO DE TABELAS

		Páginas
<b>TABELA 1:</b>	Isolados de rizóbios autóctones da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia da UFRGS.....	18
<b>TABELA 2:</b>	Estirpes de rizóbios estudados da Coleção e culturas de Rizóbios SEMIA da FEPAGRO.....	20
<b>TABELA 3:</b>	Índice de solubilização (IS) de fosfato de cálcio dibásico, em placas com meio de cultura, por rizóbios isolados de plantas de <i>L.corniculatus</i> .....	32
<b>TABELA 4:</b>	Índice de solubilização (IS) de fosfato de cálcio dibásico, em placas com meio de cultura, por rizóbios isolados de plantas de <i>L. glaber</i> .....	34
<b>TABELA 5:</b>	Índice de solubilização (IS) de fosfato de cálcio dibásico, em placas com meio de cultura, por rizóbios isolados de plantas de <i>L. uliginosus</i> .....	35
<b>TABELA 6:</b>	Indução da formação de nódulos radiculares (fenótipo Nod <sup>+</sup> ) e da fixação biológica de nitrogênio (fenótipo Fix <sup>+</sup> ) em plantas hospedeiras de <i>L. corniculatus</i> (cornichão), de <i>L. glaber</i> , de <i>L. uliginosus</i> , e de <i>D. incanum</i> (pega-pega), <i>Macropitilium atroporpureum</i> (siratro), <i>Phaseolus vulgaris</i> (feijão-preto), <i>Mucuna deeringeana</i> (mucuna-anã), <i>Circe arietinum</i> (grão-de-bico) por rizóbios isolados de <i>L. corniculatus</i> .....	41
<b>TABELA 7:</b>	Indução da formação de nódulos radiculares (fenótipo Nod <sup>+</sup> ) e da fixação biológica de nitrogênio (fenótipo Fix <sup>+</sup> ) em plantas de <i>L. corniculatus</i> (cornichão), de <i>L. glaber</i> , de <i>L. uliginosus</i> , e de <i>Desmodium incanum</i> (pega-pega), <i>Macropitilium atroporpureum</i> (siratro), <i>Mucuna deeringeana</i> (mucuna-anã) e <i>Circe arietinum</i> (grão-de-bico) por rizóbios isolados de <i>L. glaber</i> .....	47

<b>TABELA 8:</b>	Indução da formação de nódulos radiculares (fenótipo Nod <sup>+</sup> ) e da fixação biológica de nitrogênio (fenótipo Fix <sup>+</sup> ) em plantas de <i>L. corniculatus</i> (cornichão), de <i>L. glaber</i> , de <i>L. uliginosus</i> , e de <i>Desmodium incanum</i> (pega-pega), <i>Macropitilium atroporpureum</i> (siratro), <i>Mucuna deeringeana</i> (mucuna-anã) e <i>Circe arietinum</i> (grão-de-bico) por rizóbios isolados de <i>L. uliginosus</i> .....	52
<b>TABELA 9:</b>	Massa seca da parte aérea, massa seca de nódulos e número de nódulos de plantas de feijão preto ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ), inoculadas com rizóbios em casa de vegetação.....	55

## RELAÇÃO DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>FIGURA 1:</b> Reação de pH de isolados de rizóbios obtidos de plantas de <i>L. corniculatus</i> , <i>L. glaber</i> e <i>L. uliginosus</i> em meio de cultura com indicador azul de bromotimol.....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NH<sub>4</sub> – amônia

NO<sub>3</sub> – nitrato

N<sub>2</sub> – nitrogênio

*nif* – gene de fixação biológica de nitrogênio

ATP - trifosfato de adenosina

Lc – *Lotus corniculatus*

Lu – *Lotus uliginosus*

Lg – *Lotus glaber*

ABT – Azul de bromotimol

LM – Meio levedura manitol

FBN – fixação biológica de nitrogênio

Nod – nodulação

Fepagro – Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária

UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

## 1. INTRODUÇÃO

A interação simbiótica entre leguminosas e bactérias diazotróficas (ou fixadoras de nitrogênio) conhecidas como rizóbios, ocorre devido à compatibilidade entre a planta hospedeira e bactéria simbiote. No entanto, esta interação apresenta diferentes graus de compatibilidade, podendo variar de alta especificidade, quando determinado rizóbio induz a nodulação e realiza a fixação biológica de nitrogênio (FBN) em uma única espécie de planta, até baixa especificidade, quando possui múltiplas plantas hospedeiras. Os rizóbios com baixa especificidade podem ser eficientes na FBN com diversas leguminosas ou, então, apresentarem ineficiência total. A população de rizóbios nativos de um solo pode ser menos eficiente na FBN em plantas cultivadas do que as estirpes introduzidas via inoculação, podendo-se estabelecer uma simbiose ineficiente com a leguminosa, o que dificulta a adaptação.

Logo, o estudo da simbiose entre leguminosas e bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico é de grande importância para o desenvolvimento de

tecnologias que facilitem a adaptação de novas espécies, aumentem a produtividade e diminuam os custos de produção com o mínimo de agressão ao solo e ao meio ambiente, e o desenvolvimento de plantas exóticas.

Para tanto, este trabalho fundamentou-se na hipótese que existem isolados de rizóbios de plantas de *Lotus corniculatus* (cornichão), *Lotus glaber*, *Lotus uliginosus* autóctones nos solos do Estado do Rio Grande do Sul simbioses de plantas que possuem uma especificidade hospedeira.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade desses rizóbios, autóctones de solos do Estado do Rio Grande do Sul quanto à capacidade de estabelecer simbiose com diferentes plantas hospedeiras, tais como: *Lotus corniculatus* (cornichão), *Lotus glaber*, *Lotus uliginosus*, *Desmodium incanum* (pega-pega), *Macroptilium atropurpureum* (siratro), *Phaseolus vulgaris* (feijão-preto), *Mucuna deeringiana* (mucuna-anã) e *Cicer arietinum* (grão-de-bico).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Características dos Rizóbios

São consideradas bactérias Gram-negativas, aeróbicas obrigatórias, apresentam forma de bastonetes, não formam endósporos, e possuem tamanho variado entre 0,5-0,9 por 1,2-3 $\mu$ m (Somasegaran e Hoben, 1994). O número e a posição de flagelos dependem do gênero (Somasegaran e Hoben, 1994). São bactérias geralmente quimiorganotróficas, com exceção de algumas espécies de *Bradyrhizobium japonicum*, que são quimiolitotróficas (Moreira e Siqueira, 2006).

Os rizóbios são bactérias conhecidas devido à sua capacidade de fixar o nitrogênio atmosférico quando em simbiose com plantas da família das leguminosas (Graham, 2008). Segundo Cardoso e Freitas (1992) e De Carvalho et al. (2008), os rizóbios seriam parasitas extremamente refinados, que por meio de uma evolução conjunta com o hospedeiro transforma o processo parasitário em simbiótico, causando muito mais benefício do que danos.



Para Peres (1979), a escolha de estirpes de rizóbios que apresentam baixa especificidade é recomendável, uma vez que a variabilidade genética entre os cultivares de leguminosas tem sido apontada como uma das causas que afetam a eficiência FBN das estirpes durante a simbiose.

### **2.1.1. Especificidade hospedeira**

A especificidade é uma habilidade que uma estirpe de rizóbio tem em induzir a nodulação, e fixar ou não nitrogênio quando está em associação com cultivares ou espécies de plantas hospedeiras específicas. Conforme estudos de Peres et al. (1993), essa especificidade é considerada uma importante característica em programas de seleção de estirpes.

Segundo Neves et al. (1996) e De Carvalho (2008) não é uma regra as espécies de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* apresentarem um alto grau de especificidade em relação ao hospedeiro, mas sim uma exceção. Ou seja, as espécies de plantas hospedeiras são normalmente colonizadas por mais de um gênero de *Rhizobium* ou *Bradyrhizobium*, realizando o processo de fixação biológica do nitrogênio. Logo é mais comum as espécies apresentarem um grau baixo de especificidade.

## **2.2 Fixação Biológica do Nitrogênio**

Nas plantas o nitrogênio (N) é um componente responsável por várias reações além de fazer parte da estrutura da clorofila, de enzimas e proteínas. Por ser um elemento essencial, seu balanço afeta a formação de raízes e o crescimento foliar. A consequência disso é a diminuição do crescimento das plantas e da produtividade (Taiz e Zieger, 2004).

Assim, a disponibilização de nitrogênio para as culturas pode ocorrer de forma diferenciada de acordo com cada espécie vegetal. Este nutriente pode ser absorvido do solo na forma de amônia em ( $\text{NH}_4^+$ ) ou de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), ou ainda através do nitrogênio atmosférico ( $\text{N}_2$ ) por fixação biológica. Nas leguminosas o N é absorvido na forma de  $\text{N}_2$  e transformado  $\text{NH}_4$  através do processo simbiótico com bactérias (Taiz e Zieger, 2004). Essa associação é a simbiose entre plantas leguminosas e bactérias do gênero *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Photorhizobium*, *Sinorhizobium* (Taiz e Zieger, 2004).

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) envolve uma sucessão de processos, começando com a adaptação da bactéria à planta até a fixação de nitrogênio atmosférico. A nodulação pode ocorrer em aproximadamente duas horas após o contato da bactéria com as raízes. Os nódulos primários se desenvolvem em regiões de alongamento e nas zonas de formação de pequenos pelos radiculares, considerada a região preferencial para a fixação da bactéria (Taiz e Zieger, 2004).

### **2.3 Simbiose rizóbio-leguminosa**

A simbiose entre leguminosas e bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico é amplamente aceita como alternativa à fertilização química, não interferindo e causando danos ao ecossistema (Holt, 1994). Sendo assim, os rizóbios que são bactérias com grande capacidade de formar nódulos em raízes e caules de leguminosas possuem um papel importante na agricultura sustentável. Devido a essa importância ecológica e econômica dos rizóbios, a diversidade dessas bactérias tem sido investigada extensivamente e a

classificação taxionômica dos rizóbios vem se alterando significativamente ao longo dos anos (Liu et al., 2005).

Há uma formação de nódulos, que ocorre durante a FBN que é controlada, em grande parte, pela troca de sinais entre os rizóbios e a planta hospedeira. Devido à diversidade de compostos e metabólicos secundários que compõem os exsudados radiculares, as plantas podem enviar um número bem distinto de sinais. Esses sinais são altamente específicos entre o hospedeiro e o simbiote, pois diferem consideravelmente entre as leguminosas, e esta especificidade possibilita que os rizóbios simbiotes identifiquem seus hospedeiros específicos (Bais, et al., 2004).

A simbiose rizóbio-leguminosa é entre os sistemas biológicos capaz de aproveitar o nitrogênio diretamente da atmosfera, tornando-se a mais especializada, pois é esse processo de promoção de crescimento vegetal o mais estudado nas bactérias associativas e endofíticas, sendo bastante conhecida a contribuição de bactérias conhecidas como nodulíferas para a nutrição de leguminosas (Holt, 1994).

No Rio Grande do Sul, há uma grande diversidade de espécies de plantas pertencentes à família das leguminosas (Pereira, et al., 2008). Segundo os autores Vargas (1997), Hungria (1998) e Frizzo (2007), dentre as subfamílias de leguminosae a papilionoideae, e a família Fabaceae é a que representa o grupo mais numeroso e com maior número de espécies capazes de formar nódulos. Nesta família estão importantes plantas produtoras de grãos para a alimentação humana e animal, como o *Phaseolus vulgaris* (feijão), *Pisum sativum* (ervilha) e *Glycine max* (soja), para a produção de forragens,

como a alfafa (spp.), os *Lotus* spp (cornichões), os *Trifolium* spp (trevos) e *Desmodium intantum* (pega-pega), para a produção de adubos verdes como a *Stizolobium* spp (mucuna), o *Cajanus cajan* (guandu) e a *Vicia sativa* (ervilhaca).

Das associações entre plantas e bactérias diazotróficas a simbiose entre leguminosas e rizóbios é a mais eficiente na fixação biológica de nitrogênio. Segundo Moreira e Siqueira (2006), os teores de nitrogênio no tecido das leguminosas são maiores que em plantas de outras famílias. Uma planta leguminosa sem associação com rizóbios, necessita que o nitrogênio esteja disponível no solo. No entanto, quando o rizóbio realiza uma simbiose eficiente com essa planta, o nitrogênio é fornecido pela bactéria suprimindo parcial ou totalmente as demandas da planta. A soja, por exemplo, cuja área de cultivo no Brasil ultrapassa as 20 milhões de hectares, quando devidamente inoculada com estirpes eficientes de *Bradyrhizobium*, dispensa totalmente o uso de fertilizantes nitrogenados (Alves et al, 2006), representando grande economia de recursos e diminuindo o potencial de poluição por nitrato.

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

Os fatores de nodulação atuam no estabelecimento da especificidade pela planta hospedeira. A estrutura formada pelo produto dos genes *nodABC* é essencial para o estabelecimento da simbiose onde o gene *nodA* sintetiza uma acil transferase, *nodB* uma desacetilase e *nodC* uma N-acetilglicosamil transferase. A união dessas moléculas resulta na formação de um lipo-poligossacarídeo que é reconhecido pelas células das raízes da planta, e juntamente com uma série de hormônios liberados pelas bactérias (auxinas e citocininas), provocam o encurvamento do pelo radicular (Loh e Stacey, 2003).

Em seguida, a expressão de um gene de iniciação da nodulação pelos rizóbios, a nodulina (*enoE*), provoca uma série de alterações na estrutura do pelo radicular formando um cordão de infecção que permite finalmente a entrada da bactéria pela raiz, seguido pela infecção da planta e o desenvolvimento dos nódulos (Pereira, 2008).

Com a formação dos nódulos, inicia-se o processo de FBN. Esse processo é regulado pelos genes *nif* e *fix* que são responsáveis pela síntese e regulação de um sistema enzimático, onde se inclui a nitrogenase, que atua como catalizadora da reação, e que é capaz de reduzir o nitrogênio atmosférico ( $N_2$ ) em amônia ( $NH_3$ ) (Argudo et al., 2004). Esse complexo enzimático é altamente conservado em termos de estrutura e função constituindo basicamente de duas meias proteínas: uma proteína chamada ferro-proteína, que se liga ao ATP e atua como doadora de elétrons, e outra proteína molibdênio-ferro proteína que contém o sítio de redução do substrato que transforma o  $N_2$  em amônia ( $NH_3$ ) (Burris, 1993; Roberts, 1993; Ferguson, 1998). A amônia é então liberada para o citosol da célula infectada pelos

transportadores da membrana (Taiz e Zieger, 2004). Lopes, et al. (1976) relata que estirpes de *Rhizobium* podem apresentar potencial simbiótico bastante variado dependendo da leguminosa hospedeira com a qual estiverem associados.

O autor Vincent (1970), relata que diversos testes morfofisiológicos, bioquímicos e simbióticos, tais como: taxa de crescimento em meio de cultura contendo manitol, a habilidade de utilizar diferentes fontes de carbono e assim nodular foram utilizadas para identificar a relação simbiótica entre rizóbios e leguminosas hospedeiras.

## **2.4 Características das leguminosas estudadas**

### **2.4.1 Características de plantas de *Lotus* spp.**

Essas plantas do gênero *Lotus* são consideradas exóticas no Rio Grande do Sul, e foram encontradas em diversas cidades do estado. E algumas espécies vêm sendo cultivadas pelo seu potencial forrageiro. Além disso, possuem diversas vantagens que as tornam bem sucedidas, como melhor adaptabilidade a solos ácidos e crescimento em baixa disponibilidade de fósforo. Esses fatores são determinantes para sua razoável adaptação às condições ecológicas de pastagens naturais do sul do Brasil e norte do Uruguai e terras agricultáveis do nordeste do Uruguai e Argentina (Baraibar et. al., 1999).

Normalmente, as espécies de *Lotus* spp possuem uma especificidade quanto a *Rhizobium*, para uma efetiva nodulação (Blumenthal e McGraw, 1999). Sendo assim, essas espécies estabelecem FBN com

bactérias altamente específicas pertencentes aos gêneros *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium* (Jarvis e Pankhurst, 1977). Como regra geral, os rizóbios que são noduladores de espécies de *Lotus* têm uma estreita gama de hospedeiros, mas algumas cepas de *Mesorhizobium* possuem uma ampla gama de hospedeiros, uma vez que podem formar nódulos na maioria de espécies de *Lotus*. No entanto, a eficiência simbiótica de ampla gama de hospedeiros do *Mesorhizobium* é baixa em comparação com a de estirpes hospedeiras restritas (Barrientos, 2002; Estrella, 2008).

Com base em estudos, dessa parceria entre *Rhizobium* e as plantas hospedeiras, existem três grupos no gênero *Lotus*: *Lotus corniculatus*, *L. glaber* e *L. uliginosus* (Baraibar e Frioni, 1999).

#### **2.4.1.1. Características de *Lotus corniculatus***

O gênero *Lotus corniculatus* é uma planta leguminosa forrageira pertencente à família Fabaceae. São plantas perenes e anuais, adaptadas a vários ambientes, como o sul do Brasil, Uruguai, Argentina e Chile (Beuselinck, 1999). Essas plantas adaptam-se a ambientes secos, como solos mal drenados ou com restrições de umidade por um determinado período de tempo (Barrientos et al., 2002; Frizzo, 2008). Além disso, essa planta se destaca por ser tolerante a acidez e à baixa fertilidade do solo. Segundo Brose (1994) e Soster et al. (1994) essas plantas são bastante utilizadas em misturas de espécies de inverno e para introdução sobre o campo nativo, proporcionando uma melhor distribuição ao longo do ano e aumentando a qualidade e a produção de massa seca. Esse gênero está bem difundido no estado do Rio

Grande do Sul, onde as pastagens naturais cessam o crescimento no inverno (Araújo e Jaques, 1974).

Segundo Paim (1988) o cultivar de São Gabriel, no Rio Grande do Sul é o mais caracterizado por apresentar boa produtividade, elevada quantidade de forragem e capacidade de ressemeadura ao natural. Já segundo Lopes et al. (1976), a popularidade dessas plantas está ligada ao seu alto valor nutritivo, como pastagem, e na sua pouca exigência quanto as condições do solo.

Do prisma da taxonomia a planta *L. corniculatus* tem um grande índice de FBN, pois forma nódulos e fixa nitrogênio apenas quando é inoculada por bactéria do gênero *Mesorhizobium* (*Mesorhizobium loti*) (Jarvis et al. 1997; Know, 2005).

#### **2.4.1.2 Características de *Lotus uliginosus***

A espécie *Lotus uliginosus*, é uma leguminosa pertencente à família Fabaceae, originária do Mediterrâneo (Smith, 1975). Essa planta apresenta sinonímia de *L. pedunculatus* (Barclay, 1961). Esse gênero é altamente adaptado nos solos do Uruguai (Hernández et al., 2005). Segundo Gwymne e Beckett (1980), são fatores determinantes no rendimento da matéria seca das leguminosas: a nodulação e a fixação de nitrogênio. O *Rhizobium* específico para *L. uliginosus* raramente ocorre em terras altas, ou seja, zonas montanhosas (Hernández et al., 2005).

É uma pastagem perene, que tem alta tolerância a solos ácidos e deficientes em fósforo (Paim et al., 1991), apresentando também adaptação as



áreas úmidas (Scheffer-basso et al., 2001). A resisitência e alta produção de forragem são as principais características para melhorar a área de campo natural e a criação de gado (Risso et al., 1990).

Essa planta estabelece FBN com estirpes de crescimento lento do gênero *Bradyrhizobium* (Estrella, 2008).

#### **2.4.1.3 Características de *Lotus glaber***

A espécie *Lotus glaber* tem bom crescimento em campo alagado na região centro-oeste da Argentina, crescimento ótimo no outono e na primavera, tolera baixas temperatura, cobertura de gelo e ambientes de muita salinidade (Vignolio et al. 1999).

No Brasil, a espécie *L. glaber* pertence ao grupo das leguminosas que foi introduzido e que apresenta boa adaptabilidade às condições de clima do Rio Grande do Sul, podendo ser uma alternativa para uso em solos com limitações, como ambientes úmidos de clima temperado (Blumenthal e Mc Graw, 1999).

O principal grupo de rizóbios eficientes em simbiose com *L. glaber* é o gênero *Mesorhizobium* (*Mesorhizobium loti*), mesmo grupo de simbiontes em plantas de *L. corniculatus* (Irisarri et al., 1996; Baraibar et al. , 1999; Labandera, 2007). São bactérias de crescimento rápido e de alta produção de goma em meio manitol como única fonte de carbono. No entanto, *L. glaber* pode formar simbiose com outros rizóbios, podendo desenvolver nódulos ineficientes na fixação de nitrogênio (Irisarri et al., 1996). Segundo Fontoura, (2011), nos solos do Rio Grande do Sul existem rizóbios nativos capazes de estabelecer relação simbiote com planta de *L. glaber*, o que por sua vez facilita a FBN.

## **2.5 Características de *Desmodium incanum* (pega-pega)**

O gênero *Desmodium* Desv. (Fabaceae-Faboideae) possui cerca, de 33 espécies no Brasil, conhecidas popularmente, pelo nome de “pega pega”, “carrapicho-beiço-de-boi”, “amor-agarrado” e “carrapicho”, devido à aderência dos frutos. Algumas espécies podem ser consideradas pioneiras para o reflorestamento e outras apresentam alto valor forrageiro. O gênero está amplamente distribuído na região sul do Brasil, apresentando maior riqueza específica encontrada (Freitas, 2012).

No Rio Grande do Sul a espécie *Desmodium incanum* (DC) é considerada uma planta nativa, ótima forrageira e a mais comum nos campos da região da Depressão Central do estado do Rio Grande do Sul (Barreto e Kappel, 1964). Essas espécies são ocorrentes nas pastagens naturais do estado, e destacam-se por ter abundante distribuição no pampa gaúcho (Oliveira, 1983). Também são encontradas em vários ambientes, desde locais sombreados ou ensolarados, em mata, cerrado, capoeira, várzea, margens de estrada, dunas, campos e áreas cultivadas (Boldrini, 1993; Overbeck, et al., 2007; Silva, 2013; Granada, 2014).

Granada (2014), em seu trabalho descreve que as espécies do gênero *Desmodium* são consideradas plantas hospedeiras capazes de serem colonizadas em sítios específicos na raiz por rizóbios, formando nódulos e fixando N. Esse é biologicamente assimilável pela planta (na forma de amônia) e, ao mesmo tempo beneficia outras espécies associadas, por meio da liberação de exsudados radiculares e da reciclagem dos resíduos da leguminosa.

## **2.6. Características de *Mucuna deeringiana* (Mucuna-anã)**

A espécie *Mucuna deeringiana* é uma forrageira leguminosa da família Fabaceae, anual de verão, porte baixo e crescimento determinado (não trepadora). É considerada uma planta de cobertura, por cobrir bem o solo nas entrelinhas de pomares e outras culturas perenes, permitindo o trânsito de máquinas e pessoas. É recomendada especialmente para consórcio com a cultura do cafeeiro, por não ser hospedeira de nematóides de galha. Ótima para adubação verde e cobertura vegetal. A adubação verde se destaca entre as práticas capazes de aperfeiçoar o aproveitamento e os benefícios da matéria orgânica do solo. O uso de espécies leguminosas como adubo verde possibilita maximizar a nutrição nitrogenada dos cultivos agrícolas, uma vez que são capazes de se associarem simbioticamente com bactérias fixadoras de nitrogênio (Martins, 2012).

A adubação verde é uma prática agrícola que consiste no plantio de espécies vegetais, tanto de ciclo anual como perenes, em sistema de rotação ou em consórcio com culturas de interesse econômico. O uso dessas espécies de leguminosas é bastante difundido e tem sido responsável pela maximização da FBN nos sistemas agrícolas. Esta prática é um processo natural e caracterizado por melhorar as condições químicas, físicas e biológicas do solo, através da redução das perdas por erosão, aumento do teor de matéria orgânica, da capacidade de troca catiônica, da reciclagem dos nutrientes e pelo controle de nematóides e de plantas invasoras (Machado e Favaretto, 2000; Jacobi e Fleck, 2000). Nesse pressuposto, o aporte de nitrogênio via associação entre leguminosas empregadas como adubos verdes e rizóbios é um ponto chave para a manutenção dos sistemas agrícolas. Tendo em vista

que, os sistemas são baseados nos princípios agroecológicos, e que o nitrogênio é o quarto elemento mais abundante na biomassa, após o carbono, o oxigênio e o hidrogênio específicos para cada adubo verde, visando assim a utilização como inoculante para essas culturas (Bratti, 2005).

### **2.7 Características de *Phaseolus vulgares* (feijão preto)**

O feijão preto (*Phaseolus vulgares*) é um dos principais constituintes da dieta brasileira, por ser uma excelente fonte de proteína e, portanto um produto de grande importância econômico social (Peloso, 2003). A interação do feijoeiro com bactérias fixadoras de nitrogênio atmosférico pode aumentar a produtividade e diminuir os custos de produção (Embrapa Arroz e Feijão, 2012).

Sampaio (2013) relata que a inoculação de plantas leguminosas com rizóbios capazes de realizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN), tem sido amplamente discutida, com base em estudos que indicam a viabilidade de utilização na agricultura, visto que a FBN diminui em parte o passivo ambiental gerado pelo elevado consumo de fertilizante nitrogenado. A utilização de genótipos silvestres de feijoeiro visa obter uma maior diversidade de rizóbios para isolamento e estudo da capacidade de FBN, o que poderá resultar em maior especificidade simbiótica para a cultura de feijoeiro.

A FBN no feijoeiro, assim como em outras leguminosas da família Fabaceae (= Leguminosae), é um processo simbiótico complexo, que envolve várias etapas, incluindo modificações fisiológicas e morfológicas, tanto na planta hospedeira com na bactéria. As bactérias diferenciam se em bacterióides nos nódulos da planta hospedeira, fixando nitrogênio pela redução

de enzimas, do nitrogênio atmosférico à amônia. Em troca, a planta supre a bactéria com fontes de energia e carbono para sua manutenção (Mercadante et al., 2002).

Estudos tem pontuado que *P. vulgares* apresenta interação positiva com diversos rizóbios, principalmente do gênero *Rhizobium* (Michiels et al., 1998, Prévost et al., 2012).

### **2.8 Características de *Cicer arietinum* (Grão-de-bico)**

O grão-de-bico é uma leguminosa, pertencente à família Fabaceae, gênero *Cicer*, espécie *Cicer arietinum* sendo indicada para cultivos de outono e inverno e apresenta extensa variação na forma, tamanho e coloração dos grãos (Embrapa, 2005).

É uma planta herbácea, que mede entre 20 e 50 cm de altura, de flores brancas que desenvolvem uma bainha, em cujo interior se encontra 2 ou 3 grãos no máximo. Os grãos apresentam uma coloração castanho-clara (ou verde), e são arredondados, tendo uma pequena “espora”. A sua periodicidade é anual. A planta é tolerante à seca e cresce em ampla gama de temperatura (15 a 25°C) de modo que a fase de plantação ótima é executada de 15 de novembro até 30 de dezembro, desenvolvido em um pH que varia entre 5 a 7. De preferência se desenvolve em solos que não contém altos níveis de cálcio ou sem matéria orgânica em decomposição, ele é suscetível a excesso de umidade e semeadura repetidas no mesmo terreno (Embrapa, 2005).

O grão-de-bico é uma das principais fontes proteicas vegetais em nível mundial, sendo sua produção de aproximadamente 9,4 milhões de toneladas por ano. Na Índia há a produção cerca de 74% desse total de

toneladas, sendo que o Paquistão, Turquia, Austrália, Myanmar e Canadá são também grandes produtores (Braga e Viera, 1998; Faostat, 2011).

No Brasil o grão-de-bico é cultivado principalmente na região Sul do país, por se adaptar melhor a regiões frias, entretanto a produção brasileira ainda é pequena e, por isso não existem registros nacionais e mundiais. Essa produção é insuficiente para atender o consumo intenso, havendo a necessidade de importação de quantidades crescentes (Rural New, 2005; Braga & Viera, 1998).

Estudos para seleção de isolados de rizóbios para plantas de grão-de-bico com alta capacidade de fixação biológica de nitrogênio vêm sendo realizados em países mediterrâneos como França, Itália e Síria (Cleyet-Mariel et al, 1990). A inoculação de isolados de rizóbios selecionados apresentou um aumento de até 27% na produção de grãos-de-bico, em comparação com a adubação nitrogenada (Cleyet-Mariel et al, 1990). No Brasil os estudos comparam o efeito da inoculação na produção de grão junto com a utilização de adubação nitrogenada e fosfatada, mas não há referências aos isolados utilizados (Braga e Vieira, 1998; Voss et al., 2002).

## **2.9 Siratro (*Macroptilium atropurium*)**

O *Macroptilium atropurium* (DC) Urban é uma leguminosa originária da América central, rasteira, perene, inflorescência do tipo racemos, flor aglomerada no ápice, de cor roxo-escuro, folhas trifoliadas. Desenvolve-se na maioria dos solos, porém, não tolera os úmidos, tem boa tolerância à seca e ao pisoteio. Seu hábito de crescimento é trepador, facilitando sua convivência

com as gramíneas, principalmente com as cespitosas (touceiras). Distribuí-se naturalmente, na América Central e no Sul. A variedade de Siratro, obtida da Austrália, tem interesse agrônômico. A variedade tornou-se uma leguminosa das mais populares nos trópicos, pela sua característica de ser resistente à seca, em pequena intensidade, e à geada, e tem um bom rendimento de pastagem (Vilela, 2000).

Segundo Tavares et al (2012), o Siratro é uma leguminosa forrageira muito utilizada para a recuperação de pastagens, pois tem a função de produção de matéria seca e elevada fixação de nitrogênio (Macharia, 2010). A fixação de nitrogênio nessas leguminosas ocorre nos nódulos denominados de crescimento determinado (Sprent e Parsons, 2000).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram estudados neste trabalho 127 isolados de rizóbios autóctones (Tabela 1), que estão depositados na Coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia do Solo da Faculdade de Agronomia da UFRGS. Esses isolados foram obtidos de plantas de *Lotus corniculatus*, *L. uliginosus* e *L. glaber* através de trabalhos desenvolvidos por Frizzo (2007) e Fontoura (2007), a partir de amostras de solos e plantas, no Rio Grande do Sul.

Também foram estudadas 22 estirpes de rizóbios (Tabela 2) fornecidas pela Coleção SEMIA de rizóbios da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio Grande do Sul (FEPAGRO).

**TABELA 1** - Isolados de rizóbios autóctones da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia do Solo da Faculdade de Agronomia da UFRGS

---

Isolados obtidos de plantas de *Lotus corniculatus*

---

UFRGS Lc 2	UFRGS Lc 111	UFRGS Lc 198
UFRGS Lc 3	UFRGS Lc 112	UFRGS Lc 199
UFRGS Lc 8	UFRGS Lc 119	UFRGS Lc 200
UFRGS Lc 9	UFRGS Lc 122	UFRGS Lc 204

---



**TABELA 1 – continuação...** Isolados de rizóbios autóctones da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia do Solo da Faculdade de Agronomia da UFRGS

Isolados obtidos de plantas de <i>Lotus corniculatus</i>		
UFRGS Lc 10	UFRGS Lc 124	UFRGS Lc 210
UFRGS Lc 12	UFRGS Lc 126	UFRGS Lc 213
UFRGS Lc 14	UFRGS Lc 127	UFRGS Lc 214
UFRGS Lc 17	UFRGS Lc 128	UFRGS Lc 215
UFRGS Lc 19	UFRGS Lc 131	UFRGS Lc 218
UFRGS Lc 27	UFRGS Lc 133	UFRGS Lc 223
UFRGS Lc 61	UFRGS Lc 104	UFRGS Lc 192
UFRGS Lc 62	UFRGS Lc 109	UFRGS Lc 193
UFRGS Lc 63	UFRGS Lc 110	UFRGS Lc 194
UFRGS Lc 64	UFRGS Lc 135	UFRGS Lc 195
UFRGS Lc 71	UFRGS Lc 141	UFRGS Lc 196
UFRGS Lc 72	UFRGS Lc 142	UFRGS Lc 197
UFRGS Lc 73	UFRGS Lc 144	UFRGS Lc 404
UFRGS Lc 78	UFRGS Lc 151	UFRGS Lc 421
UFRGS Lc 79	UFRGS Lc 166	UFRGS Lc 422
UFRGS Lc 83	UFRGS Lc 175	UFRGS Lc 434
UFRGS Lc 85	UFRGS Lc 183	UFRGS Lc 443
UFRGS Lc 94	UFRGS Lc 185	UFRGS Lc 453
UFRGS Lc 102	UFRGS Lc 187	UFRGS Lc 458
UFRGS Lc 103	UFRGS Lc 189	UFRGS Lc 512
UFRGS Lc 105	UFRGS Lc 191	UFRGS Lc 519
Isolados obtidos de plantas de <i>Lotus glaber</i>		
UFRGS Lg 8	UFRGS Lg 59	UFRGS Lg 102
UFRGS Lg 9	UFRGS Lg 62	UFRGS Lg 103
UFRGS Lg 13	UFRGS Lg 64	UFRGS Lg 105
UFRGS Lg 27	UFRGS Lg 67	UFRGS Lg 120
UFRGS Lg 29	UFRGS Lg 76	UFRGS Lg 139
UFRGS Lg 37	UFRGS Lg 82	UFRGS Lg 142
UFRGS Lg 39	UFRGS Lg 87	UFRGS Lg 179
UFRGS Lg 40	UFRGS Lg 89	UFRGS Lg 191
UFRGS Lg 41	UFRGS Lg 92	UFRGS Lg 192
UFRGS Lg 49	UFRGS Lg 97	
Isolados obtidos de plantas de <i>Lotus uliginosus</i>		
UFRGS Lu 4	UFRGS Lu 14	UFRGS Lu 28
UFRGS Lu 5	UFRGS Lu 15	UFRGS Lu 32
UFRGS Lu 8	UFRGS Lu 16	UFRGS Lu 33
UFRGS Lu 9	UFRGS Lu 17	UFRGS Lu 35 (a)
UFRGS Lu 10	UFRGS Lu 21	UFRGS Lu 35 (b)
UFRGS Lu 12	UFRGS Lu 23	UFRGS Lu 36
UFRGS Lu 11	UFRGS Lu 26	UFRGS Lu 39
UFRGS Lu 13	UFRGS Lu 27	UFRGS Lu 50

**TABELA 2** – Estirpes de rizóbios estudadas (Coleção de Culturas de rizóbio SEMIA da FEPAGRO).

<b>Plantas Hospedeiras</b>	<b>Estirpes</b>
<i>Lotus corniculatus</i>	SEMIA 806, SEMIA 816
<i>Lotus uliginosus</i>	SEMIA 822
<i>Desmodium incanum</i>	SEMIA 656 *
<i>Cicer arietinum</i>	SEMIA 399, SEMIA 3002, SEMIA 3004
<i>Phaseolus vulgaris</i>	SEMIA 4077, SEMIA 4080, SEMIA 4088
<i>Macroptilium atropurpureum</i>	SEMIA 656 *
<i>Mucuna deeringiana</i>	SEMIA 6058, SEMIA 6059**

Legenda: \* SEMIA 656 é recomendada para produção de inoculantes de *Desmodium incanum*, *Macroptilium atropurpureum* e Soja Perene; \*\* SEMIA 6059 é recomendada para a inoculação de *Mucuna deeringiana* e de feijão de asa.

### **3.1. Caracterização fenotípica dos isolados de rizóbios**

Todos os rizóbios isolados estudados foram caracterizados fenotipicamente após a verificação da pureza das culturas segundo os procedimentos de Somasegaran e Hoben (1994).

A caracterização dos rizóbios isolados foi baseada no crescimento das colônias, em placas contendo meio de cultura levedura manitol (LM) com modificação do acréscimo de indicador vermelho Congo (Apêndice 4), até proximadamente sete dias de incubação a 28 °C. Avaliou-se o tempo de crescimento pelo surgimento de colônias isoladas (rápido - dois a três dias), intermediário (médio - quatro a cinco dias), e lento (acima de cinco dias), o diâmetro médio das colônias, a forma, a superfície, a consistência e a densidade óptica. Esse procedimento foi feito em triplicata.

### **3.1.1 Avaliação da capacidade de solubilização de fosfato de cálcio dibásico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) dos isolados de rizóbios de *Lotus spp***

Foram avaliados todos os rizóbios isolados (Tabela 1) quanto à capacidade de solubilizarem fosfato inorgânico, *in vitro*, foi realizada baseada na metodologia descrita por Verma et al (2001) com modificação. Usou-se 1g/L de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ao invés de  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

As bactérias foram isoladas e crescidas em meio de cultura líquido levedura manitol, incubadas por 72 horas, à 28°C sob agitação orbital de 121 rpm. Após o período de crescimento, com auxílio de uma micropipeta inocular-se gotas de 20 µL de cultura ( $10^8$  células mL<sup>-1</sup>) em placas de Petri, contendo meio de cultura sólido: fosfato de cálcio dibásico (1 g/L), glicose (10 g/L), sulfato de magnésio (1 g/L), e ágar (15 g/L); ajustou-se para pH 7,2. Essas placas foram incubadas à 28°C. Foram estabelecidas três colônias por placa. E foi feita triplicata por isolado de rizóbio.

No terceiro, sétimo e décimo quinto dias, após o crescimento e surgimento do halo, em torno da colônia (área clara translúcida), foi realizada medição utilizando-se um paquímetro manual. A partir dessas medidas, foram obtidos os Índices de Solubilização (IS) para cada isolado através da fórmula:  $\text{IS} = \text{diâmetro do Halo (mm)} / \text{diâmetro da colônia (mm)}$  (Berraquero et al, 1976).

### **3.1.2 Reação de pH dos isolados de rizóbios em meio de cultura**

A produção de compostos alcalinos ou ácido pelos rizóbios foi avaliada pela inoculação das bactérias em meio ágar LM (Vincent, 1970) (Apêndice 6) com indicador azul de bromotimol. Após sete dias de incubação a 28 ° C, em estufa, a mudança da coloração de verde para amarelo indicou a

acidificação do meio. E quando o meio verde alterou a coloração para azul, indicou a alcalinização do mesmo (Somasegaran e Hoben, 1994).

### **3.2. Avaliação da capacidade dos rizóbios isolados de *Lotus* em induzir a formação de nódulos e a fixação biológica de nitrogênio em diferentes plantas hospedeiras**

Foram utilizadas sementes de plantas de *Lotus corniculatus* (cornichão), *L. glaber*, *L. uliginosus*, *Desmodium incanum* (pega-pega), *Macroptilium atropurpureum* (siratiro), *Phaseolus vulgaris* (feijão-preto), *Cicer arietinum* (grão-de-bico) e *Mucuna deeringiana* (mucuna-anã) para a observação da especificidade hospedeira nessas plantas quando inoculadas com isolados de rizóbios pertencentes à coleção da UFRGS (Tabela 1). Também foram utilizadas, como controle estipes que estão citadas na Tabela 1, que foram cedidas pela Coleção SEMIA de Rizóbios do Laboratório de Microbiologia Agrícola da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (Fepagro).

As sementes de cada espécie foram previamente desinfetadas com álcool (70%), por 30 segundos, em seguida colocadas em hipoclorito de sódio (20%), por 5 minutos e lavadas sete vezes com água destilada estéril. Após, molhou-se o papel filtro *Germitest*, estéril, com 2/3 de água destilada, estéril, e colocou-se 30 sementes. Enrolou-se esse papel com as sementes, colocou-se em saco plástico, identificou-se com a espécie e a data, e levou-se para pré-germinação à 25°C, em estufa, no Laboratório de Tecnologia de Sementes (Fepagro).

Após o surgimento da germinação das sementes fez-se a contagem do número das que germinaram. Havendo um índice de germinação entre 85 a 90% essa foi considerada satisfatória e as sementes eficientes.

Para avaliação da capacidade dos isolados de rizóbios realizou-se um experimento utilizando-se tubos de ensaio de 250 mm de comprimento e 24 mm de diâmetro, contendo 40 mL de meio de cultura LM (Apêndice 4 ) com solução nutritiva isenta de nitrogênio (Sarruge, 1975) (Apêndice 8) com modificação acrescentou-se  $7,0 \text{ gL}^{-1}$  de ágar (esterilizado). Nesses tubos plantou-se duas sementes pré-germinadas, de cada espécie de planta, e conduziu-se ao lampadário em temperatura ambiente para o crescimento e desenvolvimento da planta.

Após sete dias do surgimento da parte foliar, realizou-se a inoculação com o caldo de cada isolado de rizóbio, crescido em meio de cultura líquido por 48 horas, à  $28^{\circ}\text{C}$  sob agitação de 120 rpm. Foram feitas três repetições de cada isolado.

O desenvolvimento das plantas foi verificado visualmente ao longo de 45 dias com a finalidade de avaliar a capacidade de cada isolado em induzir a nodulação, sendo descartadas as plantas que não formaram nódulos nas raízes. Avaliou-se também a coloração dos nódulos, verificando-se a coloração vermelha, atribuída a isolados considerados eficientes na fixação biológica de nitrogênio e o crescimento das plantas.

Além dos tratamentos inoculados, também foram conduzidos dois tratamentos controles, um sem adição de nitrogênio e outro com adição de 1 mL de solução de nitrogênio. Foram feitas três repetições de cada.

### **3.3. Avaliação dos rizóbios isolados de plantas de *Lotus spp.* quanto à eficiência na fixação simbiótica de nitrogênio em plantas de *Phaseolus vulgaris* (feijão preto) cultivados em vasos em casa de vegetação**

Foram avaliados quanto à eficiência na fixação biológica de nitrogênio em experimento realizado na casa de vegetação os rizóbios isolados: UFRGS Lc 17, Lc 78, Lc 61, Lc 73, Lc 83, Lc 102, Lc 166, Lc 443, Lc 460, Lc 512, Lg 8, Lg 9, Lg 13, Lg 29, Lg 40, Lg 76, Lg 92, Lg 97, Lg 191, Lu 4, Lu 5, Lu 10, Lu 13, Lu 14, Lu 23, Lu 28 e Lu 32.

O período experimental transcorreu de 27/03/2015 a 27/06/2015, perfazendo 90 dias de crescimento e desenvolvimento das plantas hospedeiras *Phaseolus vulgaris*.

Os tratamentos experimentais foram representados por blocos ao acaso, com duas repetições por isolado. Foram utilizados copos plásticos descartáveis (500 mL) com uma mistura de vermiculita e areia na proporção de 2:1 (Vincent, 1970), solução nutritiva (Sarruge, 1975) isenta de nitrogênio, com ajuste de pH 6,8, e esterilizada em autoclave a 120°C por 40 minutos.

Em cada vaso, foram semeadas quatro sementes de feijão-preto, previamente desinfetadas por imersões sucessivas em álcool (70%) por 30 segundos, hipoclorito de sódio (20%) por 5 minutos e lavadas 7 vezes com água destilada estéril.

Após o surgimento da parte aérea da planta foi feito o desbaste, deixando uma plântula por vaso. E realizou-se a inoculação do caldo contendo rizóbios. A inoculação dos rizóbios isolados, nas plantas, foi realizada utilizando se uma alíquota de 1 mL de caldo de cultura de cada estirpe e de cada isolado,

crescido em meio de cultura LM, incubadas por 48 horas à 28°C, sob agitação constante a 120 rpm e com cerca de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Nesta avaliação foram utilizadas como controle estipes de feijão-preto SEMIA 4077, SEMIA 4080 e SEMIA 4088, recomendadas para produção e cultivo, cedidas pela Coleção SEMIA de rizóbios da FEPAGRO. Além dos tratamentos inoculados, foram conduzidos dois tratamentos controle, um com adição de nitrogênio, a cada sete dias, ao longo do experimento, e outro sem adição do nitrogênio.

Ao final do período de 90 dias, as plantas foram colhidas e avaliadas visualmente. Observou-se a formação de nódulos radiculares, a coloração avermelhada dos nódulos e verde intensa das folhas da planta.

A parte aérea foi separada da parte radicular, acondicionada em sacos de papel e submetida à secagem em estufa à 45°C, durante três dias até obtenção de massa constante. Os nódulos foram destacados da raiz, contados, acondicionados em sacos de papel e submetidos à secagem em dissecador para a obtenção de massa constante.

Uma vez seca a parte aérea e os nódulos esses foram pesados para obtenção de massa e posterior análise estatística.

### **3.4. Análise estatística**

Os dados referentes ao número e à massa seca de nódulos, à massa seca da raiz e a massa da parte aérea foram submetidos à análise de variância (ANOVA), pelo programa Assistat. E as médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott ( $p < 0,05$ ) de probabilidade.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Caracterização fenotípica das estirpes de rizóbios

Observou-se as colônias dos isolados que apresentaram características distintas como o diâmetro das colônias, forma, densidade ótica, consistência, reação de modificação do pH do meio e coloração da colônia.

As características fenotípicas como a morfologia das colônias dos 88 isolados de rizóbios de *Lotus corniculatus* são apresentadas no Apêndice 1. Observou-se que a frequência dos tamanhos de colônia dos rizóbios foi bastante diversa. Em geral o diâmetro variou de 1 a 6 mm, sendo 9,5 % com 1mm, 22,6% com 2mm, 24% com 3mm, 18,7 % com 4 mm e apenas 13,3% (com 5 mm. Observa-se uma grande diversidade quanto ao diâmetro das colônias entre os isolados de rizóbios obtidos, apresentando características de tamanho de colônias aos 4 a 5 dias que são indicativas dos rizóbios do gênero *Mesorhizobium* (Moreira et al., 1993; Jarvis et al., 1997; Barberi et al., 1998 e Lajudie et al., 1998), pois apresentaram crescimento intermediário. Os isolados de rizóbios UFRGS Lc 19, Lc 186, Lc 191, Lc 197, Lc 421, Lc 422, Lc 465 apresentaram colônias com 6 mm de diâmetro aos seis dias de crescimento.



Moreira (1993), descreve que essa característica pode ser encontrada em rizóbios do gênero *Bradyrhizobium*.

Quanto à consistência da goma produzida pelas colônias dos rizóbios isolados obtidos de *L. corniculatus*, observou-se que a maioria (77%) apresentavam colônias gomosas e os isolados UFRGS Lc 72, Lc 73, Lc 85, Lc 94, Lc 102, Lc 103, Lc 108, Lc 110, Lc 111, Lc 119, Lc 122, Lc 124, Lc 125, Lc 126, Lc 133, Lc 189, Lc 190, Lc 198, Lc 221, Lc 422, Lc 460, Lc 465 e 512 apresentaram colônias aquosas. A gomosidade poder estar diretamente relacionada com a produção exopolissacarídios desses isolados em meio de cultura que é composto apenas por carbono.

Entre os 30 isolados de rizóbios obtidos de plantas de *L. glaber* (Apêndice 3) a avaliação do diâmetro da colônia também mostrou diversidade, sendo que após o período de sete dias de incubação, observou-se que seis isolados (Lg 40, Lg 59, Lg 82, Lg 87, Lg 92 e Lg 139) apresentaram colônias com diâmetro de 2 mm, cinco (Lg 13, Lg 62, Lg 64, Lg 97 e Lg 102) isolados com diâmetro de 3mm, observadas aos 4 e 5 dias de incubação e apresentavam consistência gomosa. Essas características são comumente observadas em colônias de estirpes do gênero *Mesorhizobium* e *Rhizobium* (Barbieri et al., 1998; Wrang et al., 2003). Já os isolados UFRGS Lg 67 e UFRGS Lg 76 apresentaram crescimento lento e colônias pequenas com diâmetro de 1 mm, com produção de goma semelhante às características observadas em colônias de *Bradyrhizobium elkani* (Baraibar et al, 1999; Labandera , 2007). Três isolados (Lg 9, Lg 29 e Lg 191) apresentaram lento e colônias maiores com diâmetro de 6 mm num período de crescimento de 4 a 7

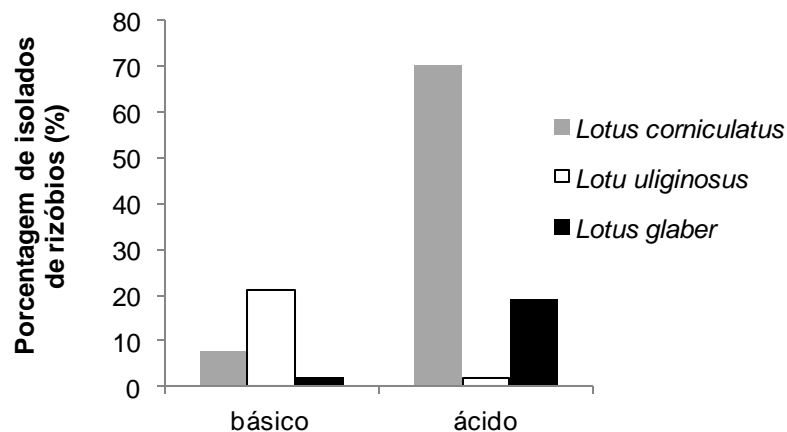
dias. Os isolados de rizóbios Lg 64, Lg 87, Lg 92, Lg 102, Lg 139 e Lg 191 apresentaram colônias com consistência aquosa.

Entre os 24 isolados de rizóbios obtidos de plantas de *L. uliginosus* (Apêndice 3), observou-se o diâmetro das colônias variando de 1 a 2 mm. Frizzo (2008), em seu trabalho, demonstrou que 63% dos isolados de *L. uliginosus* apresentaram essas características e que provavelmente pertençam ao gênero *Bradyrhizobium*, de crescimento lento. Segundo Barabair et al. (1999), esses isolados apresentam características de diâmetros de colônias semelhantes ao descritos no gênero de *Bradyrhizobium*.

As características fenotípicas quanto à morfologia das colônias de bactérias diazotróficas são importantes tanto para a identificação parcial quanto para o agrupamento destes micro-organismos (Fernandes et al., 2003). Além disso, os dados emitidos serão úteis para futuros trabalhos realizarem a classificação taxômica, tendo em vista, a seleção de estirpes mais eficientes e adaptadas às condições edafoclimáticas específicas do seu ambiente, favorecendo desta forma o desenvolvimento da planta.

#### **4.1.1 Reação de pH dos isolados de rizóbios em meio de cultura**

Quanto à reação produzida em meio de cultura com indicador azul de bromotimol, os isolados de rizóbios mostraram diferentes reações de pH após o período de incubação (Figura 1).



**FIGURA 1** – Reação de pH de isolados de rizóbios obtidos de plantas de *L. corniculatus*, *L. glaber* e *L. uliginosus* em meio de cultura com indicador azul de bromotimol.

Observou-se que os rizóbios obtidos de plantas de *L. corniculatus* causaram acidificação do meio de cultura enquanto 8% (UFRGS Lc 2, Lc 94, Lc 110, Lc 124, Lc 125, Lc 131, Lc 199, Lc 210, Lc 211, Lc 213, Lc 214, Lc 215 e Lc 223), tornaram o meio básico (Figura 1). Esse fator indica que provavelmente esses rizóbios isolados pertençam ao grupo do *Mesorhizobium* (Barberi et al., 1998). Segundo Martins et al (1997), estirpes isoladas de solos ácidos são capazes de excretarem substâncias que acidificam o meio, o que parece ser um mecanismo de adaptação a condições adversas. Essa seria uma vantagem competitiva da planta, pois essa apresentaria uma raiz que sobreviveria num solo com um determinado pH. Posteriormente, esse autor sugeriu que se o rizóbio que nodular uma espécie de leguminosa é normalmente produtor de ácido, essa leguminosa deverá equilibrar com uma faixa estreita de estirpes e de modo geral será difícil ajustá-la em solos ácidos.

Apenas os isolados de rizóbios de *L. uliginosus* UFRGS Lu 36, Lu 39 e Lu 50 foram capazes de acidificar o meio de cultura levedura manitol com

indicador azul de bromotimol, amarelando o mesmo (Figura 1). E 91% dos isolados alcalinizaram o meio tornando-o azul (Figura 1). A mudança de pH em meio de cultura com indicador azul de bromotimol é consistente dentro dos gêneros *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* que apresentam a característica de acidificar o meio de cultura. Enquanto *Azorhizobium* e *Bradyrhizobium* alcalinizam o meio (Coutinho et al., 2000). Segundo Frizzo esses isolados foram obtidos de solos da localidade de Eldorado do Sul, onde após análises das características químicas foi constatado o pH=5,1. Logo, esses isolados apresentariam essa característica como esperado.

Já entre os rizóbios obtidos de plantas de *L. glaber* observou-se que 68% acidificou o meio de cultura após o período de incubação de aproximadamente sete dias (Figura 1). Segundo Moreira e Siqueira (2002), essa reação de acidificação do meio de cultura pode estar relacionada com o pH do solo de onde esses isolados foram coletados, e que por algum motivo de adaptação possuem este desempenho de acidificação. Os rizóbios de *L. glaber* foram obtidos de plantas e solos localizados nas cidades de Mostardas (RS) onde após análises das características químicas do solo foi constatado o pH 5,6 (Frizzo). Em Porto Alegre, não há registro por parte desse autor, de análises químicas de solo. Mesmo assim, podemos concluir que os rizóbios de *L. glaber* foram obtidos de locais com solos ácidos.

Sendo assim, o isolamento de culturas puras pode ser uma ferramenta na pesquisa por rizóbios melhor adaptados às diferentes condições ambientais como afirmado por Surange et al. (1997). Segundo Campos, et al. (2010) esses fatores são limitações para a fixação simbiótica de nitrogênio e

obtenção de estirpes adaptadas, podendo vir a ser uma alternativa para a produção e recomendação futura de inoculantes.

#### **4.1.2. Capacidade de solubilização de fosfato de cálcio dibásico pelos rizóbios estudados**

A capacidade de solubilização de fosfato inorgânico de cálcio em meio sólido foi testada para todos os isolados. Verificou-se, que um grande número de isolados não demonstrou capacidade de solubilização em fosfato de cálcio.

Apenas 48 rizóbios dos 88 dos isolados de *Lotus corniculatus* solubilizaram fosfato inorgânico *in vitro* (Tabela 3), apresentando a formação de halo claro ao redor das colônias. Destacam-se os isolados *L. corniculatus* UFRGS Lc 63, UFRGS Lc 196 e UFRGS Lc 198 que apresentaram valores de solubilização com índices de solubilização  $\geq 6$ ,  $\geq 4$  e  $\geq 3$ , respectivamente, indicando alta capacidade para solubilização de fosfato dibásico. Essa alta capacidade de solubilização deve-se aos microrganismos solubilizadores de fosfatos que desempenham importante papel na disponibilização de formas inorgânicas de fosfato (Ca-P) considerando o aumento do teor de fósforo na solução, que propicia melhor crescimento e maior rendimento das culturas (Chabot et al., 1993). Segundo Leite (2011), a caracterização fenotípica relacionada à capacidade de solubilizar fosfato de cálcio busca revelar quais outros serviços ambientais o rizóbio poderia estar executando além da FBN.

Os rizóbios isolados UFRGS Lc 94, Lc 102, Lc 103, Lc 108, Lc 109, Lc 110, Lc 111, Lc 112, Lc 128, Lc 200, Lc 204 e Lc 443 não apresentaram índices de solubilização. A falta de solubilização é o indício que essa fonte de P

não estava disponível no solo das localidades de onde foram obtidos esses isolados. O fósforo é um nutriente essencial às plantas, mas encontra-se em baixa disponibilidade em solos tropicais. No caso esses isolados foram obtidos de solos de Eldorado do Sul (RS), logo podemos concluir que o solo possui uma baixa concentração de cálcio e fósforo ( $\text{Ca} = 2,2 \text{ cmol}_c \text{ dm}^3$  e  $\text{P} = 12,0 \text{ mg dm}^{-3}$ ) e provavelmente, essa seja uma das explicações por não apresentarem solubilização de P-Ca (Frizzo, 2007).

**TABELA 3** – Índice de solubilização (IS) de fosfato de cálcio dibásico, em placas com meio de cultura, por rizóbios isolados de plantas de *L. corniculatus*.

Rizóbios	IS	Rizóbios	IS	Rizóbios	IS
UFRGS Lc 2	≥ 1	UFRGS Lc 63	≥ 6	UFRGS Lc 108	0
UFRGS Lc 3	≥ 1	UFRGS Lc 64	≥ 1	UFRGS Lc 109	0
UFRGS Lc 8	≥ 1	UFRGS Lc 71	≥ 1	UFRGS Lc 110	0
UFRGS Lc 9	≥ 1	UFRGS Lc 72	≥ 1	UFRGS Lc 111	0
UFRGS Lc 10	≥ 1	UFRGS Lc 73	≥ 1	UFRGS Lc 112	0
UFRGS Lc 12	≥ 1	UFRGS Lc 78	≥ 1	UFRGS Lc 119	≥ 1
UFRGS Lc 14	≥ 1	UFRGS Lc 79	≥ 2	UFRGS Lc 122	≥ 1
UFRGS Lc 17	≥ 1	UFRGS Lc 83	≥ 1	UFRGS Lc 124	≥ 1
UFRGS Lc 19	≥ 1	UFRGS Lc 94	0	UFRGS Lc 126	≥ 1
UFRGS Lc 27	≥ 1	UFRGS Lc 102	0	UFRGS Lc 127	≥ 1
UFRGS Lc 61	≥ 1	UFRGS Lc 103	0	UFRGS Lc 128	0
UFRGS Lc 62	≥ 1	UFRGS Lc 105	≥ 1	UFRGS Lc 131	≥ 1
UFRGS Lc 133	≥ 1	UFRGS Lc 187	≥ 1	UFRGS Lc 204	0
UFRGS Lc 135	≥ 1	UFRGS Lc 189	≥ 1	UFRGS Lc 210	≥ 2
UFRGS Lc 141	≥ 2	UFRGS Lc 192	≥ 1	UFRGS Lc 422	≥ 1
UFRGS Lc 142	≥ 1	UFRGS Lc 193	≥ 1	UFRGS Lc 421	≥ 1
UFRGS Lc 144	≥ 2	UFRGS Lc 194	≥ 1	UFRGS Lc 434	≥ 1
UFRGS Lc 151	≥ 1	UFRGS Lc 195	≥ 1	UFRGS Lc 443	0
UFRGS Lc 166	≥ 2	UFRGS Lc 196	≥ 4	UFRGS Lc 460	≥ 1
UFRGS Lc 183	≥ 1	UFRGS Lc 197	≥ 1	UFRGS Lc 512	≥ 1
UFRGS Lc 186	≥ 1	UFRGS Lc 198	≥ 3	UFRGS Lc 519	≥ 1
UFRGS Lc 190	≥ 2	UFRGS Lc 199	≥ 2		
UFRGS Lc 191	≥ 1	UFRGS Lc 200	0		

Entre os rizóbios isolados de *Lotus glaber*, UFRGS Lg 4, Lg 27, Lg 62, Lg 76 e Lg 87 não mostraram capacidade para solubilizar o fosfato inorgânico. Provavelmente esses foram isolados de localidades onde há pouca ou nenhuma disponibilidade do fosfato de cálcio no solo. Os rizóbios isolados

Lg 76 e Lg 87 são região de Bagé (RS), onde segundo estudos de Medaglia (2014), o solo possui uma grande quantidade de cálcio. Segundo Frizzo (2007) os isolados UFRGS Lg 4, Lg 27 e Lg 62 foram isolados de solos de Rio Prado (RS) onde o apresentaram  $\text{Ca} = 3,4 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$ ,  $\text{P} = 31,0 \text{ mg dm}^{-3}$  e  $\text{pH} = 5,7$ . No entanto, vários rizóbios apresentaram capacidade para solubilização do fosfato de cálcio dibásico sendo que quatorze (UFRGS Lg 1, Lg 8, Lg 9, Lg 13, Lg 29, Lg 39, Lg 40, Lg 41, Lg 49, Lg 56, Lg 59, Lg 61, Lg 120 e Lg 179) apresentou índice de solubilização ( $\text{IS} \geq 1$ ); cinco (UFRGS Lg 37, Lg 64, Lg 102, Lg 191 e Lg 192) apresentaram  $\text{IS} \geq 2$  e somente três (Lg 82, Lg 89 e Lg 142) apresentaram  $\text{IS} \geq 3$  (Tabela 4). Observou-se grande variação entre os rizóbios estudados quanto à capacidade para solubilizar fosfato de cálcio dibásico pelo método utilizado no estudo. Muitos isolados não mostraram capacidade de solubilização e apenas quatro rizóbios (UFRGS Lg 82, Lg 89 e Lg 142) mostraram  $\text{IS} \geq 3$  indicando elevada capacidade para solubilizar o fosfato inorgânico. Essa capacidade pode representar que esses isolados são originários de localidades onde o solo possuía fosfato de cálcio. Esses isolados foram obtidos de solo de áreas das localidades de Bagé (RS) e Passo Fundo (RS) (Frizzo, 2007). Segundo Rodriguez e Fraga (1999), existem bactérias do gênero *Rhizobium* que estão entre as que apresentam o maior potencial de solubilização de fosfatos inorgânicos em teste realizados *in vitro*.

Segundo Oliveira et al. (2007), para que uma bactéria seja considerada como boa produtora de enzima de solubilização tem que apresentar o  $\text{IS} \geq 2$  em meio sólido. E para Rodriguez e Fraga (1999) e Marra et al., (2012), as bactérias que fornecem N para o desenvolvimento vegetal,

podem também contribuir com o fornecimento de P para as plantas. Essas bactérias de *L. glaber* que apresentaram potencial de solubilização de fosfato de cálcio podem ser consideradas boas produtoras de N para que o vegetal se desenvolva.

**TABELA 4** – Índice de solubilização (IS) de fosfato de cálcio dibásico, em placas com meio de cultura, por rizóbios isolados de plantas de *L. glaber*.

Rizóbios	IS	Rizóbios	IS	Rizóbios	IS
UFRGS Lg 4	≥ 0	UFRGS Lg 40	≥ 1	UFRGS Lg 82	≥ 3
UFRGS Lg 5	≥ 1	UFRGS Lg 41	≥ 1	UFRGS Lg 87	≥ 0
UFRGS Lg 8	≥ 1	UFRGS Lg 49	≥ 1	UFRGS Lg 89	≥ 3
UFRGS Lg 9	≥ 1	UFRGS Lg 56	≥ 1	UFRGS Lg 102	≥ 2
UFRGS Lg13	≥ 1	UFRGS Lg 59	≥ 1	UFRGS Lg120	≥ 1
UFRGS Lg 27	≥ 0	UFRGS Lg 61	≥ 1	UFRGS Lg 142	≥ 3
UFRGS Lg 29	≥ 1	UFRGS Lg 62	≥ 0	UFRGS Lg 179	≥ 1
UFRGS Lg 37	≥ 2	UFRGS Lg 64	≥ 2	UFRGS Lg 191	≥ 2
UFRGS Lg 39	≥ 1	UFRGS Lg 76	≥ 0	UFRGS Lg 192	≥ 2

Dentre os 24 rizóbios de *Lotus uliginosus* estudados, apenas dois isolados UFRGS Lu 14 e Lu 35 (a) apresentaram índice de solubilização de fosfato de cálcio dibásico  $\geq 2$  (Tabela 5). O isolado Lu 14 demonstrou essa afinidade pelo fosfato de cálcio, talvez porque o solo de Mostardas (RS) de onde foi obtido apresentou  $\text{Ca} = 3,3 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$  e  $\text{P} = 67 \text{ mg dm}^{-3}$  (Frizzo, 2007). Já o isolado Lu 35 (a) foi obtido dos solos de Eldorado do Sul (RS) que apresentou  $\text{Ca} = 2,2 \text{ cmol}_c \text{ dm}^{-3}$  e  $\text{P} = 12,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  (Frizzo, 2007). Podemos dizer que a afinidade desses isolados pelo fosfato de cálcio deve ser sido influenciada pelas características químicas por eles apresentadas.

Os 13 isolados apresentaram índice de solubilidade  $\text{IS} \leq 1$  UFRGS Lu 4, Lu 5, Lu 8, Lu 10, Lu 11, Lu 12, Lu 15, Lu 16, Lu 17, Lu 21, Lu 23, Lu 28, Lu 32 e Lu 36 (b) representando baixa capacidade de solubilização de fosfato de cálcio dibásico. Esse fato pode ser devido os isolados terem alguma



afinidade com o fosfato de cálcio existente no solo de Mostardas (RS) e Eldorado do Sul (RS), de onde foram obtidos.

**TABELA 5** – Índice de solubilização (IS) de fosfato de cálcio dibásico, em placas com meio de cultura, por rizóbios isolados de plantas de *L. uliginosus*.

Rizóbios	IS	Rizóbios	IS	Rizóbios	IS
UFRGS Lu 4	0	UFRGS Lu 16	≥ 1	UFRGS Lu 32	≥ 1
UFRGS Lu 5	≥ 1	UFRGS Lu 17	≥ 1	UFRGS Lu 33	0
UFRGS Lu 8	≥ 1	UFRGS Lu 21	≥ 1	UFRGS Lu 35 (a)	≥ 2
UFRGS Lu 10	≥ 1	UFRGS Lu 23	≥ 1	UFRGS Lu 35 (b)	0
UFRGS Lu 11	≥ 1	UFRGS Lu 25	0	UFRGS Lu 36	≥ 1
UFRGS Lu 12	≥ 1	UFRGS Lu 27	0	UFRGS Lu 38	0
UFRGS Lu 14	≥ 2	UFRGS Lu 28	0	UFRGS Lu 39	0
UFRGS Lu 15	≥ 1	UFRGS Lu 28	≥ 1	UFRGS Lu 50	0

#### 4.2. Avaliação da compatibilidade dos rizóbios estudados com plantas hospedeiras

Os resultados da avaliação da compatibilidade hospedeira dos rizóbios isolados de plantas de *Lotus corniculatus* quando inoculados em plantas de *L. corniculatus* (cornichão), *L. glaber*, *L. uliginosus*, *Desmodium incanum* (pega-pega), *Phaseolus vulgaris* (feijão-preto), *Macropitilium atropurium* (siratro), *Mucuna deeringiana* (mucuna-anã) e *Circe arietinum* (grão-de-bico) são demonstrados na Tabela 6.

As estirpes SEMIA 806 e SEMIA 816, liberadas no Brasil para a produção de inoculantes para plantas de *L. corniculatus* formaram nódulos e fixaram nitrogênio somente com as plantas de cornichão (Tabela 6). O que já era esperado, pois foi demonstrada essa especificidade nessa estirpe quando testada na planta de *L. corniculatus* de onde foi obtida. Frizzo (2007), em experimento em casa de vegetação, demonstrou que a estirpe SEMIA 816 apresentou uma boa capacidade de fixar N. Já a estirpe SEMIA 806, igualou-se ao controle sem adição de N, mostrando-se ineficiente na fixação de nitrogênio

atmosférico nas condições do experimento. Date (1982) e Barrientos et al. (2002) relataram que a perda da eficiência dessas estirpes pode ser devido a mutações espontâneas ou perda dos plasmídeos onde estão localizados os genes responsáveis pela FBN.

A estirpe SEMIA 6208, liberada no Brasil para a produção de inoculantes para plantas de *D. incanum*, demonstrou também ser bem específica, pois estabeleceu simbiose apenas com plantas de *D. incanum* (Tabela 6).

A estirpe SEMIA 822 estabeleceu simbiose tanto com plantas de *Lotus uliginosus* como com plantas de *L. corniculatus* (Tabela 6). No trabalho de Frizzo (2007), em casa de vegetação, essa estirpe demonstrou alta eficiência simbiótica específica quando inoculada em plantas de *L. uliginosus* confirmando o que era esperado, pois ela foi obtida de planta de *L. uliginosus*. Porém não era esperado que essa estirpe estabelecesse simbiose com *L. corniculatus*, demonstrando assim inespecificidade hospedeira. Segundo Dazzo et al. (1976), o grau de especificidade pode estar relacionado com um ou mais mecanismos, como adsorção preferencial de células infectivas nas raízes da leguminosa hospedeira. Granada, (2010), em seu trabalho também verificou que a SEMIA 822 foi capaz de nodular e fixar N em planta a qual foi recomendada (*L. uliginosus*) o que demonstrou e confirmou a eficiência simbiótica da mesma.

A estirpe recomendada para *C. arietinum* SEMIA 396, nodulou e fixou nitrogênio, em grão-de-bico demonstrando ser eficiente simbioticamente. Mas observou-se que a estirpe SEMIA 3002 e SEMIA 3004 não formaram

simbiose com a planta hospedeira. Muniz et al. (2012), em experimento em casa de vegetação, demonstrou que todas as estirpes de *C. arietinum* foram eficientes simbioticamente, pois induziram a maior formação de massa seca de nódulos quando inoculadas em plantas grão-de-bico. Esse autor também observou que todas essas estirpes apresentaram massa seca da parte aérea inferior quando comparadas com o tratamento com nitrogênio. Segundo Souza et al. (2008), a massa seca de nódulos é um dos parâmetros mínimos para avaliação da FBN em leguminosas. Os resultados encontrados nesse presente trabalho indicam que essas estirpes deveriam ser testadas em outros experimentos com outros tipos solos a fim de verificar a capacidade simbiótica.

Quando se avaliou os resultados da compatibilidade dos rizóbios isolados autóctones de *L. corniculatus*, com plantas hospedeiras de *L. corniculatus*, *L. glaber*, *L. uliginosus*, *D. incanum*, *M. atropurpureum*, *P. vulgaris* *M. deeringiana* e *C. arietinum* observou-se que o rizóbio UFRGS Lc 78, foi capaz de induzir a formação de nódulos em todas as plantas hospedeiras. Porém, fixou nitrogênio em plantas de *L. corniculatus*, *D. incanum* e *P. vulgaris* (Tabela 6). Tonon (2008), em seu experimento em lampadário, observou que 49% dos isolados de *L. corniculatus* induziram a formação de nódulos nas plantas das quais foram isolados, indicando compatibilidade nodular. No trabalho de Frizzo (2007), de seleção e caracterização de isolados de rizóbios nativos dos solos do Rio Grande do Sul, para *L. corniculatus* quando inoculou em plantas de *L. uliginosus* identificou que foram capazes de induzir a nodulação, assim como nesse trabalho, confirmando não serem específicos.

É interessante notar que o rizóbio isolado UFRGS Lc 78 foi capaz de induzir nodulação e fixar N em plantas de *L. corniculatus*, *L. glaber*, *D. incanum* e *P. vulgaris* (Tabela 6) demonstrando baixa especificidade hospedeira. Pode-se destacar esse isolado, pois foi único que apresentou relação simbiótica com planta de *D. incanum*.

O rizóbio isolado UFRGS Lc 8 apenas nodulou e fixou N em planta de *M. atropurium*. Isso demonstra que esse isolado pode ser considerado eficiente simbioticamente para essa planta.

Os rizóbios isolados Lc 10, Lc 12, Lc 17, Lc 61, Lc 64 e Lc 85 nodularam em plantas de *L. corniculatus*, sendo que apenas os isolados UFRGS Lc 17 e Lc 61 que fixaram N em plantas de *P. vulgaris*.

Os isolados rizóbios estudados UFRGS Lc 2, Lc 3, Lc 16, Lc 18, Lc 20, Lc 26, Lc 27, Lc 62, Lc 71, Lc 72, Lc 94, Lc 103, Lc 105, Lc 109, Lc 110, Lc 111, Lc 112, Lc 124, Lc 125, Lc 133, Lc 141, Lc 151, Lc 175, Lc 183, Lc 185, Lc 192, Lc 194, Lc 196, Lc 198, Lc 199, Lc 208, Lc 210, Lc 218, Lc 421, Lc 422, Lc 460 e Lc 465 induziram nodulação e realizaram a fixação de nitrogênio apenas em plantas de *L. corniculatus*, o que demonstra apresentarem elevada especificidade hospedeira. Frizzo (2007) verificou baixo índice de nodulação e fixação de N dos isolados de *L. corniculatus*, estudados por ele, quando inoculados em plantas de *L. corniculatus*, em experimento de casa de vegetação. No trabalho desse autor foi demonstrado que os isolados de *L. corniculatus* apresentaram um índice de apenas 20% de eficiência relativa de nitrogênio.

Já os rizóbios UFRGS Lc 19, Lc 119, Lc 126, Lc 155, Lc 197 e Lc 200 foram capazes de induzir a nodulação e fixar nitrogênio tanto em plantas de *L. corniculatus* como em plantas de *L. glaber*, demonstrando que não apresentam elevada especificidade hospedeira, porém não formaram simbiose com plantas de *L. uliginosus* nem com plantas de *D. incanum* (Tabela 6).

Os rizóbios UFRGS Lc 102, Lc 108 e Lc 215 induziram a nodulação e fixaram nitrogênio tanto em plantas de *L. corniculatus* como em plantas de *L. uliginosus*, demonstrando que não apresentam elevada especificidade hospedeira. Já os rizóbios isolados UFRGS Lc 105, Lc 109, Lc110, Lc 175, Lc 83, Lc 194, Lc 199, Lc 218, Lc 404, Lc 421, Lc 422, Lc 460 e Lc 465 observou-se que foram capazes de nodular em plantas de *L. corniculatus* e *L. uliginosus*, mas só fixaram N em nas plantas de origem (*L. corniculatus*). Tonon (2008), no seu estudo de compatibilidade simbiótica com isolados de *L. corniculatus* observou que 30 dos 59 isolados (49%) foram capazes de induzir a nodulação, mas apenas 3,4% foram capazes fixar N quando inoculados em plantas de *Lotus uliginosus*.

Entre os rizóbios específicos de *L. corniculatus* UFRGS Lc 4, Lc 10, Lc 12, Lc 64, Lc 79, Lc 85, Lc 131, Lc 144, Lc 189 e Lc 195 induziram a formação de nódulos, mas não foram capazes de fixar o nitrogênio, sendo, portanto, ineficientes em simbiose com plantas de *L. corniculatus*. Já os rizóbios UFRGS, Lc 17, Lc 166, Lc 512 e Lc 519 foram capazes de induzir nodulação em plantas de *L. corniculatus*, *L. M. atropurium*, *P. vulgaris*, mas apenas os rizóbios UFRGS Lc 73, Lc 155 e Lc 166 foram capazes de realizar a fixação simbiótica de nitrogênio com estas plantas hospedeiras (Tabela 6). No

entanto, todos estes rizóbios foram capazes de induzir nodulação e fixar nitrogênio também com plantas de *L. corniculatus* (cornichão) e de *L. glaber* (Tabela 6). Nenhum dos rizóbios estudados estabeleceu simbiose com plantas de *Mucuna deeringiana* ou *C. arietinum*.

O rizóbio isolado UFRGS Lc 83 induziu a nodulação e fixou nitrogênio em plantas de *P. vulgaris* e de *L. corniculatus* (Tabela 6).

Os rizóbios isolados UFRGS Lc 2, Lc 3, Lc 9, Lc 12, Lc 131 e Lc 142 foram eficientes quanto à indução de nodulação em plantas de *L. corniculatus* e *M. atropurium*, porém só fixou N em plantas de *M. atropurium* os isolados UFRGS Lc 9 (Tabela 6).

Os rizóbios isolados UFRGS Lc 122, Lc 127, Lc 128, Lc 135, Lc 142, Lc 186, Lc 187 e Lc 191 foram eficientes quanto à nodulação e fixação em plantas de *L. corniculatus* e *M. atropurium*.

**TABELA 6** - Indução da formação de nódulos radiculares (fenótipo Nod<sup>+</sup>) e da fixação biológica de nitrogênio (fenótipo Fix<sup>+</sup>) em plantas hospedeiras de *L. corniculatus* (cornichão), de *L. glaber*, de *L. uliginosus*, e de *D. incanum* (pega-pega), *Macropitilium atroporpureum* (siratro), *Phaseolus vulgaris* (feijão-preto), *Mucuna deeringeana* (mucuna-anã), *Circe arietinum* (grão-de-bico) por rizóbios isolados de *L. corniculatus*.

Rizóbios	Plantas hospedeiras															
	<i>Lotus corniculatus</i>		<i>Lotus glaber</i>		<i>Lotus uliginosus</i>		<i>Desmodium incanum</i>		<i>Macropitilium atroporpureum</i>		<i>Phaseolus vulgaris</i>		<i>Mucuna deeringeana</i>		<i>Circe arietinum</i>	
	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix
<b>Estirpes de <i>Lotus corniculatus</i></b>																
SEMIA 806	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SEMIA 816	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Estirpes de <i>Lotus uliginosus</i></b>																
SEMIA 822	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Estirpes de <i>Lotus glaber</i></b>																
SEMIA 830	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Estirpe de <i>D. incanum</i></b>																
SEMIA 656	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Estirpe de <i>Macropitilium atroporpureum</i></b>																
SEMIA 656	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<b>Estirpes de <i>Phaseolus vulgaris</i></b>																
SEMIA 4077	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
SEMIA 4080	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
SEMIA 4088	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<b>Estirpe de <i>Mucuna deeringeana</i></b>																
SEMIA 6158	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
<b>Estirpes de <i>Circe arietinum</i></b>																
SEMIA 396	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
SEMIA 3002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SEMIA 3004	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Isolados de <i>L. corniculatus</i></b>																
UFRGS Lc 2	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 3	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: (+) positivo para a formação de nódulos ou fixação de nitrogênio; (-) negativo para a formação de nódulos ou fixação de nitrogênio.

**TABELA 6 – continuação...** - Indução da formação de nódulos radiculares (fenótipo Nod<sup>+</sup>) e da fixação biológica de nitrogênio (fenótipo Fix<sup>+</sup>) em plantas hospedeiras de *L. corniculatus* (cornichão), de *L. glaber*, de *L. uliginosus*, e de *D. incanum* (pega-pega), *Macroptilium atropurpureum* (siratro), *Phaseolus vulgaris* (feijão-preto), *Mucuna deeringeana* (mucuna-anã), *Circe arietinum* (grão-de-bico) por rizóbios isolados de *L. corniculatus*.

Rizóbios	Plantas hospedeiras															
	<i>Lotus corniculatus</i>		<i>Lotus glaber</i>		<i>Lotus uliginosus</i>		<i>Desmodium incanum</i>		<i>Macroptilium atropurpureum</i>		<i>Phaseolus vulgaris</i>		<i>Mucuna deeringeana</i>		<i>Circe arietinum</i>	
	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix
UFRGS Lc 4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 8	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 9	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 10	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 14	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
UFRGS Lc 16	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 17	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
UFRGS Lc 18	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 19	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 20	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 26	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 27	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 61	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
UFRGS Lc 62	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 63	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 64	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 71	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 72	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 73	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFRGS Lc 78	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-
UFRGS Lc 79	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 83	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
UFRGS Lc 85	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: (+) positivo para a formação de nódulos ou fixação de nitrogênio; (-) negativo para a formação de nódulos ou fixação de nitrogênio.



**TABELA 6 – continuação...** - Indução da formação de nódulos radiculares (fenótipo Nod<sup>+</sup>) e da fixação biológica de nitrogênio (fenótipo Fix<sup>+</sup>) em plantas hospedeiras de *L. corniculatus* (cornichão), de *L. glaber*, de *L. uliginosus*, e de *D. incanum* (pega-pega), *Macroptilium atropurpureum* (siratro), *Phaseolus vulgaris* (feijão-preto), *Mucuna deeringeana* (mucuna-anã), *Circe arietinum* (grão-de-bico) por rizóbios isolados de *L. corniculatus*.

Rizóbios	Plantas hospedeiras															
	<i>Lotus corniculatus</i>		<i>Lotus glaber</i>		<i>Lotus uliginosus</i>		<i>Desmodium incanum</i>		<i>Macroptilium atropurpureum</i>		<i>Phaseolus vulgaris</i>		<i>Mucuna deeringeana</i>		<i>Circe arietinum</i>	
	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix
UFRGS Lc 94	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 102	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 103	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 105	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 108	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 109	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 110	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 111	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 112	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 119	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 122	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 124	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 125	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 126	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 127	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 128	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 131	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 133	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 135	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 141	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 142	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 144	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 151	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 155	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFRGS Lc 166	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFRGS Lc 175	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: (+) positivo para a formação de nódulos ou fixação de nitrogênio; (-) negativo para a formação de nódulos ou fixação de nitrogênio.

**TABELA 6 – continuação...** - Indução da formação de nódulos radiculares (fenótipo Nod<sup>+</sup>) e da fixação biológica de nitrogênio (fenótipo Fix<sup>+</sup>) em plantas hospedeiras de *L. corniculatus* (cornichão), de *L. glaber*, de *L. uliginosus*, e de *D. incanum* (pega-pega), *Macroptilium atropurpureum* (siratro), *Phaseolus vulgaris* (feijão-preto), *Mucuna deeringeana* (mucuna-anã), *Circe arietinum* (grão-de-bico) por rizóbios isolados de *L. corniculatus*.

Rizóbios	Plantas hospedeiras															
	<i>Lotus corniculatus</i>		<i>Lotus glaber</i>		<i>Lotus uliginosus</i>		<i>Desmodium incanum</i>		<i>Macroptilium atropurpureum</i>		<i>Phaseolus vulgaris</i>		<i>Mucuna deeringeana</i>		<i>Circe arietinum</i>	
	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix
UFRGS Lc 183	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 185	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 186	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 187	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 189	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 191	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 192	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 193	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 194	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 195	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 196	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 197	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 198	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 199	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 200	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 204	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 208	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 210	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 211	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 213	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFRGS Lc 214	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFRGS Lc 215	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 218	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: (+) positivo para a formação de nódulos ou fixação de nitrogênio; (-) negativo para a formação de nódulos ou fixação de nitrogênio.

**TABELA 6 – continuação...** - Indução da formação de nódulos radiculares (fenótipo Nod<sup>+</sup>) e da fixação biológica de nitrogênio (fenótipo Fix<sup>+</sup>) em plantas hospedeiras de *L. corniculatus* (cornichão), de *L. glaber*, de *L. uliginosus*, e de *D. incanum* (pega-pega), *Macroptilium atropurpureum* (siratiro), *Phaseolus vulgaris* (feijão-preto), *Mucuna deeringeana* (mucuna-anã), *Circe arietinum* (grão-de-bico) por rizóbios isolados de *L. corniculatus*.

Rizóbios	Plantas hospedeiras															
	<i>Lotus corniculatus</i>		<i>Lotus glaber</i>		<i>Lotus uliginosus</i>		<i>Desmodium incanum</i>		<i>Macroptilium atropurpureum</i>		<i>Phaseolus vulgaris</i>		<i>Mucuna deeringeana</i>		<i>Circe arietinum</i>	
	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix
UFRGS Lc 223	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 404	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 421	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 422	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 434	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 443	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 453	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 458	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 460	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 465	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 484	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lc 512	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
UFRGS Lc 519	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-

(+) positivo para a formação de nódulos ou fixação de nitrogênio; (-) negativo para a formação de nódulos ou fixação de nitrogênio.

Os resultados mostram que existem rizóbios autóctones no Rio Grande do Sul, simbiotes em leguminosas nativas como *D. incanum* e que possuem capacidade de formar simbiose com plantas exóticas como *L. corniculatus*, *L. glaber*, e *L. uliginosus*, introduzidas como forrageiras no estado.

#### **4.2.1. Compatibilidade hospedeira dos rizóbios isolados de plantas de *L. glaber*.**

Os resultados da avaliação da compatibilidade hospedeira dos rizóbios isolados de plantas de *Lotus glaber* quando inoculados em plantas de *L. corniculatus* (cornichão), de *L. glaber*, de *L. uliginosus*, de *D. incanum* (pega-pega), *M. atropurium* e *C. arietinum*, são mostrados na Tabela 7.

Entre os rizóbios isolados de plantas de *L. glaber* 70% foram capazes de induzir nodulação e a fixação simbiótica de nitrogênio em plantas de *L. glaber* (Tabela 7).

Os rizóbios UFRGS Lg 29, Lg 37, Lg 39 Lg 40, Lg 82, Lg 87 e Lg 179 induziram nodulação e fixação de nitrogênio tanto em plantas de *L. glaber*, de *L. uliginosus*, *M. atropurium* e *P. vulgaris*, demonstrando serem eficientes simbioticamente, porém apresentaram uma baixa especificidade hospedeira (Tabela 7). Esses isolados foram obtidos de localidades de Rio Pardo (RS), Bagé (RS) onde, provavelmente, no solo tenham sido cultivadas essas plantas.

Os isolados UFRGS Lg 59 e Lg 103 demonstraram alta especificidade, pois só nodularam e fixaram em plantas as quais foram obtidos (*L. glaber*) (Tabela 7).

**TABELA 7** – Indução da formação de nódulos radiculares (fenótipo Nod<sup>+</sup>) e da fixação biológica de nitrogênio (fenótipo Fix<sup>+</sup>) em plantas de *L. corniculatus* (cornichão), de *L. glaber*, de *L. uliginosus*, e de *Desmodium incanum* (pega-pega), *Macropitilium atroporpureum* (siratro), *Mucuna deeringeana* (mucuna-anã) e *Circe arietinum* (grão-de-bico) por rizóbios isolados de *L. glaber*.

Rizóbios	Plantas hospedeiras															
	<i>Lotus corniculatus</i>		<i>Lotus glaber</i>		<i>Lotus uliginosus</i>		<i>Desmodium incanum</i>		<i>Macropitilium atroporpurium</i>		<i>Phaseolus vulgaris</i>		<i>Mucuna deeringeana</i>		<i>Circe arietinum</i>	
	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix
UFRGS Lg 8	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lg 9	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
UFRGS Lg 13	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFRGS Lg 29	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
UFRGS Lg 37	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
UFRGS Lg 39	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFRGS Lg 40	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFRGS Lg 49	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
UFRGS Lg 59	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lg 62	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
UFRGS Lg 64	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
UFRGS Lg 76	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFRGS Lg 82	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lg 87	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFRGS Lg 89	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lg 102	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lg 103	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lg 105	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lg 120	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lg 139	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lg 142	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lg 179	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lg 191	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
UFRGS Lg 192	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) positivo para a formação de nódulos ou fixação de nitrogênio; (-) negativo para a formação de nódulos ou fixação de nitrogênio; na = parâmetro não avaliado.

No entanto, o rizóbio UFRGS Lg 82 apesar de ter sido isolado de plantas de *L. glaber* e induzir nodulação tanto neste hospedeiro como em plantas de *L. uliginosus*, fixou N somente nesta última planta hospedeira (Tabela 7). Já o rizóbio Lg 142 foi capaz de induzir nodulação e fixação de N tanto em plantas de *L. glaber* como em plantas de *L. corniculatus*. Ambos isolados foram obtidos da região de Passo Fundo (RS), onde provavelmente tenham sido plantadas, anteriormente plantas de *L. uliginosus* e *L. corniculatus*. Esses isolados são considerados eficientes simbioticamente, mas possuem baixa especificidade hospedeira.

Apenas o rizóbio UFRGS Lg 62 foi capaz de induzir nodulação em plantas de *L. corniculatus*, *L. glaber*, e *L. uliginosus*, mas não foi capaz de expressar a fixação simbiótica de nitrogênio, demonstrando ser pouco específico e ineficiente na fixação simbiótica de nitrogênio (Tabela 7). Já quando inoculado em plantas de *P. vulgaris* esse isolado foi capaz de induzir a nodula e fixar N, demonstrando ser eficiente simbioticamente. Talvez esse isolado tenha sido obtido do solo de uma localidade de Rio Pardo (RS) onde anteriormente houvesse plantas de *P. vulgaris*.

O rizóbio UFRGS Lg 37 foi capaz de induzir nodulação e fixar N em plantas de *L. glaber*, de *L. uliginosus*, *M. atropurpureum* e *M. deeringiana* (Tabela 7), demonstrando ser eficiente simbioticamente, porém apresenta baixa especificidade. Provavelmente esse rizóbio foi obtido de um solo onde existiam ou existam essas plantas.

O rizóbio UFRGS Lg 49 formou nódulos e fixou nitrogênio em plantas de *P. vulgaris*, mas apenas induziu nodulação em plantas de *L.*

*corniculatus* e de *L. glaber* (Tabela 7). No entanto, os rizóbios UFRGS Lg 13, Lg 39, Lg 40 e Lg 87 formaram nódulos e fixaram nitrogênio em simbiose com plantas de *M. atropurium* e de *P. vulgaris* (Tabela 7). Além disso, o rizóbio UFRGS Lg 13 formou nódulos e fixou nitrogênio apenas em plantas de *L. glaber*, os demais tanto em plantas de *L. glaber* e como de *L. uliginosus* (Tabela 7).

Todos os rizóbios isolados UFRGS Lg 49, Lg 59, Lg 89, Lg 102 e Lg 142 de plantas de *L. glaber* formaram simbiose com alguma planta, seja fixando ou nodulando, ou fixando e nodulando. Os rizóbios não formaram simbiose com nenhuma das plantas hospedeiras deste experimento (Tabela 7), porém o rizóbio Lg 89 também formou simbiose com plantas de *L. glaber* e de *L. uliginosus* e o rizóbio UFRGS Lg 142 também formou simbiose com plantas de *L. corniculatus* e de *L. glaber*. No entanto o rizóbio UFRGS Lg 59 formou nódulos e fixou nitrogênio apenas em plantas de *L. glaber* (Tabela 7) mostrando possuir alta especificidade hospedeira.

Nenhum dos rizóbios isolados de plantas de *L. glaber* foi capaz de induzir nodulação em plantas de *D. incanum* e *C. arietinum*.

#### **4.2.2. Compatibilidade hospedeira dos rizóbios isolados de plantas de *L. uliginosus***

Os resultados obtidos com a inoculação dos rizóbios isolados de plantas de *Lotus uliginosus* em plantas hospedeiras de *L. corniculatus*, *L. glaber*, *L. uliginosus* e *D. incanum*, *M. atropurium*, *P. vulgaris*, *M. deeringeana* e *Circe arietinum* são mostrados na Tabela 8.

Quase todos os isolados de *L. uliginosus* nodularam e fixaram N em plantas de onde foram obtidos (*L. uliginosus*) e em *L. corniculatus*, com exceção de UFRGS Lu 15 que apenas nodulou nessas duas plantas. Já os rizóbios isolados UFRGS Lu 17 e Lu 35 (a) apenas nodularam plantas de *L. corniculatus*.

Os rizóbios isolados UFRGS Lu 8, Lu 10, Lu 11, Lu 14, Lu 16, Lu 18, Lu 28, Lu 32, Lu 36, Lu 38, Lu 39 e Lu 50 foram capazes de induzir a nodulação e fixar nitrogênio em plantas de *L. uliginosus* e de *L. corniculatus* (cornichão) de maneira semelhante ao observado com a estirpe SEMIA 822 (Tabela 6). Tonon (2008) também identificou que os isolados de *L. uliginosus* estudados por ela também apresentaram essa capacidade simbiótica quando inoculados em plantas *L. corniculatus*. Segundo essa mesma autora, o fato de os rizóbios de *L. uliginosus* terem sido capazes de induzir a nodulação em plantas de *L. corniculatus* indica que as plantas dessa espécie podem ser noduladas não só por *Mesorhizobium*, mas também por *Bradyrhizobium*. Jarvis et al. (1997), em seus estudos também confirmava que as plantas de *L. corniculatus* possuem a capacidade de formar nódulos quando em simbiose com rizóbios dos gêneros *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium*.

Os rizóbios UFRGS Lu 13, Lu 14, Lu 15, Lu 17, Lu 23 e Lu 32 formaram simbiose tanto com plantas de *M. atropurium* como de *P. vulgaris* (feijão-preto) (Tabela 8). Já os rizóbios UFRGS Lu 32, Lu 35(b), Lu 36, Lu 38, Lu 39 e Lu 50 formaram simbiose com plantas de *M. atropurium* (Tabela 8) e também os rizóbios UFRGS Lu 32, Lu 36, Lu 38 e Lu 50 formaram simbiose com plantas de *L. corniculatus* e *L. uliginosus* (Tabela 8).



O rizóbio UFRGS Lu 12 formou nódulos e fixou N apenas em plantas de *L. uliginosus* e de *D. incanum*. No trabalho de Granada (2010), esse isolado também apresentou a mesma capacidade, porém nesse presente trabalho ainda se relacionou simbioticamente com planta de *P. vulgaris*.

O rizóbio UFRGS Lu 16 formou nódulos e fixou nitrogênio apenas em *P. vulgaris* e também em plantas de *L. corniculatus* e de *L. uliginosus* (Tabela 8).

Os resultados dos experimentos com inoculação de rizóbios isolados de plantas de *Lotus uliginosus* mostraram que apenas o rizóbio UFRGS Lu 13 foi capaz de estabelecer simbiose com plantas de *C. arietinum*, mas também foi capaz de induzir nodulação fixar nitrogênio em plantas de *L. corniculatus* e de *D. incanum*, o que demonstra baixa especificidade hospedeira (Tabela 8). Já em plantas de *Mucuna deeringiana* (mucuna-anã), dentre os isolados de *L. uliginosus*, apenas o rizóbio isolado UFRGS Lu 35 (a) formou nódulos e fixou nitrogênio, como também em plantas de *L. uliginosus* e somente formou nódulos em plantas de *M. atropurium* e de *L. corniculatus* (Tabela 8).

**TABELA 8** – Indução da formação de nódulos radiculares (fenótipo Nod<sup>+</sup>) e da fixação biológica de nitrogênio (fenótipo Fix<sup>+</sup>) em plantas de *L. corniculatus* (cornichão), de *L. glaber*, de *L. uliginosus*, e de *Desmodium incanum* (pega-pega), *Macropitilium atroporpureum* (siratro), *Mucuna deeringeana* (mucuna-anã) e *Circe arietinum* (grão-de-bico) por rizóbios isolados de *L. uliginosus*.

Rizóbios	Plantas hospedeiras															
	<i>Lotus corniculatus</i>		<i>Lotus glaber</i>		<i>Lotus uliginosus</i>		<i>Desmodium incanum</i>		<i>Macropitilium atroporpureum</i>		<i>Phaseolus vulgaris</i>		<i>Mucuna deeringeana</i>		<i>Circe arietinum</i>	
	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix	Nod	Fix
UFRGS Lu 4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
UFRGS Lu 5	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
UFRGS Lu 8	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lu 10	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
UFRGS Lu 11	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lu 12	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-
UFRGS Lu 13	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
UFRGS Lu 14	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFRGS Lu 15	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFRGS Lu 16	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
UFRGS Lu 17	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
UFRGS Lu 18	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lu 23	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
UFRGS Lu 25	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lu 26	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
UFRGS Lu 27	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lu 28	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
UFRGS Lu 32	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
UFRGS Lu 33	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lu 35 (a)	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-
UFRGS Lu 35 (b)	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lu 36	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lu 38	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lu 39	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
UFRGS Lu 50	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: (+) positivo para a formação de nódulos ou fixação de nitrogênio; (-) negativo para a formação de nódulos ou fixação de nitrogênio.

Apenas o rizóbio Lu 10 foi capaz de induzir nodulação e realizar a fixação de N com quase todas as plantas testadas e *D. incanum* com *M. atropurpurim* que só nodulou e não fixou, e com *M. deeringeana* e *C. arietinum* que não teve nenhuma compatibilidade. Este fato demonstra que esse rizóbio isolado apresenta baixa especificidade hospedeira. Já no trabalho de Frizzo (2008), esse isolado apresentou maior número de nódulos por planta quando comparado com a estirpe SEMIA 822 e obteve maior eficiência relativa, comparado com os isolados estudados por ele. Esse fato pode ser um indicativo de que esse é eficiente simbioticamente quando inoculado em planta de *L. uliginosus*. Segundo Moreira e Siqueira (2002), a eficiência das bactérias que estabelecem simbiose com leguminosas e sua capacidade de sobreviver e formar nódulos depende de uma série de fatores genéticos inerentes aos simbiontes e de interações com fatores edafo-climáticos. Por outro lado, o rizóbio Lu 38 apresentou elevada especificidade, uma vez que induziu nodulação e realizou a fixação de nitrogênio apenas em *L. uliginosus*. Já o rizóbios Lu 5 induziu nodulação e fixou N nas plantas hospedeiras de *L. uliginosus*, *L. corniculatus*, *D. incanum*, *P. vulgaris*, com exceção de *L. glaber* (Tabela 8).

Os isolados de *L. uliginosus*, no geral, apresentaram baixa especificidade hospedeira, assim como demonstrado no trabalho de Granada (2014), pois apresentaram compatibilidade em diferentes hospedeiros dificultando a formação de grupos específicos.

#### **4.3. Avaliação dos isolados de rizóbios de *Lotus* quanto à eficiência simbiótica em plantas *Phaseolus vulgaris* (feijão-preto) em experimento em casa de vegetação**

Os isolados utilizados para esse experimento foram selecionados após, os experimentos em lampadário, onde foram inoculados, nas respectivas plantas e todos apresentaram nodulação e/ou FBN com as plantas (*L. corniculatus*, *L. glaber*, *L. uliginosus*) de onde foram isolados e com plantas de feijão-preto (*P. vulgares*).

Os resultados de massa seca da parte aérea e de nódulos e o número de nódulos das plantas de feijão-preto inoculadas com diversos rizóbios previamente escolhidos como mais promissores, em experimento realizado em casa de vegetação são mostrados na Tabela 9.

A capacidade de indução de nodulação é demonstrada pelos valores das médias do número de nódulos em plantas feijão-preto inoculadas com rizóbios. Observou-se que ocorreu uma grande variação no número e massa de nódulos formados (Tabela 9) indicando a variabilidade na capacidade dos rizóbios estudados em formar simbiose eficiente com plantas de feijão-preto.

No tratamento com isolado de rizóbio UFRGS Lg 13 quando inoculado em planta de feijão-preto, foi demonstrado a relação de simbiose, pois a massa seca e o número de nódulos foram semelhantes ao produzido pelas estirpes SEMIA 4080 e 4077, recomendadas para inoculação em feijão. Porém, observa-se que a massa da parte aérea desse isolado (331,6 g) foi inferior a massa apresentada pelas estirpes SEMIA em questão (724,5g, 608,9 g e 487,8 g).

**TABELA 9** – Massa seca da parte aérea, massa seca de nódulos e número de nódulos de plantas de feijão preto (*Phaseolus vulgaris*), inoculadas com rizóbios em casa de vegetação.

Tratamento	Massa seca da parte aérea (g)	Massa seca dos nódulos (g)	Número de nódulos
SEMIA 4088	724,5 a	8,3 b	77,0 b
SEMIA 4080	608,9 b	9,5 a	83,5 a
SEMIA 4077	487,8 c	9,4 a	83,0 a
UFRGS Lc 83	403,1 d	1,2 g	8,5 h
UFRGS Lc 73	351,7 d	2,0 e	18,5 f
UFRGS Lu 10	308,1 d	1,5 f	13,0 g
UFRGS Lg 13	331,6 d	9,2 a	83,0 a
UFRGS Lu 14	288,9 e	1,2 g	32,0 d
UFRGS Lc 78	289,9 e	1,6 f	15,5 g
UFRGS Lu 23	258,9 e	4,3 c	43,5 c
UFRGS Lg 191	256,9 e	3,9 c	33,5 d
UFRGS Lc 61	244,6 e	2,7 d	24,5 e
UFRGS Lc 460	226,7 e	2,2 e	21,0 f
UFRGS Lg 40	246,1 e	0,7 h	5,5 i
UFRGS Lu 32	243,1 e	1,3 g	7,5 h
UFRGS Lu 13	180,9 f	3,9 c	10,0 h
UFRGS Lg 76	180,6 f	2,0 e	18,5 f
UFRGS Lg 29	178,8 f	1,0 g	6,0 i
UFRGS Lu 28	133,4 f	1,3 g	9,0 h
UFRGS Lg 9	125,4 f	2,7 d	25,5 e
UFRGS Lg 97	46,8 g	0,6 h	3,5 i
UFRGS Lc 17	45,2 g	0,9 g	9,0 h
UFRGS Lc 443	39,1 g	1,1 g	8,0 h
UFRGS Lg 8	39,0 g	0,3 h	2,5 i
UFRGS Lg 92	37,2 g	0,4 h	2,5 i
UFRGS Lc 102	31,6 g	0,5 h	2,0 i
UFRGS Lu 4	23,0 g	0,4 h	2,5 i
UFRGS Lc 166	20,6 g	2,8 d	29,0 d
UFRGS Lc 519	18,9 g	2,2 e	20,5 f
UFRGS Lu 5	18,6 g	3,7 c	29 d
T+N	130,6 f	-	-
T-N	23,4 g	-	-
CV (%)	23,7	42,46	10,11

Legenda: T+N = controle sem inoculação e com adição de nitrogênio; T-N = controle sem inoculação e sem adição de nitrogênio. <sup>(\*)</sup> Médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo teste *Scott-knott* ao nível de 5 % de probabilidade. <sup>(\*\*)</sup> Médias duplicatas de cada tratamento.

Os tratamentos com o rizóbios isolados UFRGS Lu 5, Lg 9 e Lc 166 apresentaram uma média formação de nódulos 20 a 29 por planta, porém a eficiência quanto à produção de massa da parte aérea se mostrou muito abaixo quando comparada com os índices apresentados pelos tratamentos com as SEMIAS recomendadas. Mas UFRGS Lg 9 demonstrou um índice de massa da parte aérea

semelhante ao tratamento controle com nitrogênio, o que talvez seja um indicio que esse isolado seja promissor quanto à fixação de N.

O tratamento com o isolado UFRGS Lc 83 quando inoculado em planta de feijão-preto apresentou um número de massa seca da parte aérea aproximado a SEMIA 4077, mas observou-se que o número de massa e conseqüentemente a massa nodular e o número de nódulos foi bem inferior. Logo, esse isolado foi considerado ineficiente simbioticamente.

Observou-se nos tratamentos com o isolado UFRGS Lu 14, Lu 23, Lc 61 e Lg 191 a metade do número de nódulos, comparando-se com o tratamento com a estirpe SEMIA 4077 (Tabela 9). Conseqüentemente a massa da parte aérea dessa planta também representou a metade (Tabela 9). Esses podem ser classificados como isolados promissores simbioticamente, pois foram capazes de nodular e fixar N em plantas de feijão-preto. Porém, a especificidade hospedeira em feijão-preto é bastante difícil, pois é considerado um hospedeiro promíscuo (Straliotto et al. 2002). Ou seja, há uma grande diversidade de espécies de bactérias capazes de formar associações de eficiência variável com essa planta, e isso foi demonstrado nesse trabalho. Segundo Fernandes e Reis (2008), a presença de estirpes de rizóbio competitivas e de baixa eficiência, além da promiscuidade das espécies cultivadas são dois fatores importantes na redução da eficiência e do estabelecimento das estirpes inoculadas.

Estudos demonstram que a relação de especificidade/promiscuidade entre hospedeiros e rizóbios pode estar relacionada à evolução dos pares simbiontes. O feijão comum (*P. vulgaris*), por exemplo, é capaz de se associar com as estirpes *Rhizobium tropici* (oriundo da região setentrional da América Central) e

*R. etti* (oriundo das regiões andinas na América do Sul), que apresentaram preferência em formar nódulos com genótipos de feijoeiro oriundos da mesma região, sugerindo um estreitamento da especificidade por terem sofrido as mesmas pressões de seleção local (Aguilar, Riva e Peltzer, 2004).

Os resultados mostram que existe nos solos do estado do RS uma população diversa de rizóbios que são ineficientes na fixação de nitrogênio. A massa seca da parte aérea produzida em relação ao número e a massa seca de nódulos possibilita observar que ocorreu a translocação dos fotoassimilados para a formação de nódulos sem a correspondente resposta das plantas em termos de produtividade (Benincasa, 2003). De acordo com Gualter et al. (2011), as bactérias fixadoras de nitrogênio podem contribuir de forma significativa com maior fornecimento de N para a planta e, conseqüentemente, com aumento de massa seca da planta como observado na Tabela 9.

## 5. CONCLUSÕES

1. O rizóbio UFRGS Lc 78 foi capaz de induzir a formação de nódulos em todas as plantas hospedeiras: *L. corniculatus*, com plantas hospedeiras de *L. corniculatus*, *L. glaber*, *L. uliginosus*, *D. incanum*, *M. atropurium*, *P. vulgaris* *M. deeringiana* e *C. arietinum*. Mas apenas, fixou N em plantas de *L. corniculatus*, *D. incanum* e *P. vulgaris*.

2. O rizóbio isolado UFRGS Lc 8 apenas nodulou e fixou N em planta de *M. atropurium* sendo considerado altamente específico para essa planta.

3. Os rizóbios UFRGS Lc 19, Lc 119, Lc 126, Lc 155, Lc 197 e Lc 200 foram capazes de induzir a nodulação e fixar nitrogênio tanto em plantas de *L. corniculatus* como em plantas de *L. glaber*, demonstrando baixa especificidade hospedeira.

4. Os isolados rizóbios estudados UFRGS Lc 2, Lc 3, Lc 16, Lc 18, Lc 20, Lc 26, Lc 27, Lc 62, Lc 71, Lc 72, Lc 103, Lc 105, Lc 109, Lc 110, Lc 111, Lc 112, Lc 124, Lc 133, Lc 141, Lc 151, Lc 175, Lc 183, Lc 185, Lc 192, Lc 194, Lc 196, Lc 198, Lc 199, Lc 208, Lc 210, Lc 218, Lc 421, Lc 422, Lc 460 e Lc 465 apresentarem



elevada especificidade hospedeira, pois induziram nodulação e realizaram a fixação N apenas em plantas de *L. corniculatus*.

5. Os isolados UFRGS Lc 4, Lc 10, Lc 12, Lc 64, Lc 79, Lc 85, Lc 131, Lc 144, Lc 189 e Lc 195 foram considerados ineficientes quando em simbiose com plantas de *L. corniculatus*.

6. O isolado UFRGS Lc 83 quando inoculado em planta de feijão-preto apresentou eficiência para a nodulação como a estirpe SEMIA 4077

7. Os rizóbios UFRGS Lg 29, Lg 37, Lg 39 Lg 40, Lg 82, Lg 87 e Lg 179 induziram nodulação e fixação de nitrogênio tanto em plantas de *L. glaber*, de *L. uliginosus*, *M. atropurium* e *P. vulgaris*, demonstrando serem eficientes simbioticamente, porém apresentaram uma baixa especificidade hospedeira.

8. Os isolados UFRGS Lg 59 e Lg 103 foram específicos em plantas de *L. glaber* nodulando e fixando apenas com essa planta, demonstrando alta especificidade hospedeira.

9. O rizóbio UFRGS Lu 12 formou nódulos e fixou N apenas em plantas de *L. uliginosus* e de *D. incanum*, destacando-se por ser altamente específico simbioticamente.

10. O isolado UFRGS Lu 13 demonstra baixa especificidade hospedeira, pois foi capaz de estabelecer simbiose com plantas de *C. arietinum*, *L. corniculatus* e de *D. incanum*.

11. Os rizóbios isolados UFRGS Lu 8, Lu 10, Lu 11, Lu 14, Lu 16, Lu 18, Lu 28, Lu 32, Lu 36, Lu 39 e Lu 50 foram capazes de induzir a nodulação e fixar nitrogênio em plantas de *L. uliginosus* e de *L. corniculatus* (cornichão) de maneira

semelhante ao observado com a estirpe SEMIA 822. Esses rizóbios demonstraram baixa especificidade hospedeira.

12. O rizóbio Lu 38 apresentou elevada especificidade, uma vez que induziu nodulação e realizou a fixação de nitrogênio apenas em *L. uliginosus*.

13. A baixa especificidade hospedeira é uma característica muito encontrada entre os rizóbios autóctones de solos do estado, isolados de plantas de cornichão (*L. corniculatus*), de *L. glaber* e de *L. uliginosus*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, Ethel K.; ALLEN, ON. Biochemical and symbiotic properties of the rizobia. **Bacterial Rev. University of Wisconsin**, Madison, v.14, p.273-330, 1950.

ARAÚJO, Ricardo Silva; HUNGRIA, Mariângela. Microrganismos de importância agrícola. **Embrapa, CNPAF**. EMBRAPA: Brasília, p. 91-12, 1994.

ARGUDO, Izabel Martinez; LITTLE, Richard; SHEARER, Neil; JOHNSON, Philip; DIXON, Rayan. The NifL-NifA system: a multidomain transcriptional regulatory complex the integrate environmental signals. **Journal Bacteriology**, v. 186, p. 601-610, Feb. 2004.

BAIS, Harsh Pal; PARK, Sang-Wook.; WEIR, Tiffany L.; CALLAWAY, Ragan M.; VIVANCO, Jorge. M. How plants communicate using the underground information superhighway. **Trends in Plant Science**. Vol.9, n.1, p.26-32, 2004.

BARAIBAR, Amália; FRIONI, Lílian; GUEDES, Maria Elena. Symbiotic effectiveness and ecological characterization of indigenous *Rhizobium loti* populations in Uruguay **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.34, n.6, p. 1011 jun/1999.

BARRETO, Ismar Leal; KAPPEL, A. Principais espécies de gramíneas e leguminosas das pastagens naturais do Rio grande do Sul. In: Congresso da Sociedade Botânica d Brasil, 15, 1964. Porto Alegre. **Anais**: UFRGS, 1964. P. 281-294.

- BARRIENTOS, Leticia. Efectividad simbiótica de cepas naturalizadas de *Mesorhizobium loti* y *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) in plantas de tres especies del genero Lotus. **Agricultura Técnica**: Chile, vol.62, n.2, p. 226-236, 2002.
- BENINCASA, Margarida M. P. **Análise de crescimento de plantas – noções básicas**. Jaboticabal: FUNEP, 2. ed., 41 p., 2003.
- BEUSELINK, Paul R. **Trefoil: the science and technology of *Lotus corniculatus***. American Society of Agronomy. Madson: CSSA, p. 9, 1999.
- BERRAQUEIRO, F. Ruiz; BAYA, A.M.; CORMENZNA, A.R. Estabelecimento de índices para el estudio de La solubilización de fosfatos Del suelo, v.17, p.399-406, 1976.
- BOLDRINI, Isis Iob. **Dinâmica de vegetação de uma pastagem natural sob diferentes níveis de oferta de forragem e tipos de solos na depressão Central, RS**. Tese (Doutorado em Zootecnia). 1993. 262 f. - Universidade Federal do Rio Grande do Sul Porto Alegre, RS. Dez, 1993.
- BRAGA, Nelson Raimundo; VIEIRA, Cibas. **Efeito da inoculação com *Bradyrhizobium* ssp., nitrogênio e micronutrientes no rendimento do grão-de-bico**. Campinas: Bragantia, v.57, n.2.1-3,1998.
- BRATTI, Alair Ebison; **Levantamento de rizóbios em adubos verdes cultivados em Sistema Integrado de Produção Agrícola (SIPA)**/ Gustavo R. Xavier, Norma G. Rumjanek; Cláudia M. Martins; Jerri E. Zilli; José Guilherme M. Guerra; Dejair L. de Almeida; Cristina P. Neves. Seropédia: Embrapa Agrícola, 2005. 21 p (Embrapa Agrícola). Documentos, 204.
- BURRIS, Robert. H. Biological nitrogen fixation. **Annu. Rev. Nutr.**, v.13, p.317-335, 1993.
- BLUMENTHAL, Mary Jane; Mc GRAW, R. L. Lotus adaptation, use and management. BEUSELINK, P.R. (ed.) **Trefoil: The Science and Technology of Lotus, CSSA Special Publication, n. 28**, Madison, 1999.
- CARDOSO, E. J. N.; FREITAS, S.S. A risosfera. In: CARDOSO, E. J. B; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. Eds. **Microbiologia do Solo**. Campinas: SBCS, p.41-57, 1992.

- CARNEIRO, Henrique. S. **Comida e sociedade: significados sociais na história da alimentação.** *História: Questões & Debates*, n. 42. Curitiba: Editora UFPR, 2005. P. 71-80.
- CARVALHO, Fabiola Gomes de. Especificidade hospedeira de variantes *Bradyrhizobium* spp. Em soja (CVS Peking e Clark), Caupi e Guandu. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 32: 2701-2708 2008.
- CHABOT, Richard; ANTOUN, Hain; CESCAS, Michael, P. Stimulation de La croissance et de laitue romine parga microrganismes dissolvant le phosphore inorganique. *Can. J. Microbiology*. Canada: 39:941-947, 1993.
- COUTINHO, Heitor L. C.; OLIVEIRA, Valéria M. de; MOREIRA, Fátima M. S. Systematics of legume nodule nitrogen fixing bacteria: agronomic and ecological applications. In: PRIEST, F. G.; GOODFELLOW, M. (Ed.). **Applied Microbial Systematics**. Dordrecht: Kluwer, p. 107-134, 2000.
- DAZZO, Frank B. et al. Adsorption of bacteria to roots as related to host specificity in the *Rhizobium* clover symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 32, n.1, p.166-171, 1976.
- EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. **Socioeconomia: feijão**, 2012. Disponível em: < [www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm](http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm)>. Acesso em 15 jul. 2015.
- ESTRELLA, Maria Júlia; et al. Genetic Diversity and Host Range of Rhizobia Nodulating *Lotus tenuis* in Typical Solis of the Salado River Basin. Argentina. *Applied and Environment al Microbiology*, 75. 4: 088-1098, 2009.
- MACHADO, A. de M. M.; FAVARETTO, N. **Atributos físicos do solo relacionados ao manejo e conservação dos solos.** In: LIMA, M. R. et al. Diagnóstico e recomendações de manejo do solo: aspectos teóricos e metodológicos. Curitiba: UFPR/ Setor de Ciências Agrárias, 2006. p. 234-254.
- FONTOURA, Ricardo de Albuquerque. **Isolamento e seleção de rizóbios nativos, de solos do sul do Brasil, eficientes em *Lotus subbiflorus* Lag. (syn. *Lotus hispidus* Desf.) e *Lotus glaber* Mill. (*Lotus tenuis* Waldst. et Kit. (Ex Wild).** 2007. 82 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS, 2007.

- FONTOURA, Ricardo de Albuquerque et al. Rizóbios nativos do Rio Grande do Sul simbioticamente eficientes em *Lotus glaber*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.3, p.440-446, mar, 2011.
- bacteria of leguminous plants. Madison: **The University of Wisconsin Press**, 343 p. 1932.
- FREITAS, Daiane Martins. **O gênero *Desmodium* Desv (Fabaceae) no estado de Santa Catarina**. 2012. 135p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. 2012
- FRIZZO, Márcio L.S. Seleção e caracterização de rizóbios nativos, de solos do Rio Grande do Sul, para *Lotus corniculatus* L. e *Lotus uliginosus* Schkuhr. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- GRAHAM, Peter H. **Ecology of the root-nodule bacteria of legumes**. In: Nitrogen-Fixing Legume Symbioses. Dilworth, M.J., James, E.K., Sprent, J.I., and Newton, W.E. (eds). Dordrecht, the Netherlands: Springer, pp. 23–58. 2008
- GOORMACHTING, S.; COPOEN, W.; HOLSTERS, M. ***Rhizobium* infection Lessons from versatile nodulation behavior of water-tolerant legumes**. Trends in Plant Science, vol. 9, n.11, p.518-522, 2004.
- GRANADA, Camile E.; et al. Genetic diversity and symbiotic compatibility among rhizobial strains and *Desmodium incanum* and *Lotus* spp. plants. **Genetics and Molecular Biology**, 37, 2, 396-405. Sociedade Brasileira de Genética Printed in Brasil, 2014.
- GUALTER, Régia Maria Reis; et al. Gustavo Ribeiro. **Eficiência agronômica de estirpes de rizóbio em feijão-caupi cultivado na região da Pré-Amazonia maranhense**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 46, n. 3, p. 303-308, 2011.
- HOLT, John G. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9ª. ed. Williams & Wilkins. 787 p. 1994.
- HUBAC, Camille; FERRAN, J.; GUERRIER, Daniele. Luteolin absorption in *Rhizobium meliloti*, wild-type and mutant strains. **Journal Gen. Microbiol.** Vol. 139, p.1571-1578, 1993.

- HUNGRIA, Mariangela. Sinais moleculares envolvidos na nodulação das leguminosas por rizóbio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.18, p.339-364, 1994.
- IRISARRI, Pilar; et al.. **Characterization of rhizobia nodulating *Lotus subbiflorus* from Uruguay and soils. Plan and soil**. V.180, p. 39-47, 1996.
- JACOBI, Ubiratã Soares; FLECK, Nilson Gilberto. Avaliação do potencial aleopático de genótipos de aveia no início do ciclo. **Pesq. Agropec. Bras.**v.35, n.1, p.11-19, 2000.
- JARVIS, B.D.W.; et al. Transfer of *Rhizobium loti*, *R. huakuii*, *R. mediterraneum* e *R. tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**. Washington, v.47, p. 895-898, 1997.
- LABANDERA, Carlos. **Metodologias aplicadas a la evaluación de rizobios para Inoculantes para leguminosas forrajeras en Uruguay**. Trabajo Tecnicos. Departamento de Microbiología de Suelos, 2007. Disponível em:<gar//www.chasque. Net/microlab/ LMSCV/ TraTe/ metaplic.http>. Acesso em: 25 de mar. 2014.
- KWON, Soon-Wo; et al. **Analysis of the Genera Bradyrhizobium, Mesorhizobium, Rhizobium and Sinorhizobium on the Basis of 16S rRNA Gene and Internally Transcribed Spacer Region Sequences**. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Washington, v. 55, n.1, p. 263–270, 2005.
- LOH, John T.; STACEY, Gary. **Nodulation gene relation in *Bradyrhizobium japonicum*: unique integration of global regulatory circuits**. Applied and Environmental Microbiology. Washington, v. 69, n.1, p10-17, 2003. Lotus Newsletter, v. 19, p. 37-43, 1988.
- LOPES, Eli Sidney; et al. Especificidade hospedeira e pré-seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* para variedades Santa-Rosa, viçosa e IAC-2 de soja (*Glycine Max*) (L.) Merrill. **Bragantia**, v.35, p.1-11, 1976.
- LIU, Bingsheng; SUTTON, Ann; STERNGLANZ, Rol. A yeast polyamine acetyltransferase. **The Journal Biol. Chem.** (17): 166659-64, 2005.

- MACHARIA, Peter N. KINYAMARIOT, Jenesio I.; EKAYA, C. K. K. ; MUREITHI, J. G.; THURANIRA, E. G.E. Evaluation of forage legumes for introduction into natural pastures of semi-arid rangelands of Kenya. **Grass and Forage Science**. Nairobi, Nairobi, Kenya, 65. 456-462, 2010.
- MARTINS, Nayara Moreno; CASTRO, Alini Suzane Oliveira; SCHOLZ, Rafael Afonso; MERCANTE, Fábio Martins. Eficiência simbiótica de bactérias fixadoras de nitrogênio inoculadas em diferentes espécies de adubo verde. **Embrapa Agropecuária Oeste-Resumo em anais de congresso (ALICE)**. In: Jornada de iniciação à Pesquisa da Embrapa, 2012, Dourados. Resumos. Brasília, DF: Embrapa; Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2012 1 CD-ROM. JIPE 2012, 2012.
- MERCANTE, Fábio Martins; GOI, Sílvia Regina; FRANCO, Alívio Antônio. Importância dos compostos fenólicos nas espécies leguminosas e rizóbio. **Revista Universidade Rural**, Série Ciência da Vida. Rio de Janeiro, v. 22, n.1, p. 65-81, 2002.
- MICHIELS Jean, et al. *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. **FEMS Microbiology Ecology** 26: 193-205, 1998.
- MOREIRA, Fátima. M.; SIQUEIRA, José Osvaldo. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Editora da UFLA, 626 p. 2002.
- MUNIZ, Aleksander Westphal; NUNES, Ronielly; SILVA, Telma Andrea Carvalho; BROSE, Edemar; COSTA, Murilo Dalla; De SÁ, Enilson Luiz Sacool. Seleção de estirpes de rizóbio para grão-de-bico. Embrapa Amazônia Ocidental, 2 Epagri, 3, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). XIX CONGRESSO LATINOAMERICANO DE LA CIENCIA DEL SUELO: LATINOAMÉRICA UNIDA PROTEGIENDO SUS SUELOS, 2012.
- OLIVEIRA, Maria de Lurdes Abruzzi de Aragão de. Estudo taxonômico do gênero *Desmodium* Desv. (Leguminosae Faboideae, Desmodieae). **Iheringia**. Série Botânica, 1983.
- OVERBECK, Gerhard E., MULLER, Alessandra Fidels; PFADENHAUER, Jorg; PILLAR, Valério D.; BLANCO, Carolina C.; BOLDRIN, IIsis; BOTH, Rogério; FORNECK, Eduardo. Brazil's neglected biome: The South Brazilian Campos. **Perspect Plant Ecol Evol Syst**, Science Direct vol.2: 101-116, Dec. 2007.



- PAIM, Nilton R. Research on *Lotus* spp. In: RIO GRANDE DO SUL, SOUTHERN BRAZIL. *Lotus* Newsletter, v.19, p.37-43, 1991. **Research on Lotus spp.** In: Rio Grande do Sul, Southern Brazil. 1988
- PAIM, Nilton R.; RIBOLDI, João. Comparação entre espécies e cultivares do gênero *Lotus*. **Pesq. Agroc. Bras.**, Brasília, 26(10): 1699-1704, out. 1991.
- PELOSO, Maria José Del, DA COSTA, Joaquim Geraldo Caprio, RAVA, Carlos A., DE FARIA, Luís Cláudio. Embrapa Arroz e Feijão: Embrapa, 2012. Disponível: <https://www.alice.sistemasdeprodução.cnptia.embrapa.br/FontesHTMI/feijão/cultivoFeijoeiro/cultivares>. Acesso em: 23 dez., 2013.
- PEREIRA, Pâmela Menna. **Taxionomia e diversidade genética de rizóbios microssimbiontes de distintas de leguminosas com base na análise polifásica (BOX-PCR e 16S RNAr) e na metodologia MLSA.** 2008. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina (PR).
- PERES, José Roberto Rodrigues; MENDES, Leda C.; SUHET. Allert Rosa; VARGAS, Milton A.T. Eficiência e competitividade de estirpes de rizóbio para soja em solos de cerrados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.17, p.357-363, 1993.
- PRÉVOST, Daniela; GAUVIN, Glen; TRUDEL, Carl. Diversity of Bradyrhizobium populations associated to soybean-maize rotations in Québec, Eastern Canada and their potential to improved grow of both plat species. **Applied Soil Ecology** 59: 29-38. 2012
- SAMPAIO, Fernanda Bueno. **Isolados de Rizóbios Capturados por Genótipos Silvestres de Feijoeiro: Obtenção, morfologia e Uso de Fontes de Carbono.** Dissertação. Universidade Federal de Goiás. Goiás, 2013.
- SARRUGE, José R., Soluções nutritivas. **Summa Phytopathologica** v.1, n. 3, 213-234, 1975.
- SCHEFFER-BASSO, Simone; Meredith; VOSS, Márcio; JACQUES, Alino Victor Ávila. Nodulação e Fixação Biológica de Nitrogênio de *Adesmia latifolia* e *Lotus corniculatus* em vasos de Leonard. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 3, p. 687-693, 2001.

- SILVA, Francisco de Assis Santos e; AZEVEDO, Carlos Alberto Vieira de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 4, n. 71-78, 2002.
- SILVA, Leonardo Nogueira da Silva, Locatelli, Ana Paula Corteze; ESSI, Liliana. R. bras. Bioci, Porto Alegre, v. 11, n. 2, p. 256-262, abril/jun. 2013.
- SOMASEGARAN, Padma e HOBEN, Heinz J. Handbook for Rhizobia: methods in legume-rhizobium SOSTER, M.T.B.; SCHEFFER-BASSO, S.M.; DALL'AGNOL, M. Caracterização morfofisiológica de genótipos de cornichão (*Lotus corniculatus* L.) **Revista Brasileira Zootecnia**, v.33, n.6, supl. 1p. 1654-1661, 1994.
- SOSTER, Marcos T.B.; et al. Caracterização agrônômica de genótipos de cornichão (*Lotus corniculatus* L.) **Rhizobium technology Revista Brasileira Zootecnia**, v. 33, n.6, p. 1662-1671, Springer-Verlag, New York, 1994.
- SPRENT. Janet. Irene; DE FARIA. Sérgio. M. Mechanisms of infection of plants by nitrogen fixing organisms. **Plant and Soil**, v. 110, n. 2, p. 157-165, 1988.
- TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. Fisiologia vegetal. Trad. SANTARÉM, E.R. et al, 3ª ed., Porto Alegre; **Artemed**, 2004, p.719.
- TAVARES, Danielle Braga; LIRA, Mario de Andrade; DUBEUX, José Carlos Jr; MELO; Alexandre Carneiro Leão de; FIGUEIREDO, Márcia Barreto do Vale. Dinâmica de nodulação do Siratro por diferentes manejos de corte. **Pes. Agropec. Pernambuco**, Recife, v. 17, n. único, p. 30-36, jan./dez. 2012.
- TONON, Brenda C. **Compatibilidade e caracterização de rizóbios de *Lotus spp.*, isolados de solos do Rio Grande do Sul.** – Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Programa de Pós-graduação em Ciências do Solo, 2008.
- VARGAS, Milton A.T.; HUNGRIA, Mariângela. **Biologia dos solos dos Cerrados.** Planaltina: Embrapa-CPAC, 1997. 524 p.
- VERMA, Subhash C.; LADHA, Jagdish.K.; TRIPATHI, Amil K. Evolucion of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, Vanasi, v.91, p. 127-141, Oc. 2001.

VIEIRA, Clibas; DE PAULA Júnior T. J.; BORÉM, Aluísio. **Feijão: aspectos gerais e cultura no estado de Minas Gerais**. Viçosa: Univeridade Federal de Viçosa, 596 p., 1998.

VILELA, Herbert. Seleção e escolha de especies forrageiras. Formação de Pastagens. CPT. Viçosa. 128 p. 2000.

VINCENT, James Matthew. **Manual for the practical study of root-nodules bacteria**. I.B.P. Handbook: Blackwell Science. Oxford, v. 15, 164 p., 1970.

VOSS, Márcio. Inoculação de rizóbio no sulco de semeadura para soja, em um campo native, norte do Rio Grande do Sul, Passo Fundo. Embrapa Trigo, 2002 5 p (Embrapa trigo). **Comunicado técnico on line** (108) Disponível em: <[http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p\\_co108.htm](http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_co108.htm)> Acesso em: 12 de nov. 2014.

VIGNOLIO, Osvaldo. R.; FERNANDEZ, Osvaldo. Nestor. MARCEIRA, Nestor O. Flooding tolerance in five populations of *Lotus glaber* Mill. (Syn *Lotus tenuis* Waldst. et al, Kit.). **Australian Journal of Agricultural Research**. Collingwood, v. 50, n.; p.555-560,1999.

## **7. APÊNDICES**

**Apêndice 1.** Características fenotípicas dos rizóbios isolados de plantas de *L. corniculatus* (Lc) avaliados neste trabalho: diâmetro, tempo de crescimento, forma, consistência, densidade ótica, da colônia em meio de cultura levedura manitol (LM) com vermelho Congo e ágar e a reação de pH em meio de LM com indicador azul de bromotimol.

Isolados de Rizóbios	Diâmetro (mm)	Tempo de crescimento (dias)	Forma	Densidade ótica	Consistência	Reação de pH
UFRGS Lc 2	3	3	Circular	Opaca	Gomosa	Básico
UFRGS Lc 3	4	3	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 4	4	3	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 8	1	11	Puntiforme	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 9	3	10	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 10	3	3	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 12	3	3	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 14	5	12	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 16	3	3	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 17	2	9	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 18	3	3	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 19	6	4	Circular	Translúcida	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 20	4	4	Circular	Translucid	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 26	4	4	Circular	Translúcida	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 27	4	5	Circular	Translúcida	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 61	5	9	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 62	2	5	Circular	Transparente	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 63	4	5	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 64	2	4	Circular	Transparente	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 71	3	5	Circular	Transparente	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 72	1	4	Puntiforme	Transparente	Aquosa	Ácido

**Apêndice 1. Continuação...** Características fenotípicas dos rizóbios isolados de plantas de *L. corniculatus* (Lc) avaliados neste trabalho: diâmetro, tempo de crescimento, forma, consistência, densidade ótica, da colônia em meio de cultura levedura manitol (LM) com vermelho Congo e ágar e a reação de pH em meio de LM com indicador azul de bromotimol.

Isolados de Rizóbios	Diâmetro (mm)	Tempo de crescimento (dias)	Forma	Densidade ótica	Consistência	Reação de pH
UFRGS Lc 73	3	6	Circular	Opaca	Aquosa	Ácido
UFRGS Lc 78	2	4	Circular	Transparente	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 79	2	4	Circular	Transparente	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 83	3	5	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 85	4	2	Circular	Transparente	Aquosa	Ácido
UFRGS Lc 94	4	6	Puntiforme	Transparente	Aquosa	Básico
UFRGS Lc 102	5	5	Circular	Opaca	Aquosa	Ácido
UFRGS Lc 103	5	6	Circular	Opaca	Aquosa	Ácido
UFRGS Lc 105	3	5	Circular	Opaca	Gomosa	Acido
UFRGS Lc 108	2	6	Circular	Transparente	Aquosa	Ácido
UFRGS Lc 109	2	6	Circular	Transparente	Aquosa	Ácido
UFRGS Lc 110	3	7	Circular	Opaca	Aquosa	Básico
UFRGS Lc 111	1	7	Puntiforme	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 112	1	4	Puntiforme	Opaca	Aquosa	Ácido
UFRGS Lc 119	1	5	Puntiforme	Opaca	Aquosa	Ácido
UFRGS Lc 122	1	5	Puntiforme	Opaca	Aquosa	Ácido
UFRGS Lc 124	2	5	Circular	Opaca	Aquosa	Básico
UFRGS Lc 125	2	5	Circular	Opaca	Aquosa	Básico
UFRGS Lc 126	2	5	Circular	Transparente	Aquosa	Ácido
UFRGS Lc 127	2	4	Circular	Transparente	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 128	2	5	Circular	Transparente	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 131	3	5	Circular	Transparente	Gomosa	Básico

**Apêndice 1. Continuação...** Características fenotípicas dos rizóbios isolados de plantas de *L. corniculatus* (Lc) avaliados neste trabalho: diâmetro, tempo de crescimento, forma, consistência, densidade ótica, da colônia em meio de cultura levedura manitol (LM) com vermelho Congo e ágar e a reação de pH em meio de LM com indicador azul de bromo timol

Isolados de Rizóbios	Diâmetro (mm)	Tempo de crescimento (dias)	Forma	Densidade ótica	Consistência	Reação de pH
UFRGS Lc 133	1	5	Puntiforme	Transparente	Aquosa	Ácido
UFRGS Lc 135	1	4	Puntiforme	Transparente	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 141	3	5	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 142	4	5	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 144	3	5	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 151	3	5	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 155	3	5	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 166	3	5	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 175	3	5	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 183	1	6	Puntiforme	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 185	3	5	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 186	6	6	Circula	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 187	4	6	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 189	5	6	Circular	Opaca	Aquosa	Ácido
UFRGS Lc 190	3	5	Circular	Opaca	Aquosa	Ácido
UFRGS Lc 191	6	6	Circula	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 192	4	6	Circular	Opaca	Gomosa	Acido
UFRGS Lc 193	3	6	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 194	3	6	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 195	5	6	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 196	4	6	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 197	6	6	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido

**Apêndice 1 – Continuação...** Características fenotípicas dos rizóbios isolados de plantas de *L. corniculatus* (Lc) avaliados neste trabalho: diâmetro, tempo de crescimento, forma, consistência, densidade ótica, da colônia em meio de cultura levedura manitol (LM) com vermelho Congo e ágar e a reação de pH em meio de LM com indicador azul de bromotimol.

Isolados de Rizóbios	Diâmetro da colônia (mm)	Tempo de crescimento (dias)	Forma	Densidade Ótica	Consistência	Reação de pH
UFRGS Lc 198	4	6	Circular	Opaca	Aquosa	Ácido
UFRGS Lc 199	2	6	Circular	Opaca	Gomosa	Básico
UFRGS Lc 200	3	6	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 204	3	6	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 210	2	6	Circular	Opaca	Gomosa	Básico
UFRGS Lc 211	5	6	Circular	Opaca	Gomosa	Básico
UFRGS Lc 213	5	6	Circular	Opaca	Gomosa	Básico
UFRGS Lc 214	2	6	Circular	Opaca	Gomosa	Básico
UFRGS Lc 215	2	6	Circular	Opaca	Gomosa	Básico
UFRGS Lc 218	5	6	Circular	Opaca	Gomosa	Básico
UFRGS Lc 221	4	6	Circula	Opaca	Aquosa	Ácido
UFRGS Lc 223	4	6	Circular	Opaca	Gomosa	Básico
UFRGS Lc 404	2	7	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 421	6	8	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 422	6	8	Circular	Transparente	Aquosa	Ácido
UFRGS Lc 434	2	6	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 443	2	5	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 453	4	5	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 458	4	5	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lc 460	5	5	Circular	Opaca	Aquosa	Ácido
UFRGS Lc 465	6	5	Circular	Opaca	Aquosa	Ácido
UFRGS Lc 512	4	5	Circular	Opaca	Aquosa	Ácido
UFRGS Lc 519	5	5	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido



**Apêndice 2** - Características fenotípicas dos rizóbios isolados de plantas de *L. uliginosus* (Lu) avaliados neste trabalho: diâmetro, tempo de crescimento, forma, consistência, densidade ótica, da colônia em meio de cultura levedura manitol (LM) com vermelho Congo e ágar e a reação de pH em meio de cultivo LM com indicativo azul de bromotimol.

Isolados de rizóbios	Diâmetro da colônia (mm)	Tempo de crescimento (dias)	Forma	Consistência	Densidade ótica	Reação de pH
UFRGS Lu 4	1	8	Puntiforme	Gomosa	Opaca	Básico
UFRGS Lu5	1	8	Puntiforme	Gomosa	Opaca	Básico
UFRGS Lu 8	1	8	Puntiforme	Gomosa	Opaca	Básico
UFRGS Lu 9	1	8	Puntiforme	Gomosa	Opaca	Básico
UFRGS Lu 10	1	8	Puntiforme	Gomosa	Opaca	Básico
UFRGS Lu 11	1	8	Puntiforme	Gomosa	Opaca	Básico
UFRGS Lu 12	1	8	Puntiforme	Gomosa	Opaca	Básico
UFRGS Lu 14	1	7	Puntiforme	Gomosa	Opaca	Básico
UFRGS Lu 15	1	7	Puntiforme	Gomosa	Opaca	Básico
UFRGS Lu 16	1	8	Puntiforme	Gomosa	Opaca	Básico
UFRGS Lu 17	1	8	Puntiforme	Gomosa	Opaca	Básico
UFRGS Lu 21	1	8	Puntiforme	Gomosa	Opaca	Básico
UFRGS Lu 23	1	8	Puntiforme	Gomosa	Opaca	Básico
UFRGS Lu 25	1	8	Puntiforme	Gomosa	Opaca	Básico
UFRGS Lu 26	1	8	Puntiforme	Gomosa	Opaca	Básico
UFRGS Lu 27	1	8	Puntiforme	Gomosa	Opaca	Básico
UFRGS Lu 28	1	6	Puntiforme	Gomosa	Opaca	Básico
UFRGS Lu 32	2	6	Circular	Gomosa	Translúcida	Básico
UFRGS Lu 33	2	6	Circular	Gomosa	Translúcida	Básico
UFRGS Lu 35 (a)	2	2	Circular	Gomosa	Opaca	Básico
UFRGS Lu 35 (b)	2	6	Circular	Gomosa	Opaca	Básico
UFRGS Lu 36	2	6	Circular	Gomosa	Opaca	Ácido
UFRGS Lu 39	2	6	Circular	Gomosa	Opaca	Ácido
UFRGS Lu 50	2	6	Circular	Gomosa	Opaca	Ácido

**Apêndice 3** - Características fenotípicas dos isolados de plantas de *L. glaber* (Lg) avaliados neste trabalho: diâmetro da colônia, tempo de crescimento, forma, consistência, densidade ótica, da colônia em meio de cultura levedura manitol (LM) com vermelho Congo e ágar e a reação de pH em meio de cultura LM com indicativo azul de bromotimol.

Isolados de Rizóbios	Diâmetro da colônia (mm)	Tempo de crescimento (dias)	Forma	Densidade Ótica	Consistência	Reação de pH
UFRGS Lg 8	5	7	Circular	Translúcida	Gomosa	Ácido
UFRGS Lg 9	6	7	Circular	Translúcida	Gomosa	Ácido
UFRGS Lg 13	3	5	Circular	Translúcida	Gomosa	Ácido
UFRGS Lg 27	4	7	Circular	Translúcida	Gomosa	Ácido
UFRGS Lg 29	6	4	Circular	Translúcida	Gomosa	Básico
UFRGS Lg 39	5	4	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lg 40	2	5	Circular	Translúcida	Gomosa	Ácido
UFRGS Lg 41	4	5	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lg 59	2	5	Circular	Opaca	Gomosa	Ácido
UFRGS Lg 62	3	5	Circular	Translúcida	Gomosa	Ácido
UFRGS Lg 64	3	5	Circular	Opaca	Aquosa	Ácido
UFRGS Lg 67	1	4	Puntiforme	Translúcida	Gomosa	Ácido
UFRGS Lg 76	1	4	Puntiforme	Translúcida	Gomosa	Ácido
UFRGS Lg 82	2	4	Circular	Translúcida	Gomosa	Ácido
UFRGS Lg 87	2	4	Circular	Translúcida	Aquosa	Ácido
UFRGS Lg 92	2	4	Circular	Translúcida	Aquosa	Ácido
UFRGS Lg 97	3	5	Circular	Translúcida	Gomosa	Ácido
UFRGS Lg 102	4	5	Circular	Translúcida	Aquosa	Ácido
UFRGS Lg 139	2	5	Circular	Opaca	Aquosa	Básico
UFRGS Lg 191	6	5	Circular	Translúcida	Aquosa	Ácido
UFRGS Lg 192	3	5	Circular	Translúcida	Gomosa	Ácido

Meio de cultura e soluções utilizadas

**Apêndice 4** - Meio de Levedura Manitol (LM) – (Vincent, 1970).

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

Ajustar pH para 6,8

Para elaboração do meio sólido, acrescentar 7,0 g/L de ágar

**Apêndice 5** - Meio Levedura Manitol (LM) com Vermelho Congo –  
(Vincent, 1970)

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

Ajustar pH para 6,8

Para elaboração do meio sólido, acrescentar 15,0 g/L de ágar por litro de meio.

Para a caracterização fenotípica acrescentar 10 mL/L solução de vermelho Congo

**Apêndice 6** - Meio de Levedura Manitol Azul de Bromotimol (ABT) –  
(Vincent, 1970)

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

Ajustar pH para 6,8

Para elaboração do meio sólido, acrescentar 7,0 g/L.

Para a avaliação da reação de pH no meio de cultura acrescentar 10 mL de solução de Azul de Bromotimol

### Apêndice 7 - Meio de Solubilização de Fosfato de cálcio dibásico

Componentes	Para 1L de meio
Glicose	10 g
Extrato de levedura	2g
Ágar	15 g
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	1 g

Componentes	Para 50 mL
NH <sub>4</sub> Cl	5g
Água destilada	completar para 50 mL

Componentes	Para 100 mL
(Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> )).2H <sub>2</sub> O	1 g
Água destilada	completar para 100 mL

Preparar 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> parte do meio, separadamente e autoclavar;  
Após autoclavagem misturar as 3 partes e depois verter nas placas.

### Apêndice 8 - Solução Nutritiva de Sarruge (1975)

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

Ajustar o pH 6,8.

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