

# DIVISÃO 2 - PROCESSOS E PROPRIEDADES DO SOLO

## Comissão 2.1 - Biologia do solo

### DIVERSIDADE GENÉTICA, TOLERÂNCIA AOS FATORES DE ACIDEZ E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE RIZÓBIOS PARA CORNICHÃO DE SOLOS DO RIO GRANDE DO SUL<sup>(1)</sup>

Adriana Ferreira Martins<sup>(2)</sup>, Luciano Kayser Vargas<sup>(2)</sup>, Bruno Brito Lisboa<sup>(2)</sup>, Jamilla Alves Trindade Sampaio<sup>(3)</sup>, João Henrique Beltrame de Araújo<sup>(4)</sup>, Ariane Torres Turcatel<sup>(4)</sup>, Greice Daniele Diemer<sup>(5)</sup> & Enilson Luiz Saccol de Sá<sup>(6)</sup>

#### RESUMO

O cornichão é uma leguminosa forrageira perene hiberno-primaveril de grande importância para o Rio Grande do Sul, destacando-se pela capacidade de se manter em solos relativamente ácidos e pouco férteis. Com este trabalho, objetivou-se a seleção de rizóbios para cornichão tolerantes à acidez e ao Al tóxico e eficientes na fixação biológica de N em solos de baixa fertilidade. Foram avaliados 52 isolados de rizóbios de *Lotus* spp. obtidos de solos de cinco localidades do Rio Grande do Sul. Os rizóbios foram avaliados quanto à diversidade genética, à tolerância a pH 4,2 e ao Al tóxico. Entre os rizóbios tolerantes a fatores de acidez, sete foram avaliados quanto à eficiência simbiótica com plantas, em casa de vegetação, em vasos com solo não estéril. Observou-se alta diversidade genética entre os rizóbios estudados, dos quais 16 foram tolerantes a pH 4,2 e a 50 µM de Al em meio de cultura, produzindo populações da ordem de 10<sup>7</sup> até 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. Os sete rizóbios testados em casa de vegetação superaram as estirpes atualmente recomendadas para a produção de inoculantes, o que demonstra a existência, em solos do Rio Grande do Sul, de rizóbios tolerantes à acidez do solo e eficientes como fixadores de N em plantas de cornichão.

**Termos de indexação:** reação em cadeia de polimerase, pH baixo, alumínio, fixação biológica de nitrogênio.

<sup>(1)</sup> Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor. Recebido para publicação em 28 de julho de 2010 e aprovado em 26 de setembro de 2011.

<sup>(2)</sup> Pesquisadores da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária – FEPAGRO. Rua Gonçalves Dias 570, CEP 90130-060 Porto Alegre (RS). E-mails: biol.adriana@gmail.com; luciano-kayser@fepagro.rs.gov.br; bruno-lisboa@fepagro.rs.gov.br

<sup>(3)</sup> Acadêmica de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Av. Paulo Gama 110, CEP 90040-060 Porto Alegre (RS). E-mail: jamillats@yahoo.com.br

<sup>(4)</sup> Acadêmicos de Biomedicina do IPA. Rua Cel. Joaquim Pedro Salgado 80, CEP 90420-060 Porto Alegre (RS). E-mail: jhb.araujo@terra.com.br; arianeturcatel@hotmail.com

<sup>(5)</sup> Acadêmica de Ciências Biológicas da UNISINOS. Av. Unisinos 950, CEP 93022-000 São Leopoldo (RS). E-mail: greicedi@yahoo.com.br

<sup>(6)</sup> Professor Adjunto do Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia, UFRGS. Av. Bento Gonçalves 7712, CEP 97105-400 Porto Alegre (RS). E-mail: enilson.sa@ufrgs.br

**SUMMARY:** *GENETIC DIVERSITY, TOLERANCE TO ACIDITY FACTORS AND SYMBIOTIC EFFICIENCY OF RHIZOBIA OF BIRDSFOOT TREFOIL IN SOILS OF RIO GRANDE DO SUL*

*Birdsfoot trefoil is a perennial winter-spring forage legume, highly important in Rio Grande do Sul, in the south of Brazil. It stands out for the ability to survive in relatively acidic and nutrient-poor soils. This study aimed to select birdsfoot trefoil rhizobial strains with tolerance to acidity and aluminum toxicity and efficiency in nitrogen fixation in nutrient-poor soils. Fifty-two isolates of Lotus spp rhizobia from soils of five locations in the state of Rio Grande do Sul were evaluated. The strains were evaluated for genetic diversity and tolerance to pH 4.2 and to aluminum toxicity. Of the acid-tolerant rhizobia, seven were evaluated for symbiotic efficiency in plants grown in pots with non-sterile soil, in a greenhouse experiment. Genetic diversity in the studied rhizobia was high and 16 were tolerant to pH 4.2 and to 50  $\mu\text{M}$  Al in media broth, reaching populations from  $10^7$  up to  $10^8$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ . The seven rhizobia tested in the greenhouse performed better than the strains recommended for inoculant production, demonstrating the existence of rhizobia tolerant to soil acidity and efficient in nitrogen fixation on birdsfoot trefoil plants in soils of Rio Grande do Sul.*

*Index terms: polymerase chain reaction; low pH; aluminum; biological nitrogen fixation.*

## INTRODUÇÃO

O cornichão (*Lotus corniculatus* L.) destaca-se pela sua boa produção, tolerância a solos ácidos e de baixa fertilidade, por não provocar timpanismo (Maroso, 2006) em animais ruminantes e por possuir características incomuns à maioria das leguminosas forrageiras, como pronta formação de gemas adventícias de raízes quando a coroa é removida e a versatilidade de uso tanto para pastejo quanto para feno (Scheffer-Basso et al., 2005). No Brasil, o único cultivar disponível é o São Gabriel, desenvolvido pela Estação Experimental de São Gabriel, atual Fepagro Forrageiras, no Rio Grande do Sul, a partir de pesquisas realizadas entre 1955 e 1965, tendo seu cultivo se expandido para outros países da América do Sul (Soster et al., 2004). Essa leguminosa é capaz de fixar N atmosférico em simbiose com rizóbios, permitindo o cultivo da espécie sem o aporte de N mineral, o que, além de representar uma economia pela não aplicação de fertilizantes nitrogenados, melhora o teor de N total do solo.

A diversidade e o tamanho da comunidade rizobiana nativa no solo podem variar com a presença de leguminosas hospedeiras (Parker, 1999; Andrade et al., 2002), de modo que a presença de uma determinada espécie de leguminosa no solo pode resultar no desenvolvimento de uma comunidade simbiótica específica (Rodriguez-Navarro et al., 2000; Carelli et al., 2000). Por outro lado, na ausência de uma planta hospedeira, os estresses ambientais, como os efeitos tóxicos relacionados à acidez do solo, podem diminuir significativamente a comunidade de rizóbios no solo (Kahindi et al., 1997; Santos et al., 1999; Hungria & Vargas, 2000; Andrade et al., 2002). Com isso, a interação entre estresses ambientais e a presença do

legume hospedeiro pode influenciar a diversidade genética e a sobrevivência das comunidades de rizóbios no solo (Giongo et al., 2008).

Fatores da acidez do solo, como pH baixo e concentrações elevadas de Al tóxico, frequentemente, limitam todas as etapas do processo de infecção das raízes, formação de nódulos e assimilação do N pela planta (Pelegrin et al., 2009). A exposição de isolados de rizóbio à acidez diminui o crescimento, sugerindo que alguns processos citoplasmáticos da bactéria são sensíveis a esse fator. Em meio ácido, ocorre diminuição da síntese de proteínas pelas bactérias, o que também pode alterar o crescimento bacteriano (Hara & Oliveira, 2004). Assim, a capacidade de os rizóbios se adaptarem a essas condições adversas é fundamental para o estabelecimento de uma simbiose eficiente.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a diversidade genética de rizóbios nativos para plantas de *Lotus* spp. de ocorrência em solos do Rio Grande do Sul; selecionar isolados tolerantes a pH baixo e elevados teores de  $\text{Al}^{3+}$  tóxico; e avaliar a eficiência na fixação simbiótica de N desses rizóbios oriundos de solos agrícolas do Rio Grande do Sul.

## MATERIAL E MÉTODOS

Neste trabalho foram estudados 52 isolados de rizóbios nativos noduladores de *Lotus* spp. da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e as estirpes de *Mesorhizobium loti* liberadas para a produção de inoculantes para *Lotus* spp.: SEMIA 806 e SEMIA 816 (*Lotus corniculatus*),

SEMIA 830 (*L. glaber*), SEMIA 839 (*L. uliginosus*), SEMIA 849 (*L. subbiflorus*) e, como padrão, a estirpe de *Rhizobium tropici* SEMIA 4077, recomendada para *Phaseolus vulgaris*, utilizada por ser tolerante aos fatores de acidez (baixo pH e Al tóxico). Entre os isolados estudados, 31 eram rizóbios de *L. corniculatus*, 3 de *L. glaber*, 6 de *L. subbiflorus* e 12 de *L. uliginosus*. Os rizóbios foram obtidos por Fontoura (2007) e Frizzo (2007), a partir de isolamentos de amostras de solo de cinco municípios do Rio Grande do Sul: Bagé [31°17' S, 54°03' W], Encruzilhada do Sul [30°33' S, 52°22' W], Hulha Negra [31°24' S, 53°45' W], Mostardas [31°05' S, 50°55' W] e Piratini [31°18' S, 53°00' W]. Os isolados estudados neste trabalho representam uma parcela dos isolados obtidos por esses autores, mas que não haviam sido, até então, submetidos a qualquer tipo de avaliação.

A caracterização genética e os estudos microbiológicos de tolerância à acidez (baixo pH e Al tóxico) foram realizados no Laboratório de Fitopatologia, localizado na Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul (FEPAGRO). Os experimentos com inoculação de plantas foram conduzidos em casa de vegetação da FEPAGRO.

### Extração do DNA genômico dos rizóbios

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

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

### Amplificação do DNA genômico por oligonucleotídeos iniciadores BOXA1-R, ERIC e RISA

Após a verificação do produto da extração, foram realizadas as amplificações dos fragmentos de DNA, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores BOXA1-R (5' – CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G – 3') e ERIC1-R (5' – ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C – 3'), ERIC-2 (5' – AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G – 3') e SD-Bact-1522-bS-20 (5' – TGC GGC TGG ATC CCC TCC TT – 3'), LD-Bact-132-aA-18 (5' – CCG GGT TTC CCC ATT CGG – 3').

A reação de amplificação para PCR utilizada continha: 2 µL de DNA molde, 2,5 µL de tampão de PCR 10X, 0,25 µL de uma solução com 0,25 mmol L<sup>-1</sup>

de cada DNTP, 1,5 de MgCl<sub>2</sub>, 1 µL de DMSO, 1,25 µL de cada oligonucleotídeo iniciador 20 mmol L<sup>-1</sup>, 0,2 µL de Taq polimerase, e água ultrapura estéril para o volume final de 25 µL. A amplificação para PCR-BOX A1-R foi feita com um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por sete minutos, seguido por 34 ciclos de amplificação, sendo cada ciclo composto por uma fase com duração de um minuto a 94 °C, uma fase de um minuto a 53 °C e uma fase de oito minutos a 65 °C; para extensão final, procedeu-se a um ciclo extra a 65 °C por 15 min (Versalovic et al., 1994).

Para PCR-ERIC, a amplificação foi realizada com um ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por sete minutos, seguido por 30 ciclos de amplificação, sendo cada ciclo composto por uma fase com duração de um minuto a 94 °C, uma fase de um minuto a 52 °C e uma fase de oito minutos a 65 °C; para extensão final, procedeu-se a um ciclo extra a 65 °C por 16 min (Versalovic et al., 1991). A amplificação para PCR-RISA foi realizada com um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por dois minutos, seguido por 30 ciclos de amplificação, sendo cada ciclo composto por uma fase com duração de 15 segundos a 94 °C, uma fase de 15 segundos a 55 °C e uma fase de 45 segundos a 72 °C; para extensão final, procedeu-se a um ciclo extra a 72 °C por dois minutos (Fisher & Triplett, 1999).

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5 % em tampão TBE 1X, em voltagem constante (70 V). O perfil de bandas no gel foi transformado em uma matriz binária bidimensional, pelo programa *Gel-Pro Analyser 3.1*, em que 0 (zero) indicava a ausência de banda e 1 (um) a presença. A similaridade/dissimilaridade genética entre os isolados foi medida pelo coeficiente de Jaccard. As matrizes foram analisadas em conjunto pelo programa PAST – *Palaeontological STatistic* ver.1,96 (Hammer et al., 2001), e o dendrograma foi obtido pelo método de agrupamento *Unweighted Pair-Group Average* (UPGMA), utilizando o programa *Multivar Cluster Analysis* do PAST. Foi calculado o índice de Shannon para a diversidade dos isolados, usando-se o agrupamento de 70 % de similaridade (Dilly et al., 2004).

### Tolerância dos rizóbios a pH 4,2

A tolerância dos rizóbios a pH 4,2 foi avaliada pela quantificação do crescimento em meio líquido, utilizando-se o meio mínimo de Wood & Cooper (1985) (MWC) modificado por Sá (2001). A composição do meio foi modificada substituindo-se a fonte de Fe na forma de Fe-EDTA por FeCl<sub>3</sub>, ficando o meio composto por CaCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 1000 µM, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 500 µM, KCl 50 µM, FeCl<sub>3</sub> 25 µM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 µM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 10 µM, MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O 1 µM, ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 5 µM, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 1 µM, NaMoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O 25 µM, CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 5 µM, glutamato de sódio 1,8 g L<sup>-1</sup>, arabinose 0,3 g L<sup>-1</sup>, galactose 0,3 g L<sup>-1</sup>, tiamina HCl 100 µg L<sup>-1</sup> e biotina 250 µg L<sup>-1</sup>. O crescimento dos rizóbios foi avaliado a pH 4,2 e pH 6,8. O inóculo foi preparado com culturas

crecidas em meio líquido TY, em agitador orbital por sete dias a 28 °C. Uma curva de padronização do inóculo foi construída, determinando-se o número de células viáveis, por diluição sucessiva e inoculação em placas com meio YMA (Vincent, 1970) corado com vermelho congo; a leitura da absorbância da suspensão de células foi feita em espectrofotômetro a 540 nm, com o objetivo de padronizar o inóculo em torno do valor da absorbância de 0,013 nm, que correspondia a cerca de  $10^4$  células viáveis  $\text{mL}^{-1}$  de meio. Após padronização em cerca de  $10^4$  células viáveis  $\text{mL}^{-1}$  de meio, as culturas foram inoculadas em frascos contendo meio MWC líquido – previamente esterilizados em autoclave a 120 °C por 15 min – e incubadas em agitação orbital constante de 100 rpm por um período, estabelecido a partir de testes preliminares, de sete dias a 28 °C. Posteriormente, determinou-se o número de células viáveis, usando-se o método de gotas (Miles & Misra, 1938). A contagem do número de colônias formadas foi feita após dois dias de incubação em estufa a 28 °C para os rizóbios de crescimento rápido, e depois de sete dias para os de crescimento lento. Foram realizadas três repetições por tratamento e consideradas como tolerantes à acidez as culturas dos rizóbios que apresentaram número de células viáveis, no mínimo, mil vezes maior do que o do inóculo. Determinou-se também o pH do caldo de cultura ao final da incubação, para verificar a possível alteração durante o crescimento bacteriano.

### Tolerância dos rizóbios a alumínio tóxico

Esta avaliação foi realizada utilizando-se a mesma metodologia empregada para a avaliação da tolerância em baixo pH, descrita anteriormente. O meio MWC foi preparado a pH 4,2, com posterior adição da solução de  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  5 mM para manter concentração final de 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$ . A solução de  $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  foi preparada em água ultrapura, previamente acidificada a pH 3,0 com HCl, e esterilizada por filtração em membrana 0,22  $\mu\text{m}$ . Foram empregados três tratamentos: meio MWC líquido a pH 4,2 sem  $\text{Al}^{3+}$ ; meio MWC líquido a pH 4,2 e 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$ ; e meio MWC líquido a pH 6,8 sem  $\text{Al}^{3+}$ . Assim como na avaliação anterior, foram realizadas três repetições por tratamento e considerados como tolerantes a Al tóxico os rizóbios que apresentaram número de células viáveis, no mínimo, mil vezes maior do que o do inóculo. Também, determinou-se o pH do caldo de cultura ao final da incubação.

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

Os dezesseis isolados que apresentaram tolerância tanto a baixo pH quanto a Al tóxico foram avaliados *in vitro* quanto à capacidade de nodular plantas de cornichão. Esse processo de autenticação dos rizóbios foi feito em condições axênicas, empregando-se o meio de Murashige & Skoog (1962) [ $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1650  $\text{mg L}^{-1}$ ,  $\text{KNO}_3$  1900  $\text{mg L}^{-1}$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  440  $\text{mg L}^{-1}$ ,

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  370  $\text{mg L}^{-1}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  170  $\text{mg L}^{-1}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  22,3  $\text{mg L}^{-1}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  6,2  $\text{mg L}^{-1}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  8,6  $\text{mg L}^{-1}$ , KI 0,83  $\text{mg L}^{-1}$ ,  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,25  $\text{mg L}^{-1}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,025  $\text{mg L}^{-1}$ ,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,025  $\text{mg L}^{-1}$ ,  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  37,25  $\text{mg L}^{-1}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  27,85  $\text{mg L}^{-1}$ , tiamina HCl 0,1  $\text{mg L}^{-1}$ , ácido nicotínico 0,5  $\text{mg L}^{-1}$ , piridoxina HCl 0,5  $\text{mg L}^{-1}$ , glicina 2,0  $\text{mg L}^{-1}$ , mio-inositol 100  $\text{mg L}^{-1}$ , sacarose 30  $\text{mg L}^{-1}$ , ágar 7,0  $\text{mg L}^{-1}$ ] com a composição modificada, substituindo-se as fontes de N, nas formas de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  e  $\text{KNO}_3$ , por KCl. Foram distribuídos 22 mL do meio de cultura em tubos de ensaios (250 x 24 mm), sendo colocadas, no meio já solidificado, três sementes de cornichão, previamente desinfestadas e inoculadas com os isolados em estudo, com cinco repetições para cada isolado. Os tubos permaneceram durante 30 dias em fotoperíodo, com 12 h diárias de luz e com a temperatura mantida em torno de 28 °C. Ao final desse período, a avaliação da nodulação foi realizada visualmente, sendo descartados os isolados que não formaram nódulos nas raízes das plantas.

Assim, para avaliação quanto à eficiência na fixação simbiótica de N em experimento realizado em casa de vegetação, foram selecionados os isolados UFRGS Lc 5, UFRGS Lc 607, UFRGS Lc 609, UFRGS Lc 614, UFRGS Lu 56, UFRGS Lu 57 e UFRGS Lu 59, que produziram nódulos em cornichão, quando avaliados *in vitro* com o meio de Murashige & Skoog (1962) livre de N, e apresentaram diferenças na caracterização genética.

Os vasos foram preenchidos com solo não esterilizado, classificado como Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico típico, solo arenoso e com baixo teor de matéria orgânica, coletado na Unidade Viamão da FEPAGRO (Quadro 1). As sementes foram submetidas à desinfestação com álcool 70 % (1 min) e hipoclorito de sódio (2 min), seguida de cinco lavagens com água esterilizada. Posteriormente, foram separadas 50 sementes, as quais foram embebidas em 10 mL do caldo de culturas de cada rizóbio estudado, crescidos em meio extrato de levedura e manitol (LM), incubado por sete dias a 28 °C, sob agitação constante a 100 rpm e com cerca de  $10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ . Em cada vaso, foram colocadas seis sementes pré-germinadas, utilizando-se cinco vasos por tratamento.

Neste experimento, foram utilizadas para comparação as estirpes de *Mesorhizobium loti* SEMIA 806 e SEMIA 816, liberadas para produção de inoculantes para cornichão, cedidas pela Coleção de Culturas de Rizóbios da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul (FEPAGRO). Além dos tratamentos inoculados, foram conduzidos dois tratamentos controle, um sem adição de N e outro com adição de N (100 mg). Após 20 dias de desenvolvimento, realizou-se o desbaste das plantas, deixando-se duas por vaso. O experimento foi conduzido por 180 dias.

**Quadro 1. Características químicas do solo Argissolo Vermelho-Amarelo distrófico típico coletado na Unidade de Viamão da FEPAGRO**

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

No final do período, a parte aérea foi separada do sistema radicular, acondicionada em sacos de papel e submetida à secagem em estufa a 65 °C, durante três dias. Uma vez seca, a parte aérea foi pesada, sendo em seguida moída, para determinação química do acúmulo de N no tecido, segundo método descrito por Tedesco et al. (1995). Os nódulos foram destacados das raízes, contados e secos em estufa a 65 °C por três dias, para determinação da massa de nódulos secos. A análise estatística dos dados foi realizada pela análise de variância (ANOVA), e a comparação de médias, pelo teste de Scott-Knott a 5 %, utilizando-se o programa SISVAR (Sistema de Análise de Variância).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

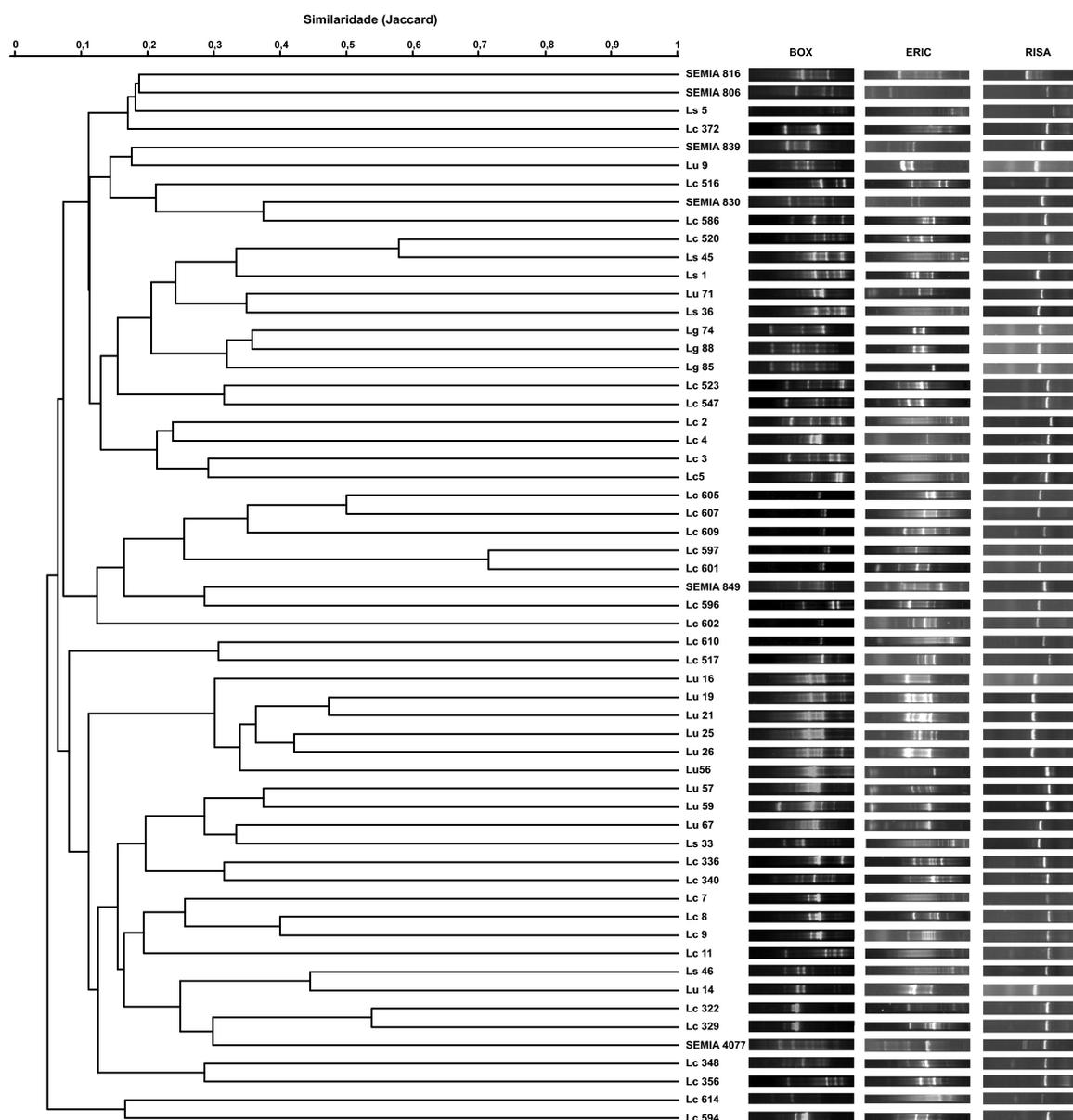
As ampliações do DNA genômico com oligonucleotídeos iniciadores BOX A 1-R, ERIC (ERIC1-R e ERIC-2) e RISA (SD-Bact-1522-bS-20 e LD-Bact-132-aA-18), submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5 %, permitiram a obtenção de perfis característicos para as estirpes e isolados estudados neste trabalho.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

Analisando os padrões de bandas formadas pela amplificação com ERIC, também se observou, assim como no PCR-BOX, a inexistência de bandas comuns a todos os isolados de rizóbios e estirpes. As bandas de ocorrência mais frequente foram 1.200 pb (presente em 20 rizóbios) e 1.000 pb (presente em 19 rizóbios). Os isolados UFRGS Lc 597 e UFRGS Lc 601 apresentaram perfis de bandas semelhantes entre si. Na análise do padrão de bandas, formadas a partir da amplificação do DNA genômico com RISA, observou-se a formação de uma única banda em cada isolado e

estirpe. O tamanho dos fragmentos variou de 1.500 pb até 600 pb, dependendo do rizóbio avaliado.

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

O índice de diversidade de Shannon, calculado a partir do número de grupos e número de indivíduos por grupo, foi de 4,04. Resultados semelhantes foram obtidos por Vargas et al. (2007), que utilizaram a mesma técnica empregada neste trabalho e encontraram índice de 4,3 estudando a diversidade genética de rizóbios noduladores de acácia-negra no Rio Grande do Sul. Do mesmo modo, Giongo et al. (2008) encontraram índices entre 4,41 e 6,17 estudando a diversidade de *Bradyrhizobium elkanii* e *B. japonicum*, que nodulam soja em solos do Rio Grande do Sul. O alto índice de Shannon encontrado neste estudo – 99,84 % da diversidade máxima ( $H_{\max} = 4,06$ ) que poderia ser obtida com o número de indivíduos avaliados ( $n = 58$ ) – indica elevada diversidade entre os isolados de rizóbios de *Lotus* spp. em solos do Rio Grande do Sul, demonstrando ser essa uma fonte potencial para a seleção de novas estirpes mais eficientes do que as atualmente liberadas para produção de inoculantes.



**Figura 1.** Dendrograma de genotipagem de estirpes e isolados de rizóbios, autóctones em solos do Rio Grande do Sul, simbiotes em quatro espécies de *Lotus*. Agrupamento obtido pelo coeficiente de Jaccard, para perfil de bandas obtido a partir da PCR com os oligonucleotídeos iniciadores BOX A1-R, ERIC e RISA.

Dos 52 isolados avaliados, 20 foram tolerantes a pH 4,2 em meio de cultura. Dezesesseis desses 20 isolados (UFRGS Lc 2, Lc 4, Lc 5, Lc 9, Lc 322, Lc 329, Lc 356, Lc 372, Lc 596, Lc 601, Lc 607, Lc 609, Lc 614, Lu 56, Lu 57 e Lu 59) foram também tolerantes à concentração de 50  $\mu\text{M}$  de alumínio em meio de cultura, produzindo populações, ao final do período de incubação de sete dias, da ordem de  $10^7$  até  $10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  (Quadro 2), ao passo que quatro isolados (UFRGS Lc 3, Lc 11, Lc 605 e Lu 67) foram tolerantes somente a pH 4,2 em meio de cultura, com populações da ordem de  $10^7$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ , mas não foram tolerantes a 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{Al}^{3+}$ . Os outros 32

isolados estudados, 61 % do total, mostraram-se sensíveis a pH 4,2. Resultados semelhantes foram obtidos por Hara & Oliveira (2004) e Vargas et al. (2007), em estudos com rizóbios, bem como no trabalho de Wood & Cooper (1985), nos quais esses autores relatam que estirpes de rizóbios para *Lotus* foram tolerantes com 20 e 50  $\mu\text{M}$  de Al a pH 5,5. Entretanto, nos estudos de Räsänen & Lindström (1997), 20  $\mu\text{M}$  de Al em meio de cultura inibiram a multiplicação de células de *Rhizobium galegae* em pH baixo. Thornton & Davey (1983) relataram que estirpes de *P. phaseoli* mostraram-se sensíveis a 5  $\mu\text{M}$  de Al em pH 4,4.

**Quadro 2. Crescimento de rizóbios de *Lotus* spp. em meio com baixo pH e com 50 µM de alumínio trivalente, após sete dias de incubação em meio MWC modificado**

Rizóbio	Tratamento			Crescimento da colônia <sup>(1)</sup>
	pH 6,8	pH 4,2	pH 4,2 + Al <sup>3+</sup>	
<b>Estirpes</b>		UFC mL <sup>-1</sup>		dia
SEMIA 4077	1,3.10 <sup>7</sup>	1,2.10 <sup>7</sup>	1,2.10 <sup>7</sup>	2
SEMIA 806	1,5.10 <sup>8</sup>	1,2.10 <sup>6</sup>	9,5.10 <sup>4</sup>	4
SEMIA 816	1,6.10 <sup>7</sup>	7,2.10 <sup>5</sup>	8,7.10 <sup>5</sup>	4
SEMIA 830	1,6.10 <sup>7</sup>	-	-	4
SEMIA 839	3,5.10 <sup>7</sup>	-	-	4
SEMIA 849	8,8.10 <sup>7</sup>	8,2.10 <sup>7</sup>	6,5.10 <sup>3</sup>	4
<b>Isolados</b>				
UFRGS Lc 2	6,2.10 <sup>8</sup>	7,2.10 <sup>7</sup>	7,2.10 <sup>7</sup>	5
UFRGS Lc 3	5,7.10 <sup>7</sup>	8,6.10 <sup>7</sup>	6,9.10 <sup>4</sup>	5
UFRGS Lc 4	2,8.10 <sup>7</sup>	2,9.10 <sup>7</sup>	1,5.10 <sup>7</sup>	5
UFRGS Lc 5	1,4.10 <sup>8</sup>	3,1.10 <sup>7</sup>	3,1.10 <sup>7</sup>	5
UFRGS Lc 9	2,5.10 <sup>8</sup>	1,2.10 <sup>8</sup>	9,8.10 <sup>7</sup>	5
UFRGS Lc 11	2,2.10 <sup>8</sup>	1,0.10 <sup>7</sup>	8,4.10 <sup>6</sup>	6
UFRGS Lc 322	2,5.10 <sup>7</sup>	1,4.10 <sup>7</sup>	2,0.10 <sup>7</sup>	7
UFRGS Lc 329	2,4.10 <sup>8</sup>	1,4.10 <sup>8</sup>	2,3.10 <sup>7</sup>	7
UFRGS Lc 356	9,7.10 <sup>7</sup>	6,9.10 <sup>7</sup>	1,3.10 <sup>7</sup>	7
UFRGS Lc 372	1,2.10 <sup>8</sup>	1,6.10 <sup>8</sup>	1,8.10 <sup>8</sup>	7
UFRGS Lc 596	6,9.10 <sup>7</sup>	3,0.10 <sup>7</sup>	2,2.10 <sup>7</sup>	5
UFRGS Lc 601	1,5.10 <sup>8</sup>	6,9.10 <sup>7</sup>	1,6.10 <sup>7</sup>	5
UFRGS Lc 605	1,4.10 <sup>8</sup>	6,6.10 <sup>7</sup>	1,3.10 <sup>6</sup>	5
UFRGS Lc 607	1,0.10 <sup>8</sup>	7,0.10 <sup>7</sup>	6,9.10 <sup>7</sup>	5
UFRGS Lc 609	1,9.10 <sup>8</sup>	9,3.10 <sup>7</sup>	8,9.10 <sup>7</sup>	5
UFRGS Lc 614	1,0.10 <sup>8</sup>	8,7.10 <sup>7</sup>	7,1.10 <sup>7</sup>	5
UFRGS Lu 56	6,8.10 <sup>8</sup>	7,4.10 <sup>7</sup>	7,7.10 <sup>7</sup>	5
UFRGS Lu 57	6,7.10 <sup>8</sup>	6,9.10 <sup>7</sup>	5,2.10 <sup>7</sup>	2
UFRGS Lu 59	7,0.10 <sup>7</sup>	7,0.10 <sup>7</sup>	7,6.10 <sup>7</sup>	2
UFRGS Lu 67	1,9.10 <sup>7</sup>	2,0.10 <sup>7</sup>	6,5.10 <sup>6</sup>	7

MWC: meio de Wood & Cooper; UFC: unidades formadoras de colônias; mL: mililitros; SEMIA: Sessão de Microbiologia Agrícola (Coleção brasileira oficial de rizóbios); UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Lc: espécie hospedeira *Lotus corniculatus*; Lu: espécie hospedeira *Lotus uliginosus*. <sup>(1)</sup> Tempo de surgimento das colônias de rizóbios em meio sólido YMA.

Tendo em vista os resultados obtidos neste experimento, em que 20 dos 52 isolados estudados foram tolerantes a pH 4,2 e, entre os tolerantes, 16 foram também tolerantes a 50 µM de Al<sup>3+</sup>, pode-se observar que a tolerância dos rizóbios a baixo pH é indicativo de tolerância a Al. No entanto, é necessário que o organismo seja tolerante e cresça em pH baixo antes de se avaliar sua tolerância ao Al<sup>3+</sup> (Sá, 2001). Também se deve levar em conta que a tolerância *in vitro* não indica necessariamente tolerância sob condição de solo/simbiose. A ausência de crescimento de 32 dos isolados de rizóbios estudados pode ter sido causada por diversos fatores, como, por exemplo, a diminuição da síntese de proteínas pelas bactérias (Peick et al., 1999), o que pode alterar o crescimento bacteriano.

Todas as estirpes recomendadas para produção de inoculantes para *Lotus* spp. (SEMIA 806, SEMIA 816, SEMIA 830, SEMIA 839 e SEMIA 849) foram sensíveis à concentração de 50 µM de Al<sup>3+</sup>, e somente a estirpe de *Mesorhizobium loti*, SEMIA 849, apresentou

tolerância a pH 4,2. A estirpe de *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 (CIAT 899), utilizada como padrão, mostrou-se tolerante tanto ao pH ácido como ao Al<sup>3+</sup>. Resultado semelhante foi obtido por Sá (2001) em estudo de isolados de feijoeiros em solos ácidos de Cunha (SP), em que o autor observou que SEMIA 4077 apresenta tolerância à acidez e ao Al. Graham et al. (1994) e Riccillo et al. (2000) também relataram em seus estudos que a estirpe de *R. tropici* tolera vários estresses abióticos, incluindo baixo pH e Al<sup>3+</sup>.

Ao final do período de incubação, observou-se que o pH do caldo (Quadro 3) de todas as culturas manteve-se entre 4,2 e 4,8. Esses resultados mostram que a tolerância ao pH baixo das bactérias estudadas parece não envolver mecanismos relacionados ao aumento do pH do meio, que pode ser um mecanismo de tolerância ao Al de alguns rizóbios (Wood, 1995). Ribeiro Júnior et al. (1988), durante o estudo da tolerância de *Bradyrhizobium* sp. de Mimosoideae à acidez em meio de cultura, observaram que as estirpes tolerantes cresceram em meio ácido com ou sem Al,

**Quadro 3. Alteração de pH do caldo por rizóbios de *Lotus* spp. ao final do período de sete dias de incubação**

Rizóbios	Meio		
	pH 6,8	pH 4,2	pH 4,2 + 50 µM Al <sup>3+</sup>
<b>Estirpes</b>			
SEMIA 4077	7,8	4,7	4,8
SEMIA 806	7,1	4,3	4,3
SEMIA 816	7,6	4,4	4,4
SEMIA 830	7,0	4,3	4,3
SEMIA 839	6,7	4,4	4,3
SEMIA 849	8,0	4,3	4,4
<b>Isolados</b>			
UFRGS Lc 2	7,5	4,5	4,4
UFRGS Lc 3	7,3	4,6	4,4
UFRGS Lc 4	6,6	4,3	4,3
UFRGS Lc 5	7,4	4,3	4,3
UFRGS Lc 9	6,8	4,3	4,3
UFRGS Lc 11	7,1	4,6	4,5
UFRGS Lc 322	7,5	4,3	4,3
UFRGS Lc 329	7,2	4,3	4,3
UFRGS Lc 356	7,6	4,3	4,3
UFRGS Lc 372	7,4	4,4	4,4
UFRGS Lc 596	7,4	4,3	4,3
UFRGS Lc 601	7,3	4,3	4,2
UFRGS Lc 605	7,3	4,3	4,2
UFRGS Lc 6 07	7,7	4,4	4,4
UFRGS Lc 609	7,2	4,3	4,3
UFRGS Lc 614	7,2	4,4	4,3
UFRGS Lu 56	7,5	4,5	4,4
UFRGS Lu 57	7,4	4,5	4,4
UFRGS Lu 59	7,6	4,6	4,5
UFRGS Lu 67	6,8	4,3	4,2

SEMIA: Sessão de Microbiologia Agrícola (Coleção brasileira Oficial de rizóbios); UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Lc: *Lotus corniculatus*; Lu: *Lotus uliginosus*.

sem induzir modificações iniciais ou posteriores no pH do meio, obtendo assim resultados semelhantes ao do presente estudo. Segundo Graham et al. (1994), a tolerância ao pH ácido em rizóbio depende da habilidade em manter o pH intracelular entre 7,2 e 7,5 quando o pH externo é ácido.

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

As plantas inoculadas com o isolado UFRGS Lu 59 produziram o maior número médio de nódulos por vaso (316), seguido dos isolados UFRGS Lu 56 e UFRGS Lc 614, com 281 e 215 nódulos por vaso, respectivamente. Esses valores foram superiores aos produzidos pelas inoculadas com as estirpes recomendadas SEMIA 806 e SEMIA 816, enquanto plantas inoculadas com o isolado UFRGS Lu 57 apresentaram o menor número médio de nódulos: 52 nódulos por vaso. Nos tratamentos controle, com e sem adição de N, não foi observada a formação de nódulos radiculares, o que demonstra que o solo utilizado no estudo não apresentava uma comunidade de rizóbios noduladores de cornichão. Dessa forma,

**Quadro 4. Número de nódulos e da massa seca de nódulos e produção de massa seca e nitrogênio total da parte aérea de plantas de *Lotus corniculatus* L. cv. São Gabriel inoculados com isolados de rizóbios e estirpes liberadas para produção de inoculantes**

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

Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5%. T+N: controle com adição de N; T-N: sem adição de nitrogênio.

não houve competição dos isolados e estirpes com a comunidade rizobiana nativa do solo no processo de formação do nódulo.

Os isolados testados neste trabalho apresentaram grande capacidade de induzir nodulação em cornichão, quando comparado com os resultados obtidos por Frizzo (2007), que, trabalhando com vasos Leonard preenchidos com substrato estéril, observou a formação de até 81 nódulos. O isolado que apresentou o maior número médio de nódulos por vaso, UFRGS Lu 59, foi isolado de uma planta de *Lotus uliginosus*, o que confirma que rizóbios desta espécie podem nodular plantas de *L. corniculatus*, como já observado por Tonon (2008), no estudo de compatibilidade simbiótica de rizóbios de *Lotus* spp., em que foram inoculados isolados de rizóbios obtidos de *L. uliginosus* em plantas de *L. corniculatus*, e estes induziram a formação de nódulos; dos 35 isolados estudados, 12 apresentaram capacidade de fixar N simbioticamente.

Em relação à massa seca de nódulos, observou-se que não houve correlação com o número de nódulos. O isolado UFRGS Lc 609, por exemplo, foi o que apresentou o maior valor de massa seca de nódulos, 81,4 mg/vaso, contendo menos da metade do número médio de nódulos que o isolado UFRGS Lu 59, o qual apresentou massa média de nódulos equivalente a 51,2 mg/vaso, indicando a formação de nódulos maiores e mais pesados pelo isolado UFRGS Lc 609. Por sua vez, o isolado UFRGS Lu 57, além do menor número médio de nódulos por vaso (52 nódulos) entre os isolados e estirpes, também apresentou a menor massa seca de nódulos, correspondente a 10,7 mg/vaso.

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

A massa seca da parte aérea não diferiu entre os isolados testados neste experimento, que se igualaram ao tratamento controle com adubação nitrogenada e superaram as estirpes recomendadas SEMIA 806 e SEMIA 816. Estas, por sua vez, não diferiram entre si, mas superaram o tratamento sem inoculação e sem adubação nitrogenada. Esses resultados mostram que as estirpes SEMIA 806 e SEMIA 816, nas condições do experimento, foram menos eficientes em suprir N para o crescimento da parte aérea da planta. Resultado semelhante foi encontrado por Frizzo (2007), o qual também constatou menor eficiência da estirpe SEMIA 806, o que indica a necessidade de substituí-la.

Avaliando os valores de acúmulo de N total na parte aérea das plantas, observa-se que o tratamento controle com adição de N acumulou teor de N superior ao dos demais tratamentos. Os tratamentos inoculados com

os isolados de rizóbios não diferiram entre si, sendo superiores aos tratamentos inoculados com as estirpes liberadas para a produção de inoculantes e ao tratamento controle sem adição de N. No caso do experimento, a fertilidade do solo utilizado não foi corrigida, o que pode ter ocasionado falta de nutrientes e, assim, ter feito com que o N a mais não se convertesse em massa seca.

## CONCLUSÕES

1. Há alta diversidade entre os rizóbios autóctones em solos do Rio Grande do Sul simbiotes em *Lotus* spp., indicando que os rizóbios estudados não são reisolamentos de estirpes utilizadas em inoculantes para as espécies de *Lotus* estudadas.

2. É possível a seleção de rizóbios nativos para *Lotus* spp. em solos do Rio Grande do Sul tolerantes a baixo pH e a toxidez de Al.

3. Os isolados testados em casa de vegetação são mais eficientes do que as estirpes atualmente recomendadas para a produção de inoculantes.

## LITERATURA CITADA

- ANDRADE, D.S.; MURPHY, P.J. & GILLER, K.E. The diversity of *Phaseolus*-nodulating rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:4025-4034, 2002.
- BROSE, E. Avaliação de rizóbio em cornichão em solo ácido. *Pesq. Agropec. Bras.*, 27:1237-1242, 1992.
- CARELLI, M.; GNOCCHI, S.; FANCELLI, S.; MENGONI, A.; PAFFETTI, D.; SCOTTI, C. & BAZZICALUPO, M. Genetic diversity and dynamics of *Sinorhizobium meliloti* populations nodulating different alfalfa cultivars in Italian soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66:4785-4789, 2000.
- DILLY, O.; BLOEM, J.; VOS, A. & MUNCH, J.C. Bacterial diversity in agroecological soils during litter decomposition. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70:468-474, 2004.
- FISHER, M.M. & TRIPLETT, E.W. Automated approach for ribosomal intergenic spacer analysis of microbial diversity and its application to freshwater bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:4630-4636, 1999.
- FONTOURA, R.A. Seleção de rizóbios nativos, de solos do Rio Grande do Sul, para *Lotus glaber* e *Lotus subbiflorus*. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007. 94p. (Tese de Mestrado)
- FRIZZO, M.L.S. Seleção e caracterização de rizóbios nativos, de solos do Rio Grande do Sul, para *Lotus corniculatus* L. e *Lotus uliginosus* Schkuhr. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007. 81p. (Tese de Mestrado)
- GIONGO, A.; AMBROSINI, A.; VARGAS, L.K.; FREIRE, J.R.J.; BODANESE-ZANETTINI, M. H. & PASSAGLIA, L.M.P. Evaluation of genetic diversity of bradyrhizobia strains nodulating soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) isolated from South Brazilian fields. *Appl. Soil. Ecol.*, 38:261-269, 2008.

- GRAHAM, P.H.; DRAEGER, K.J.; FERREY, M.L.; CONRAY, M.J.; HAMMER, B.E.; MARTINEZ, E.; AARONS, S.R. & QUINTINO, C. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR 1899. *Canadian J. Microbiol.*, 40:198-207, 1994.
- HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T. & RYAN, P.D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol. Electr.*, 4:1-9, 2001.
- HARA, F.A.S. & OLIVEIRA, L.A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. *Acta Amaz.*, 34:343-357, 2004.
- HUNGRIA, M. & VARGAS, M.T.A. Environmental factors affecting grain legumes in the tropics, with emphasis on Brazil. *Field Crops Res.*, 65:151-164, 2000.
- KAHINDI, J.H.P.; WOOPER, P.; GEORGE, T.; SOUZA MOREIRA, F.M.; KARANJA, N.K. & GILLER, K.E. Agricultural intensification, soil biodiversity and ecosystem function in the tropics: The role of nitrogen-fixing bacteria. *Appl. Soil Ecol.*, 6:55-76, 1997.
- MAROSO, R.P. Morfofisiologia comparada de *Lotus* spp. de diferentes hábitos de crescimento. Passo Fundo, Universidade de Passo Fundo, 2006. 127p. (Tese de Mestrado)
- MILES, A.A. & MISRA, S.S. The estimation of the bactericidal power of blood. *J. Hyg.*, 38:732-749, 1938.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.*, 15:473-497, 1962.
- PARKER, M.A. Relationships of bradyrhizobia from the legumes *Apios americana* and *Desmodium glutinosum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:4914-4920, 1999.
- PEICK, B.; GRAUMANN, P.; SCHMID, R.; MARAHIEL, M. & WERNER, D. Differential pH-induced proteins in *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium etli* CIAT 611. *Soil Biol. Biochem.*, 31:189-194, 1999.
- PELEGRIN, R.; MERCANTE, F.M.; OTSUBO, I.M.N. & OTSUBO, A.A. Resposta da cultura do feijoeiro à adubação nitrogenada e à inoculação com rizóbio. *R Bras Ci Solo*, 33:219-226, 2009.
- RÄSÄNEN, L.A. & LINDSTRÖM, K. Stability of short and long O-chain lipopolysaccharide types in *Rhizobium galegae* and their correlation with symbiotic properties and growth conditions, tolerance of low pH, aluminum and salt in the growth medium. *FEMS Microbiol. Lett.*, 155:17-22, 1997.
- RIBEIRO JÚNIOR, W.Q.; FRANCO, A.A. & LOPES, E.S. Tolerância de *Bradyrhizobium* sp. de Mimosoidea à acidez em meio de cultura. *Bragantia*, 47:333-340, 1988.
- RICILLO, P.M.; MUGLIA, C.I.; DE BRUIJN, F.J.; ROE, A.J.; BOOTH, I.R. & AGUILAR, O.M. Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance. *J. Bacteriol.*, 182:1748-1753, 2000.
- RODRIGUEZ-NAVARRO, D.N.; BUENDIA, A.M.; CAMACHO, M.; LUCAS, M.M. & SANTAMARIA, C. Characterization of *Rhizobium* spp. bean isolates from South West Spain. *Soil Biol. Biochem.*, 32:1601-1613, 2000.
- SÁ, E.L.S. Diversidade fenotípica e genética de rizóbios isolados de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) em solos ácidos de Cunha – SP. Piracicaba, Universidade de São Paulo, 2001. 109p. (Tese de Doutorado)
- SANTOS, M.A.; VARGAS, M.A.T. & HUNGRIA, M. Characterization of soybean bradyrhizobia strains adapted to the Brazilian Cerrados Region. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 30:261-272, 1999.
- SCHEFFER-BASSO, S.M.; VENDRUSCOLO, M.C. & CECCHETTI, D. Desempenho de leguminosas nativas (*Adesmia*) e exóticas (*Lotus*, *Trifolium*), em função do estágio fenológico no primeiro corte. *R. Bras. Zootec.*, 34:1871-1880, 2005.
- SOSTER, M.T.B.; SCHEFFER-BASSO, S.M. & DALL'AGNOL, M. Caracterização morfofisiológica de genótipos de cornichão (*Lotus corniculatus* L.). *R. Bras. Zootec.*, 33:1654-1661, 2004.
- TEDESCO, M.J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H. & VOLKWEISS, S.J. Análise de solo, planta e outros materiais. 2.ed. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p.
- THORNTON, F.C. & DAVEY, C.B. Acid tolerance of *Rhizobium trifolii* in culture media. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 47:496-501, 1983.
- TONON, B.C. Compatibilidade simbiótica e caracterização de rizóbios de *Lotus* spp., isolados de solos do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008. 80p. (Tese de Mestrado)
- VARGAS, L.K.; LISBOA, B.B.; SCHOLLES, D.; SILVEIRA, J.R.P.; JUNG, G.C.; GRANADA, C.E.; NEVES, A.G.; BRAGA, M.M. & NEGREIROS, T. Diversidade genética e eficiência simbiótica de rizóbios noduladores de acácia-negra de solos do Rio Grande do Sul. *R. Bras. Ci. Solo*, 31:647-654, 2007.
- VANDERLEYDEN, J. *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. *Microbiol. Ecol.*, 26:193-205, 1998.
- VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T. & LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.*, 19:6823-6831, 1991.
- VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; BRUIJN, F.J.D. & LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Molec. Cell. Biol.*, 5:25-40, 1994.
- VINCENT, J.M. Manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford, Blackwell Scientific, 1970. 164p.
- WOOD, M. A mechanism of aluminium toxicity to soil bacteria and possible ecological implications. *Plant Soil*, 17:63-69, 1995.
- WOOD, M. & COOPER, J.E. Screening clover and *Lotus* rhizobia for tolerance of acidity and aluminium. *Soil Biol. Biochem.*, 17:493-497, 1985.