

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

**SELEÇÃO DE RIZÓBIOS E EFEITO DO NITROGÊNIO NA
SIMBIOSE COM ALFAFA E CORNICHÃO**

Marcos Roberto Dobler Stroschein
Tese de doutorado

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

**SELEÇÃO DE RIZÓBIOS E EFEITO DO NITROGÊNIO NA
SIMBIOSE COM ALFAFA E CORNICHÃO**

MARCOS ROBERTO DOBLER STROSCHEIN
Engenheiro Agrônomo (UFSM)
Mestre em Ciência do Solo (UFSM)

Tese de doutorado apresentada como um dos requisitos para obtenção do
Grau de Doutor em Ciência do Solo

Porto Alegre (RS) Brasil
Abril, 2011

CIP - CATALOGAÇÃO INTERNACIONAL NA PUBLICAÇÃO
Biblioteca Setorial da Faculdade de Agronomia da UFRGS

MARCOS ROBERTO DOBLER STROSCHEIN

Engenheiro Agrônomo (UFSM)

Mestre em Ciência do Solo (UFSM)

TESE

Submetida como parte dos requisitos
para a obtenção do Grau de

DOUTOR EM CIÊNCIA DO SOLO

Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo

Faculdade de Agronomia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em:

Pela Banca Examinadora

Homologado em:

Por

ENILSON LUIZ SACCOL DE SÁ

Professor Orientador

PPG-Ciência do Solo/UFRGS

ALBERTO VASCONCELLOS INDA JUNIOR

Coordenador do Programa de Pós-

Graduação em Ciência do Solo

ANDREIA M. ROTTA DE OLIVEIRA

UERGS

ZAIDA INÊS ANTONIOLLI

PPG Ciência do Solo/UFSM

FLÁVIO OLIVEIRA CAMARGO

Coordenador do Programa de Pós-

Graduação em Ciência do Solo

PEDRO ALBERTO SELBACH

Diretor da Faculdade de Agronomia

*Aos meus familiares e amigos
Ao meu amigo André Paulo Hübner (in memoriam)
À minha esposa Cardine Martins dos Reis*

Agradecimentos

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, pelo conhecimento e formação.

Ao professor Enilson Luiz Saccol de Sá, pela atenção dispensada e pelo conhecimento compartilhado durante a realização deste trabalho.

Aos bolsistas Rogério Chimanski da Fontoura e Marcelo Wallau, pelo auxílio responsável nos trabalhos executados.

Aos companheiros do laboratório, pela confraternização diária e a amizade, em especial a Marcio Silveira, Andréia Binz, Brenda Tonon, Camile Granada, Diego Sevastian, Gleidson Gimenes, Leandro Hanns, Manuela Bruxel, Rafael Machado, Rafael Lima, Raquel Damasceno e Thais Cabral.

À Dr. Adriana Giongo e o Dr. Luciano Kayser Vargas, pelos conselhos dados durante toda a execução do projeto.

A minha esposa Cardine Martins dos Reis, pelo seu apoio e compreensão.

Aos amigos, André Paulo Hübner (*in memoriam*), Janete Baumgardt e Stefen Barbosa Pujol, “membros do Grupo das Diazotróficas”, pela amizade durante todos estes anos.

A todos os colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo da UFRGS, pelos anos de amizade e convivência.

A CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

SELEÇÃO DE RIZÓBIOS E EFEITO DO NITROGÊNIO NA SIMBIOSE COM ALFAFA E CORNICHÃO¹

Autor: Marcos Roberto Dobler Stroschein

Orientador: Prof. Enilson Luiz Saccol de Sá

RESUMO

As espécies forrageiras alfafa e cornichão são importantes plantas utilizadas durante o período hibernar nas pastagens do Rio Grande do Sul, reunindo características desejadas, como alto valor nutritivo, elevada produção de forragem, boa aceitabilidade e digestibilidade. No entanto, no Brasil, existe uma carência de trabalhos que visem à seleção e caracterização de estirpes de rizóbio em alfafa e cornichão que sejam mais competitivas e tenham alta capacidade de nodulação e fixação de nitrogênio. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi selecionar rizóbios eficientes na fixação biológica de nitrogênio em simbiose a *Lotus corniculatus* e *Medicago sativa*. Especificamente, os objetivos são: (a) isolar e caracterizar genética e fenotipicamente rizóbios isolados de alfafa e cornichão; (b) avaliar a produção de ácido indol-acético e sua influência na germinação de sementes de arroz; (c) selecionar rizóbios mais eficientes em alfafa; (d) selecionar a campo rizóbios para cornichão; (e) avaliar o efeito do nitrogênio na simbiose de rizóbio e alfafa. Foram realizados experimentos, em casa de vegetação, em laboratório e a campo, com plantas de *L. corniculatus* e *M. sativa*. Os rizóbios isolados de alfafa foram identificados como pertencentes às espécies de *Sinorhizobium meliloti* e *Rhizobium* sp. Alguns isolados de alfafa foram capazes de produzir ácido indol-acético e estimular o crescimento de sementes de arroz. Os isolados UFRGS Ms98, Ms63, Ms208 e Ms204 apresentaram índice de eficiência relativa da fixação de nitrogênio superiores aos das estirpes recomendadas para inoculação de *M. sativa*, indicando um bom potencial destes isolados para estudos a campo. O isolado de rizóbio nativo UFRGS Lc322 e a estirpe U510 foram mais eficientes na fixação biológica de nitrogênio, em condições de campo, do que a estirpe SEMIA 816, recomendada para cornichão no país. O aumento da dose de nitrogênio afetou a interação entre rizóbios e alfafa, no entanto foi possível selecionar o isolado UFRGS Ms208 como mais tolerante ao nitrogênio mineral.

¹ Tese de doutorado em Ciência do Solo. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. (140 p.) Abril, 2011. Trabalho realizado com apoio financeiro da CAPES e do CNPq.

RHIZOBIA SELECTION AND NITROGEN EFFECTS IN THE SYMBIOSIS WITH ALFAFA AND BIRDSFOOT¹

Author: Marcos Roberto Dobler Stroschein

Adviser: Prof. Dr. Enilson Luiz Saccol de Sá

ABSTRACT

Alfalfa and birdsfoot forages are important plants used during the pastures' hibernal period of Rio Grande do Sul, gathering desired traits such as high nutritional value, high forage production, good acceptability and digestibility. However, in Brazil, there is a lack of studies aiming the selection and characterization of Rhizobium strains in alfalfa and birdsfoot that are more competitive and have high capacity for nodulation and nitrogen fixation. Thus, the objective of this study was to select Rhizobia efficient in biological nitrogen fixation in symbiosis with *Lotus corniculatus* and *Medicago sativa*. Specifically, the objectives were: (a) to isolate and characterize genetically and phenotypically Rhizobia from alfalfa and birdsfoot; (b) to evaluate the production of indole acetic acid and its influence on germination of rice seeds; (c) to select the most efficient Rhizobia in alfalfa; (d) to select Rhizobia for birdsfoot in field; (e) to evaluate the effect of nitrogen in the symbiosis of Rhizobium and alfalfa. Experiments were performed, in a greenhouse, in laboratory and in field conditions, with *L. corniculatus* and *M. sativa*. The Rhizobia isolated from alfalfa were identified as belonging to the species of *Sinorhizobium meliloti* and *Rhizobium sp.* Some strains of alfalfa were able to produce indole acetic acid and stimulate the growth of rice seeds. The isolates UFRGS Ms98, Ms63, Ms208 and Ms204 showed efficiency index for nitrogen fixation higher than the strains recommended for inoculation of *M. sativa*, indicating a good potential of these isolates for field studies. The isolated of the native Rhizobium UFRGS Lc322 and the strain U510 were more efficient in nitrogen fixation in field conditions than SEMIA 816 strain, recommended for birdsfoot in the country. The increasing in the nitrogen dose affected the interaction between Rhizobia and alfalfa, but it was possible to select UFRGS Ms208 isolate as the most tolerant to mineral nitrogen.

¹ Doctoral thesis in Soil Science. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. (p. 140) April, 2011. Work performed with financial support from CAPES and CNPq.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	16
2. CAPÍTULO I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 Leguminosas forrageiras de clima temperado: alfafa e cornichão.	20
2.2 Fixação Biológica em pastagens de clima temperado.....	21
2.3 Seleção de estirpes nativas de rizóbio para uso em leguminosas.....	22
2.4 Fatores que interferem na interação rizóbio e leguminosa	24
2.5 Grupo rizóbio	27
2.6 Caracterização genética de rizóbios.....	29
2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
3. CAPÍTULO II	36
3.1 INTRODUÇÃO.....	37
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.2.1 Coleta de solo.....	39
3.2.2 Obtenção dos isolados	40
3.2.3 Caracterização morfológica dos rizóbios	41
3.2.4 Resistência dos rizóbios à acidez.....	41
3.2.5 Resistência dos rizóbios a alumínio tóxico	42
3.2.6 Produção de melanina.....	42
3.2.7 Solubilização de fosfatos	42
3.2.8 Produção de ácido indol acético	43
3.2.9 Caracterização genética dos rizóbios estudados.....	44
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
3.3.1 Isolamento de rizóbios simbiotes em alfafa	45

3.3.2	Morfologia de colônia e alteração do pH do meio de cultura	46
3.3.3	Seleção de rizóbios promotores de crescimento.	46
3.3.4	Produção de melanina	48
3.3.5	Resistência dos rizóbios a pH 4,2 e a alumínio tóxico	48
3.3.6	Caracterização genética dos rizóbios isolados de alfafa	52
3.4	CONCLUSÕES	56
3.5	REFERÊNCIAS	57
4.	CAPÍTULO III	62
4.1	INTRODUÇÃO	63
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	65
4.2.1	Quantificação in vitro da produção de auxinas equivalentes ao ácido indol-acético.....	65
4.2.2	Efeito da inoculação de rizóbios produtores de ácido indol-acético na germinação de sementes de arroz.....	66
4.2.3	Caracterização genética dos rizóbios estudados.....	67
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.4	CONCLUSÃO	74
4.5	REFERÊNCIAS.....	75
5.	CAPÍTULO IV.....	78
5.1	INTRODUÇÃO	79
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	82
5.2.1	Seleção de rizóbios em experimento com vasos do tipo “Leonard” em casa de vegetação.....	82
5.2.2	Seleção de rizóbios em experimento com vasos com solo em casa de vegetação.	83
5.2.3	Seleção inicial de rizóbios tolerantes ao nitrogênio.	84
5.2.4	Tolerância de rizóbios promissores ao nitrogênio mineral	85
5.2.5	Identificação dos isolados.....	86

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
5.3.1 Seleção de isolados de rizóbio em vasos Leonard.....	87
5.3.2 Seleção de isolados de rizóbio em vasos com solo.....	89
5.3.3 Seleção inicial de interações entre rizóbios e alfafa tolerante ao nitrogênio	90
5.3.4 Efeito do nitrogênio na interação entre rizóbio e alfafa.....	91
5.3.5 Análise filogenética dos isolados promissores.....	101
5.4 CONCLUSÕES	104
5.5 REFERÊNCIAS.....	105
6. CAPÍTULO V	111
6.1 INTRODUÇÃO	112
6.2 MATERIAL E MÉTODOS	114
6.2.1 Origem dos isolados e estirpes estudadas.	114
6.2.2 Seleção de rizóbios eficientes na fixação biológica de nitrogênio em <i>Lotus corniculatus</i>	114
6.2.3 Caracterização genética dos rizóbios	116
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	118
6.3.1 Fixação biológica de nitrogênio de isolados de rizóbio em cornichão	118
6.3.2 Caracterização genética dos rizóbios isolados de cornichão.....	119
6.3.3 Análise filogenética dos isolados promissores.....	120
6.4 CONCLUSÕES	123
6.5 REFERÊNCIAS.....	124
7. CONCLUSÕES GERAIS	128
8. ANEXO.....	130
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	135
10 RESUMO BIOGRÁFICO.....	140

RELAÇÃO DE TABELAS

2.1. Diferentes famílias e gêneros de rizóbio fixadores de nitrogênio descritos (WILLEMS, 2007). Porto Alegre, 2011.	29
3.1. Análise das características químicas das amostras de solo das diferentes regiões do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2011.	39
3.2. Número de isolados de rizóbios obtidos de nódulos de plantas de <i>Medicago sativa</i> inoculadas com amostras de solos de diferentes localidades do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2011.	45
3.3. Número de isolados obtidos nos locais de coleta formadores de melanina, solubilização de fosfato (SF) e produtores de auxinas por isolados de rizóbio de alfafa. Porto Alegre, 2011.	47
3.4. Crescimento de rizóbios de alfafa em meio com pH 4,2 e com 50 µM de alumínio tóxico incubadas em meio MWC modificado. Número de células do inoculo inicial (1×10^4) Porto Alegre, 2011.	50
4.1. Quantidades de equivalentes ao ácido indol-acético (AIA) produzido por rizóbios oriundos de alfafa em meio LM enriquecido com triptofano e efeito da inoculação de rizóbios produtores de ácido indol-acético no índice de velocidade de germinação (IVG) em sementes de arroz da cultivar IRGA 409. Porto Alegre, 2011.	69
4.2. Comprimento da raícula e parte aérea em plântulas de arroz da cultivar IRGA 409, com diferentes isolados de rizóbios produtores de AIA isolados de alfafa. Porto Alegre, 2011.	71
4.3. Identificação de rizóbios isolados de alfafa produtores de ácido indol-acético pelo sequenciamento da região 16S DNAr. Porto Alegre, 2011. .	72
5.1. Nitrogênio total acumulado na parte aérea, massa seca da parte aérea, índice de eficiência relativa, número de nódulos e massa seca de nódulos formados em raízes de plantas de <i>M. sativa</i> cultivadas em vasos de	

Leonard e inoculadas com isolados de rizóbios nativos e estirpes. Médias de 4 repetições.....	88
5.2. Nitrogênio total, massa seca da parte aérea, número de nódulos, matéria seca de nódulos e eficiência relativa na fixação biológica de nitrogênio em raízes de plantas de <i>M. sativa</i> inoculadas com isolados de rizóbios nativos e estirpes em vasos com solo.	91
5.3. Valores de F para número de nódulos, massa de nódulos, massa da parte aérea e massa seca da raiz de <i>M. sativa</i> avaliados em 115 dias. Porto Alegre, 2011.	93
5.4. Produção de matéria seca e nitrogênio total da parte aérea em plantas de <i>Medicago sativa</i> inoculadas com isolados e estirpes de rizóbio em diferentes concentrações de nitrogênio. Porto Alegre, 2011.	94
5.5. Equações de regressão ajustadas aos dados de massa seca da parte aera e nitrogênio total, em função de diferentes doses de nitrogênio. Porto Alegre, 2011.	96
5.6 Número e massa seca de nódulos em plantas de <i>Medicago sativa</i> inoculadas com isolados e estirpes de rizóbio em diferentes concentrações de nitrogênio. Porto Alegre, 2011.	97
5.7. Equações de regressão ajustadas aos dados de número de nódulos e massa de nódulos, em função de diferentes doses de nitrogênio. Porto Alegre, 2011.	99
5.8. Similaridade de parte região 16S do DNA ribossomal entre os isolados de alfafa e estirpes homologas obtidas no GenBank.	102
7.1. Número de nódulos, nitrogênio total da parte aérea e eficiência relativa (ER) na fixação de nitrogênio em plantas de <i>Lotus corniculatus</i> , inoculadas com rizóbios, em 210 dias de cultivo. Porto Alegre, 2011.	119

RELAÇÃO DE FIGURAS

- 2.1. Etapas da formação dos nódulos em leguminosas por rizóbios e influência do nitrogênio mineral. Adaptado de GUERTS, 2005. Porto Alegre, 2011.**26**
- 4.1. Efeito da inoculação com rizóbios isolados de alfafa na germinação de sementes de arroz da cultivar IRGA 409. As barras referem ao erro padrão da média de quatro repetições em cada tempo de amostragem. Resultados são referentes à germinação média de todos os tratamentos inoculados. Porto Alegre, 2011.**70**
- 4.2. Arvore filogenética baseada na análise *Neighbor-joining* da região 16S DNAr de isolados de rizóbio e sequencias homologas obtidas. O número representa as ramificações do valor de 1000 reamostragens (*bootstrap*).**73**
- 5.1 Dendograma de similaridade (%) do número de nódulos formado por diferentes rizóbios em plantas de alfafa em diferentes concentrações de nitrogênio.....**93**
- 5.3. Número de nódulos e massa seca de nódulos de alfafa inoculados com rizóbios em diferentes concentrações de nitrogênio. Porto Alegre, 2011. **98**
- 5.4. Coordenadas principais entre parâmetros dose de nitrogênio (DOSE), nitrogênio total (NTot), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de nódulos (MSN) e número de nódulos (NOD). Porto Alegre, 2011.....**100**
- 5.5. Arvore filogenética baseada na análise *Neighbor-joining* da região 16S DNAr de isolados de rizóbio e sequencias homologas obtidas. O número representa as ramificações do valor de 1000 reamostragens (*bootstrap*).**103**
- 7.1. Dendrograma de genotipagem de estirpes e isolados de rizóbios para *L. corniculatus*. Agrupamento obtido por UPGMA, utilizando-se o coeficiente

de Jaccard, para perfil de bandas obtido a partir da reação de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores BOX A 1-R + ERIC1-R e ERIC-2. **120**

7.2. Arvore filogenética baseada na análise *Neighbor-joining* da região 16S DNAr de isolados de rizóbio e sequencias homologas obtidas. O número representa as ramificações do valor de 1000 reamostragens (*bootstrap*).
..... **121**

1. INTRODUÇÃO GERAL

A diversidade dos micro-organismos tem sido explorada há muitos anos, visando à obtenção de diversos produtos biotecnológicos, destacando na agricultura a fertilização de solos através da fixação biológica de nitrogênio atmosférico, ação de fungos micorrízicos e a atividade de micro-organismos promotores de crescimento vegetal. Dentro dos micro-organismos capazes de realizar a fixação biológica de nitrogênio, destaca-se o grupo dos rizóbios que estabelecem simbiose com leguminosas. A fixação biológica do nitrogênio atmosférico é um dos processos microbianos mais bem estudados e explorados tecnologicamente relacionados à agricultura.

A inoculação de sementes de leguminosas com bactérias diazotróficas é prática comum em vários países. No Brasil, a inoculação da soja (*Glycine max* L. (Meril.)) com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* propicia economia em fertilizantes nitrogenados. Esta eficiência na fixação biológica de nitrogênio por esses micro-organismos se deve em boa parte ao melhoramento vegetal direcionado e de diversos trabalhos de seleção de rizóbios adaptados às condições edafoclimáticas brasileiras. Outra vantagem da fixação biológica de nitrogênio está relacionada com a questão ambiental. A redução da aplicação de nitrogênio no solo também diminui a poluição dos recursos hídricos, principalmente com nitrato. Além disso, a fabricação de fertilizantes nitrogenados industriais é energeticamente muito dispendiosa, pois depende da queima de combustíveis fósseis, para a obtenção de elevadas pressões e temperaturas.

Além da cultura da soja, a inoculação de outras espécies leguminosas com diferentes fins agrícolas é realizada em nosso país, destacando-se as espécies utilizadas no plantio de pastagem para alimentação animal. As espécies de cornichão (*Lotus corniculatus* L.) e alfafa (*Medicago sativa* L.) são utilizadas para o melhoramento de campo nativo e cultivo destinado à produção de feno e pastagem. No entanto existem cinco estirpes

de rizóbios selecionados para a produção de inoculantes para estas espécies forrageiras, sendo SEMIA 806 e SEMIA 816, indicados para inoculação de cornichão e SEMIA 116, SEMIA 134 e SEMIA 135, usados para alfafa. Este baixo número de estirpes recomendadas indica que existe uma carência de trabalhos que visam à seleção de estirpes de rizóbio em alfafa e cornichão. Além disso, a seleção de rizóbios mais eficientes na fixação biológica de nitrogênio pode beneficiar diretamente o desenvolvimento dos animais. O nitrogênio fixado pelas bactérias fará parte de aminoácidos, proteínas e outros compostos nitrogenados dos vegetais e, uma vez consumido pelos herbívoros, seguirá na cadeia trófica. Leguminosas forrageiras são importantes fontes de proteína para os animais, e o nitrogênio destas plantas pode ser totalmente oriundo da fixação biológica, ao invés de aplicações de fertilizantes.

Em virtude de novas descobertas dos potenciais biotecnológicos dos rizóbios, novas características vêm sendo atribuídas e sua avaliação torna-se necessária no processo de seleção. A seleção de micro-organismos tolerantes a diferentes características edáficas que possam interferir no processo de simbiose entre o rizóbio e a leguminosa, como encontrado nos solos com elevados teores de nitrogênio, não são considerados nos atuais programas de seleção de rizóbios e tornam-se importantes características a serem selecionadas. Além disso, a tolerância à acidez é outro fator a ser analisado na seleção de rizóbios destinados a inoculação em leguminosas forrageiras, pois afeta a bactéria, a planta e a simbiose entre esses organismos. Outras características importantes a serem avaliadas na seleção de rizóbios estão associadas à promoção de crescimento em plantas realizada por essas bactérias. O rizóbio pode atuar no desenvolvimento vegetal pela produção de hormônios de crescimento, como o ácido indol-acético, e na solubilização de fosfato. Essas características vêm sendo observadas em rizóbios isolados de diferentes espécies de leguminosas e promovendo o crescimento em diferentes tipos de plantas, como gramíneas, tornam-se importante na inoculação de leguminosas forrageiras a serem consorciadas com outras espécies vegetais, que poderiam auxiliar em seu crescimento. Além disso, o potencial biotecnológico na promoção do crescimento proporcionado pelo micro-organismo poderia ser usado na inoculação de gramíneas produtoras de grãos, como no arroz.

Além do interesse biotecnológico, outra etapa importante na seleção é a caracterização e identificação dos micro-organismos. A identificação e a caracterização de estirpes de rizóbio têm sido feitas, tradicionalmente, baseadas nos resultados de especificidade por hospedeiro, análise da morfologia de colônias, tempo de formação de colônias isoladas, alteração do pH do meio de cultura com azul de bromotimol como indicação de diferenças fisiológicas. A tolerância à acidez e alumínio tóxico, a capacidade de solubilizar fosfatos e de sintetizar ácido indol-acético também podem ser usadas na caracterização dos rizóbios, bem como o estudo genético.

A biologia molecular tem ajudado o desenvolvimento de métodos para realização da caracterização microbiana. As técnicas baseadas no sequenciamento da região 16S DNAr são usadas na identificação de isolados de rizóbio em gênero e espécie, tendo sido utilizado para a identificação de rizóbios isolados de alfafa e cornichão. No entanto a distinção entre isolados e estirpes de rizóbio é realizada por diferentes técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR), que utilizam oligonucleotídeos que amplificam sequências repetitivas dispersas no genoma de eubactérias. Ao serem separadas em gel de agarose criam padrões de bandas característicos e produzem uma boa discriminação das estirpes.

Dessa maneira, o trabalho tem como objetivo selecionar rizóbios eficientes na fixação biológica de nitrogênio em simbiose a *Lotus corniculatus* e *Medicago sativa*. Especificamente, os objetivos são: (a) isolar e caracterizar genética e fenotipicamente rizóbios isolados de alfafa e cornichão; (b) avaliar a produção de ácido indol-acético e sua influência na germinação de sementes de arroz; (c) selecionar rizóbios eficientes em alfafa; (d) selecionar a campo rizóbios para cornichão; (e) avaliar o efeito do nitrogênio na simbiose de rizóbio e alfafa.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

SELEÇÃO DE RIZÓBIOS EM LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS

2. CAPÍTULO I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

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

2.1 Leguminosas forrageiras de clima temperado: alfafa e cornichão.

A baixa disponibilidade de pastagem durante a estação fria no sul do Brasil caracteriza um dos problemas mais sérios enfrentados pelos pecuaristas. Uma das alternativas para resolver esse problema é a utilização de espécies de clima temperado. A alfafa e o cornichão são duas espécies de leguminosas forrageiras que possuem grande potencial de uso durante as estações frias, fornecendo altos teores de proteína bruta para a alimentação animal. A alfafa (*Medicago sativa* L.) é originária da Ásia, tendo o Irã como centro geográfico de origem (BRONDANE, 2009) e difundiu-se com sucesso pelo mundo em função de sua qualidade forrageira e adaptação. No Brasil, chegou aproximadamente no século XIX, entrando pelo Rio Grande do Sul, de onde se difundiu aos demais estados, principalmente Santa Catarina e Paraná (NUEMBERG et al., 1992).

A alfafa possui grande capacidade de adaptação a diferentes ambientes, sendo considerada cosmopolita por alguns autores, vegetando áreas de deserto até tundras (HADADD & CASTRO, 1999). A alfafa possui maior tolerância a seca do que as espécies de trevo vermelho (*Trifolium pratense* L.) e cornichão (*Lotus corniculatus* L.) devido ao sistema radicular pivotante e profundo (PETERSON et al., 1992). Além disso, é uma das

principais espécies de leguminosas forrageiras cultivadas no mundo, devido ao número de regiões que é possível o seu cultivo, pela qualidade forrageira aliada aos altos teores de proteína bruta e a capacidade de fixar grandes quantidades de nitrogênio atmosférico (RASSINI et al., 2008). As quantidades de nitrogênio fixado biologicamente podem variar entre 120 a 250 kg.ha⁻¹.ano⁻¹ nos Estados Unidos (ZHU et al., 1998) e 650 kg.ha⁻¹.ano⁻¹ em pastagens na Argentina (RACCA et al., 1998). A fixação biológica de nitrogênio ocorre pela simbiose com bactérias do gênero *Sinorhizobium meliloti* (de LAJUDIE et al., 1994) e *S. medicae* (TALEBI et al., 2008).

A espécie *Lotus corniculatus* L. é uma leguminosa forrageira perene hiberno - primaveril, de origem européia e mediterrânea (SOSTER et al., 2004), com excelente adaptação no sul do Brasil, Uruguai, Argentina e Chile. No Rio Grande do Sul, foi desenvolvido uma cultivar denominada São Gabriel, a partir de pesquisas entre 1955 e 1965 na Estação Experimental deste município (PAIM, 1988). Esse cultivar é caracterizado pela boa produtividade, elevada qualidade de forragem e capacidade de ressemeadura natural. Contudo apresenta problemas de persistência, devido ao seu hábito de crescimento ereto, não suportando pastejo intenso. O cornichão é uma espécie recomendada como planta forrageira pela sua capacidade de manter-se em solos relativamente ácidos, pouco férteis, onde normalmente outras leguminosas não se estabelecem ou tem pouca persistência (PRESTES & JACQUES, 2002). A espécie *L. corniculatus* normalmente estabelece associações efetivas com *Mesorhizobium* sp. (BARAIBAR et al., 1999; LABANDERA, 2004)

2.2 Fixação Biológica em pastagens de clima temperado

A fixação biológica de nitrogênio é caracterizada pela utilização do nitrogênio gasoso da atmosfera (N₂) como fonte de nitrogênio para o metabolismo de um grupo seletivo de seres vivos, que inclui algumas espécies de micro-organismos procarióticos. Estes micro-organismos possuem o complexo enzimático chamado nitrogenase, necessário para transformar o N₂ em amônia, subseqüentemente assimilada em aminoácidos e proteínas (NEVES & RUMJANEK, 1998). A capacidade diazotrófica está restrita a

Bacteria e Archaea, incluindo cianobactérias e bactérias Gram positivas e Gram negativas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). As bactérias denominadas rizóbio são consideradas o principal grupo de diazotróficos, por sua importância agrônômica e pela fixação de nitrogênio. Estes micro-organismos são bactérias Gram negativas, aeróbicas não esporulantes, pertencentes ao filo alpha-Proteobacteria, os quais são genericamente identificados como rizóbio, estando hoje distribuídos em seis gêneros (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Ensifer*, *Allorhizobium* e *Azorhizobium*) (ZAKHIA & LAUJUDIE, 2001; WILLEMS, 2007).

O processo de fixação biológica de nitrogênio é a principal forma de entrada do nitrogênio no sistema solo, tendo sido estimado em sistemas de pastagem quantidades de até 180 kg ha⁻¹ ano⁻¹ de N, sendo que 70 a 90% estão presentes na parte aérea das plantas (THOMAS, 1995). Este nitrogênio fixado pode proporcionar incrementos na produção de outras espécies em consórcio ou sucessão (THOMAS, 1995). A liberação do nitrogênio fixado biologicamente responderá em grande parte pela manutenção da produtividade da gramínea. A velocidade desta liberação interfere na participação da gramínea e da leguminosa na consorciação. O sistema de cultivo de pastagem permite o retorno de grande parte do nitrogênio fixado, voltando ao sistema, permitindo o desenvolvimento das gramíneas (THOMAS, 1995).

No entanto, condições de acidez do solo, salinidade, deficiências ou excesso de minerais, estresse hídrico, variações na temperatura, a quantidade de nitrogênio inorgânico no solo podem afetar a interação entre rizóbio e leguminosa, interferindo o fluxo de nitrogênio neste sistema de pastagem, inibindo o desenvolvimento de gramíneas consorciadas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Assim, a identificação destas características em isolados de rizóbio com elevada capacidade de fixação biológica de nitrogênio é importante para seleção destes micro-organismos.

2.3 Seleção de estirpes nativas de rizóbio para uso em leguminosas

Os princípios básicos que devem orientar a seleção de estirpes de rizóbio com o objetivo de aplicação prática na inoculação de leguminosas têm

sido objeto de muitos estudos (NEVES et al., 1998; HUNGRIA et al., 2001). A seleção deve objetivar identificação de estirpes eficientes, adaptadas às condições prevalentes no local de emprego e competitivas frente à população nativa. Vários aspectos agronômicos e culturais devem ser observados, tais como potencial de nodulação, fixação de nitrogênio, bem como a identificação de alguns parâmetros fisiológicos relacionados com a fase inicial da fixação de nitrogênio na planta.

A diversidade de rizóbios existentes dentro da população de rizóbio no ambiente natural é uma fonte de prospecção de micro-organismos superiores (SIKORA & REDZEPOVIC, 2003). Isto ocorre devido à rápida reprodução, variações, mutações e aos processos naturais de transferência genética. A busca de melhores estirpes deve começar pela mais ampla possível avaliação do material genético existente já adaptado de preferência às condições ambientais locais. A variabilidade genética a que é sujeito o microrganismo, faz com que as características, ditas desejáveis em rizóbio, como efetividade, competitividade, sobrevivência no solo, tenham caráter transitório e que possam ser sujeitas à seleção e melhoramento. Da mesma forma, certas características mais específicas, como tolerância à baixa ou alta temperatura, baixa umidade, salinidade, acidez e toxicidade ao alumínio e teores de nitrogênio mineral podem também ser sujeitas à seleção para obtenção de mutantes ou variantes espontâneos ou pela adaptação dirigida (VARGAS & HUNGRIA, 1997).

A maior parte dos trabalhos de seleção de estirpes avalia apenas a efetividade. No entanto, hoje os atuais programas de seleção de rizóbios visam encontrar características desejáveis, como a tolerância a estresse ambiental, promoção de crescimento e características que possibilitem uma vantagem competitiva no solo (VARGAS et al., 2009). Os rizóbios podem atuar no crescimento através da síntese de fitohormônios, síntese de algumas enzimas que modulam o nível de hormônios da planta, a fixação de nitrogênio, assim como a solubilização de fosfato inorgânico e mineralização de fosfato orgânico, que torna o fósforo disponível para as planta (VESSEY, 2003; HARA & OLIVEIRA, 2004). Dentre os gêneros de bactérias capazes de influenciar positivamente na fisiologia de plantas, destaca-se a família Rhizobiaceae pela capacidade de fixação de nitrogênio e solubilizar compostos de fosfato

inorgânico (HAMEED et al., 2004). A detecção visual e a estimativa quantitativa da capacidade de estirpes de rizóbio em solubilizar fosfatos pouco solúveis têm sido possível usando métodos em placa de Petri com meio de cultura para solubilizadores, no qual mostra uma zona translúcida ao redor da colônia em meio contendo fosfato mineral insolúvel (principalmente fosfato de cálcio ou fosfato de alumínio) como única fonte de fósforo (HAMEED et al., 2004; HARA & OLIVEIRA, 2004).

Bactérias da rizosfera podem influenciar no crescimento de plantas pela contribuição com a produção de fitohormônios, tal como as auxinas. A principal auxina é o ácido indol-acético (AIA), tendo aplicação prática como promotor no crescimento vegetal. Existe ampla evidência que numerosos micro-organismos do solo estão ativamente envolvidos na síntese de auxinas em meio de cultura e no solo (HAMEED et al., 2004;). O L-tryptofano, como aminoácido, serve como um precursor fisiológico para a biossíntese de auxinas em plantas e em micro-organismos (KHALID et al., 2004). Exsudados de raízes são naturalmente fonte de triptofano para os micro-organismos aumentando a biosíntese de auxina na rizosfera. A produção de AIA por rizóbio tem sido estudada pelo seu efeito na formação de raízes e nódulos em leguminosas (VARGAS et al., 2009). Os testes para a produção de AIA em meio de cultura foram positivos para algumas estirpes de rizóbio testadas por BISWAS et al. (2000), sugerindo um mecanismo potencial pelos quais essas bactérias podem regular o crescimento das plantas. É muito provável que auxinas de origem microbiana na rizosfera de plantas possam proporcionar uma resposta fisiológica positiva nas plantas hospedeiras. Assim, a avaliação de rizóbio a partir da avaliação “*in vitro*” da produção de AIA pode proporcionar uma base segura para selecionar isolados de rizóbio efetivos.

2.4 Fatores que interferem na interação rizóbio e leguminosa

Dentre os principais fatores que restringem a simbiose entre rizóbio e leguminosas, destacam-se a acidez do solo e fatores nutricionais relacionados, competição por sítios de nodulação entre as estirpes presentes no inoculante e as já estabelecidas no solo e grande mortalidade de células aderidas à semente durante a semeadura em períodos de alta temperatura e baixa umidade do solo (HUNGRIA & VARGAS, 2000). Solos ácidos e com

baixa fertilidade são comuns nas áreas de produção de forragem e frequentemente apresentam concentrações tóxicas de alumínio e, em alguns casos, de manganês (LAL, 1993). Tais condições de solos ácidos podem determinar problemas para a planta, bactéria e simbiose (ZAHNAN, 1999). No entanto existe variação entre espécies de leguminosas quanto à tolerância ao alumínio tóxico e acidez (HUNGRIA & VARGAS, 2000).

A temperatura é outro importante fator que interfere na fixação biológica do nitrogênio. Temperatura de solo situada em 25°C é apontada como adequada para boa nodulação e fixação do nitrogênio em leguminosas tropicais (HUNGRIA & VARGAS, 2000). Temperaturas de solo superiores a 35°C determinam baixa nodulação, principalmente se as estirpes utilizadas não são aptas para tal condição (HUNGRIA & VARGAS, 2000). O estresse hídrico é outro importante fator de interferência na fixação biológica de nitrogênio. O estresse hídrico interfere no crescimento e sobrevivência do rizóbio, na formação e longevidade dos nódulos, na síntese de leghemoglobina e nas funções do nódulo. Estresse severo por falta da água pode levar à interrupção irreversível da fixação do N₂ (HUNGRIA & VARGAS, 2000).

Alem desses fatores edáficos, o excesso de nitrogênio mineral interfere na nodulação das leguminosas, devido à redução da demanda nutricional da planta. Em ambientes de alto teor de matéria orgânica, espécies leguminosas apresentam um menor número ou até ausência de nódulos nas plantas, ocorrendo em função do incremento do teor de nitrogênio mineral pela mineralização da matéria orgânica (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

No entanto, os efeitos do nitrogênio na interação entre rizóbio e leguminosa ainda não são bem conhecidos. Em presença de nitrogênio, tem sido observada uma diminuição do número de nódulos e massa seca de nódulos, na atividade da nitrogenase, bem como a aceleração da senescência do nódulo ou sua desintegração (STREETER, 1988). Observou-se que a ação do nitrato na planta hospedeira, não apresenta efeito sobre o metabolismo do rizóbio (CARROLL & MATHEWS, 1990). Algumas hipóteses vêm sendo propostas, como a redução dos carboidratos nos nódulos (STREETER, 1988; VESSEY & WATERER, 1992), inibição de metabólitos intermediários do ciclo do nitrato, como glutamina (NEO LEYZELL, 1997) ou asparagina (BACANAMWO & HARPER, 1997), e diminuição da difusão do oxigênio nos

nódulos, restringindo a respiração dos bacterioides (SHULLER et al., 1998; VESSEY et al., 1998; GORDON et al., 2002).

Concentrações mais elevadas de nitrogênio mineral no solo interferem o complexo sistema de comunicação bioquímica existente entre leguminosa e rizóbio. A presença de concentrações inibitórias de nitrogênio afeta a produção de polissacarídeos e lectinas, que irão auxiliar no processo de adesão sob o pelo radicular (GAGE, 2004). A síntese de flavonóides pela leguminosa é prejudicada, não induzindo a produção dos fatores Nod nos rizóbios (GUERTS, 2005). A síntese dos fatores Nod identificados como lipoquitooligossacarídeos (LQO) são importantes por induzirem o processo de infecção na planta hospedeira (GAGE, 2004). Conseqüentemente a isso, na presença de concentrações mais elevadas de nitrogênio, o encurvamento do pêlo e a formação do cordão de infecção não ocorrem, inibindo a formação do nódulo (Figura 2.1). Devido a isso, o conhecimento do efeito do nitrogênio na interação rizóbio e leguminosa em um ambiente de pastagem torna-se uma importante característica a ser estudada em função do acúmulo de nitrogênio encontrado neste ambiente.

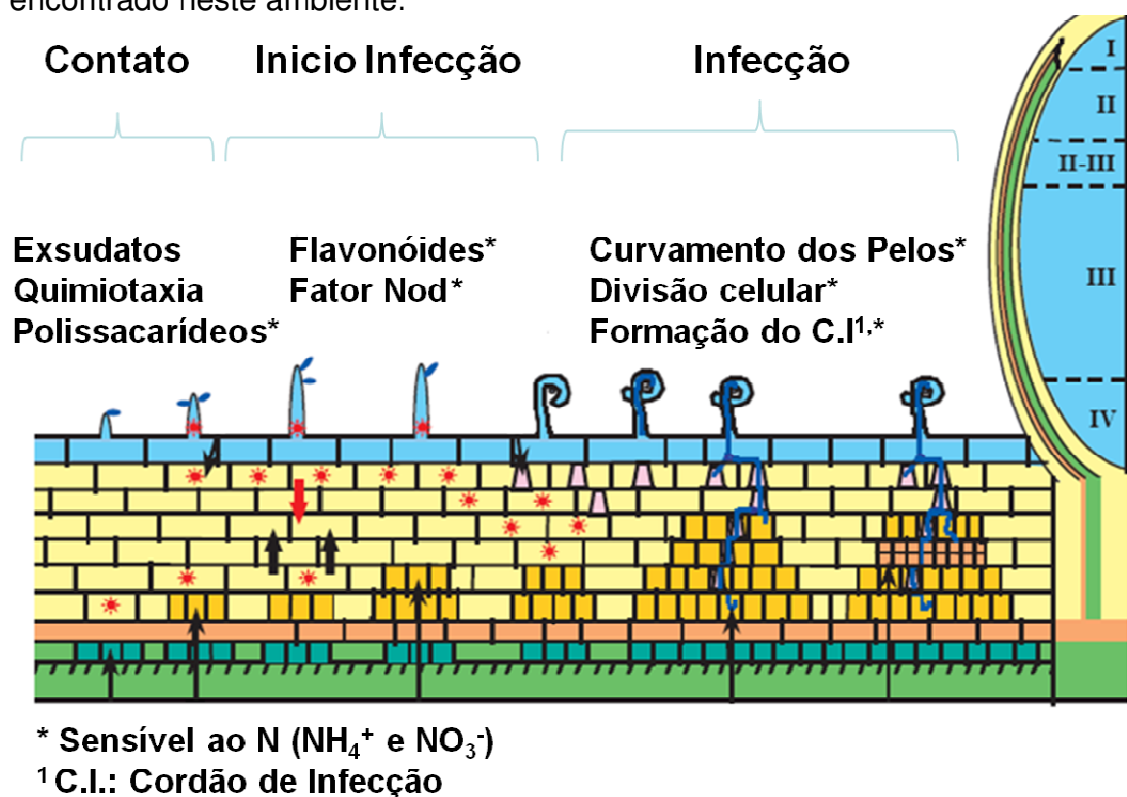


FIGURA 2.1. Etapas da formação dos nódulos em leguminosas por rizóbios e influência do nitrogênio mineral. Adaptado de GUERTS, 2005. Porto Alegre, 2011.

2.5 Grupo rizóbio

As plantas da família Leguminosae, composta por aproximadamente 750 gêneros, destes 250 cultiváveis (FREIRE, 1992), possuem uma interação simbiótica com bactérias da ordem Rhizobiales, que se caracterizam pela formação de estruturas hipertróficas, nas raízes e, excepcionalmente, no caule, denominadas nódulos. A capacidade de fixação biológica de nitrogênio destes micro-organismos ocorre devido ao complexo enzimático nitrogenase, que converte o nitrogênio atmosférico em amônia e assim disponibiliza nitrogênio para as plantas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Estes micro-organismos são bactérias Gram negativas, aeróbicas não esporulantes, pertencentes ao filo alpha-Proteobacteria, os quais são genericamente identificados como rizóbio (ZAKHIA & LAUJUDIE, 2001). A classificação destes micro-organismos, nos últimos vinte anos, esteve em constante alteração, sendo descobertos novos gêneros, alterando a taxonomia (WANG et al., 2006).

No estudo taxonômico inicial de rizóbio, todas as bactérias formadoras de nódulos em leguminosas eram classificadas no gênero *Rhizobium* (WANG et al., 2006), apresentando seis espécies: *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. lupini* e *R. japonicum*. Nesta classificação, o círculo de hospedeiros era o fator mais importante na definição destas espécies, embora tenham sido descritas também características morfológicas e fisiológicas (WANG et al., 2006). Com o prosseguimento das pesquisas, o uso da especificidade do hospedeiro como principal critério de classificação de rizóbio foi abandonado por apresentar um grande número de exceções dentro destes grupos (WANG et al., 2006).

Em seu trabalho, JORDAN (1982) modificou a taxonomia de rizóbio, dividindo-os em dois gêneros: *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*. O primeiro gênero correspondia às cepas de crescimento lento, de reação básica em meio de cultura LMA (Levedura Manitol Ágar) (VINCENT, 1970), com diâmetro menor ou igual a 1 mm e crescimento em 5 a 7 dias, designando somente uma espécie *Bradyrhizobium japonicum*, que incluiu também a espécie *R. lupini* por apresentar características semelhantes. No gênero *Rhizobium* alocaram-se três espécies: *R. leguminosarum*, *R. meliloti* e *R. loti*. Na primeira espécie foram considerados três biovars: *R. leguminosarum* bv. *viciae*, bv. *trifolii* e bv.

phaseoli. Os três biovares constituíram o mesmo grupo na taxonomia numérica e na hibridização DNA-DNA, mas corresponderam a diferentes grupos de nodulação cruzada (WANG et al., 2006).

Em estudos posteriores, outro grupo de bactérias de crescimento rápido foi coletado em solos na China e identificado, tanto a partir do solo como de nódulos de soja, cujas características fisiológicas e bioquímicas indicavam uma posição taxonômica intermediária entre *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (KEYSER et al., 1982). Desta maneira, se propôs a criação de uma nova espécie, *Rhizobium fredii*, baseados principalmente em experimentos de hibridização de DNA (SCHOLLA & ELKAN, 1984).

Atualmente, a taxonomia do grupo rizóbio esta sendo modificada. A principal alteração ocorreu no gênero *Rhizobium*, ao qual foram incluídas todas as espécies de *Agrobacterium* e *Allorhizobium undicola*, combinando as novas espécies: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* e *R. vitis* (WANG et al., 2006; WILLEMS, 2007). Outra mudança aconteceu ao gênero (Tabela 2.1). *Sinorhizobium*, de acordo com YOUNG (2003), os gêneros *Sinorhizobium* e *Ensifer* são similares e segundo o “Bacteriological Code” o gênero *Sinorhizobium* deve ser transferido para *Ensifer* por ter sido descrito posteriormente. Assim, hoje são consideradas quatro famílias (*Rhizobiaceae*, *Bradyrhizobiaceae*, *Phylobacteraceae* e *Xanthobacteraceae*), seis gêneros (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium/ Ensifer*, *Allorhizobium* e *Azorhizobium*) e 46 espécies validadas pelo IJSEM (International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology) (WILLEMS, 2007).

Outras espécies que apresentam a capacidade de formar nódulos e fixar nitrogênio, não pertencentes ao grupo rizóbio, isoladas de diferentes leguminosas. Dentro do Filo α -Proteobacteria foram descritos o gênero *Blastobacter* (*B. denitrificans*) isolado a partir de nódulos de *Aeschynomene indica* (van BERKUN et al., 2002), *Methylobacterium* (*M. nodulans*) de *Crotalaria* spp. (JOURAND et al., 2004), *Devosia* (*D. neptuniaea*) de *Neptunia natans* (RIVAS et al., 2002) e *Ochrobactrum* (*O. lupini*) de *Lupinus onoratus* (TRUJILLO et al., 2005).

No Filo β -Proteobacteria foi isolado o gênero *Ralstonia* (*R. taiwanensis*) a partir de nódulos de *Mimosa* spp. por CHEN et al. (2001),

enquanto VANDAMME *et al.* (2002) reportaram o gênero *Burkholderia*, abrangendo quatro espécies (*B. tuberum*, *B. phymatum*, *B. caribensis*, *B. cepacia*) isoladas de cinco leguminosas tropicais. Essas descobertas indicam que a diversidade de procariotos capazes de estabelecer simbiose com leguminosas pode ser muito mais ampla que o previsto e certamente conduzirão a avanços significativos no conhecimento da origem e evolução da fixação biológica de nitrogênio, assim como sua manipulação pelo homem.

Tabela 2.1. Diferentes famílias e gêneros de rizóbio fixadores de nitrogênio descritos (WILLEMS, 2007). Porto Alegre, 2011.

Família	Gênero	Número de Espécies
Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i>	16
	<i>Sinorhizobium</i> / <i>Ensifer</i>	13
Bradyrhizobiaceae	<i>Bradyrhizobium</i>	5
Phylobacteraceae	<i>Mesorhizobium</i>	10
Xanthobacteraceae	<i>Azorhizobium</i>	2

2.6 Caracterização genética de rizóbios

A caracterização de rizóbios utiliza tradicionalmente testes morfológicos, bioquímicos, enzimáticos e simbióticos para classificação e caracterização dos rizóbios (VINCENT, 1970). Recentemente, técnicas de biologia molecular têm facilitado o estudo e identificação destas bactérias (MENNA *et al.*, 2006). A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é a mais utilizada atualmente, pois esta permite a amplificação de sequências definidas na molécula de DNA (CHUEIRE *et al.*, 2000; LAGUERRE *et al.*, 2001).

Vários são os relatos sobre a utilização desta tecnologia nos estudos de ecologia, genética e taxonomia de rizóbios (LAGUERRE *et al.*, 2001; TONON, 2008), e de comparações genéticas entre estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (LAGUERRE *et al.*, 2001). Para a caracterização da variabilidade das espécies existem muitas variações da técnica de PCR, que gera perfis diferenciados, e facilita o estudo dos isolados (STRALIOTO, 2005).

Algumas das técnicas mais utilizadas são: comparação e sequenciamento dos nucleotídeos dos genes, em especial, o gene 16S rDNA, considerado conservado nas bactérias, mas que contém variações significativas dentro do gene, capaz de mostrar relações filogenéticas entre espécies (WILLEMS, 2007).

A técnica de Rep-PCR amplifica regiões altamente conservadas e repetitivas no genoma bacteriano (CHAPAVAL et al., 2010), com as variações Rep-PCR REP (repetitive extragenic palindromic. Sequências repetitivas extragênicas palindrômicas) Rep-PCR ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus Sequências repetitivas intergênicas consenso) e Rep-PCR BOX (enterobacterial repetitive sequences. Sequências repetitivas de enterobactérias) amplificam regiões altamente conservadas e repetitivas (CHAPAVAL et al., 2010) e permitem a diferenciação das estirpes estudadas (TONON, 2008; STROSCHEIN et al, 2010). Alguns trabalhos que estudaram a variabilidade dos rizóbios usando técnicas de biologia molecular foram descritos por GRANGE & HUNGRIA (2004) e GIONGO (2007) que utilizaram a amplificação e sequenciamento do rDNA 16S e Rep-PCR ERIC; e STROSCHEIN et al. (2010) utilizou Rep-PCR BOX para a caracterização de seus isolados bacterianos.

2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BACANAMWO M.; HARPER J. E. The feedback mechanism of nitrate inhibition of nitrogenase activity in soybean may involve asparagines and/or products of its metabolism. **Physiologia Plantarum**, Helsinki, v. 100, p. 371-377. 1997.

BARAIBAR, A. et al. Symbiotic effectiveness and ecological characterization of indigenous *Rhizobium loti* populations in Uruguay. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 6, p. 1011-1017, jun. 1999.

BRONDANE, M. A. A. S. **Utilização de marcadores fonológicos para utilização de alfafa precoce com aptidão ao pastejo e fixação biológica de nitrogênio**. 2009. 230 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Zootecnia. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

CARROLL B. J.; MATHEWS, A. Nitrate inhibition of nodulation in legumes. In: GRESSHOFF, P. M. **Molecular biology of symbiotic nitrogen fixation**. Califórnia: Crc Press, 1990. p. 159-180.

CHAPAVAL, L. et al. Detecção de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* pela técnica de Rep-PCR no monitoramento da qualidade do leite de cabra em sala de ordenha. **Comunicata Scientiae**, Bom Jesus, v. 1, n. 1, p. 49-56, 2010.

CHUEIRE, L. M. O. et al. Identificação das estirpes de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* utilizadas em inoculantes comerciais para as culturas da soja e do feijoeiro pela técnica de PCR com “primers” aleatórios ou específicos. **Agricultura Tropical**, Cuiabá, v. 4, p. 80-95, 2000.

LAJUDIE, P. et al. Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium sahari* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Amsterdam, v. 44, n. 4, p. 715-733, 1994.

FREIRE, J. R. J. Fixação do nitrogênio pela simbiose rizóbio/leguminosas. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. (Ed.). **Microbiologia do Solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. Cap. 9. p. 121-140.

GAGE, D. J. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing, rhizobia during nodulation of temperate legumes. **Microbiology and Molecular Biology Review**, Washington, v. 68, p. 280–300, 2005.

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

GORDON A. J. et al. Short-term metabolic response of soybean root nodules to nitrate. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 423-428. 2002.

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

GUERTS, R.; FEDOROVA, E.; BISSELING, T. Nod factor signalling genes and their function in the early stages of Rhizobium infection. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 8, n. 4, p. 346-352. 2005.

HADADD, C. M.; CASTRO, F. G. G. Sistemas de produção. In: SIMPÓSIO SOBRE O MANEJO DA PASTAGEM, 16., 1999, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1999. p. 7-22.

HAMEED, S. et al. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Agrobacterium* strain isolated from cultivated legumes. **Biology Fertility Soils**, Berlin, v. 39, p. 179-185, 2004.

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 Amazônica**, Manaus, v. 34, n. 3, p. 343-357. 2004.

HUNGRIA, M. et al. Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brazil. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v. 33, p.1349-1361. 2001.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brasil. **Field Crops Research**, Saint Paul, v. 65, n. 1, p. 151-164, 2000.

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

KEYSER, H. H.; VAN BERKUM, P.; WEBER, D. F. A comparative study of the physiology of symbiosis formed by *Rhizobium japonicum* with *Glycine max*, *Vigna unguiculata*, and *Macroptilium atropurpureum*. **Plant Physiology**, Washington, v. 70, n. 1, p. 1626-1630, 1982.

KHALID, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z. A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal Applied Microbiology**, Malden, v. 96, p. 473-480, 2004.

LABANDERA, C. **Metodologias aplicadas a la evaluación de Rhizobios para inoculantes para leguminosas forrajeras em Uruguay**. Montevideo: Departamento de Microbiologia de Suelos, 2004.

LAGUERRE G. et al. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. **Microbiology**, Washington, v. 147, p. 981-993, 2001.

LAL, R. The role of no-till farming in sustainable agriculture in tropics. In: ENCONTRO LATINOAMERICANO SOBRE PLANTIO DIRETO NA PEQUENA PROPRIEDADE, 1., 1993, Ponta Grossa. **Anais...** Ponta Grossa: IAPAR, 1993. p. 62.

MENNA P. et al. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 29, p. 315-332, 2006.

MOREIRA, F. M. M.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2006. 726 p.

NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, G. Ecologia de Bactérias Diazotróficas de Solos Tropicais. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, 1998. p. 15-60.

NUERNBERG, N. J.; MILAN, N. A.; SILVEIRA, C. A. M. **Manual de produção de alfafa**. Florianópolis: Empresa de Pesquisa Agropecuária E Difusão De Tecnologia de Santa Catarina, 1992. 102 p.

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

PETERSON, P. R.; SHEAFFER, C. C. **Drought Effects on Perennial Forage Legume Yield and Quality**. **Agronomy Journal, Madison**, v. 84, p. 777 – 779. 1992.

PRESTES, N. E.; JACQUES, A. V. A. Sobressemeadura do Cornichão (*Lotus corniculatus* L.) cv. São Gabriel em pastagem natural – diferimento e adubação. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 1, n. 2, p. 73-81, 2002.

RACCA, R. et al. Alfalfa symbiotic dinitrogen fixation in the Argentine Pampean Region. In: NORTH AMERICAN ALFALFA IMPROVEMENT CONFERENCE, 36., Bozeman, Montana, 1998. **Proceedings...** Bozeman, Montana, 1998. p. 71.

RASSINI, J. B. et al. **A alfafa (*Medicago sativa* L)**. Disponível em: <www.cnpqgl.embrapa.br/pastprodltextos/folha13.html>. Acesso em: 9 dez. 2010.

RIVAS, R. et al. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) druce. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 11, p. 5217–5222, 2002.

SCHOLLA, M. H.; ELKAN, G. H. *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Amsterdam, v. 34, n. 3, p. 484-486, 1984.

SIKORA, S.; REDZEPOVIC, S. Genotypic characterisation of indigenous soybean rhizobia by PCR-RFLP of 16S rDNA, rep-PCR and RAPD analysis. **Food Technology Biotechnology**, Zagreb, v. 41, n. 1, p. 61-67. 2003.

SOSTER, M. T. B. et al. Caracterização agronômica de genótipos de cornichão (*Lotus corniculatus* L.) **Revista Brasileira Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n.6, p. 1662-1671, 2004.

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

STREETER, J. G. Inhibition of legume nodule formation and N₂-fixation by nitrate. **Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v. 7, p. 1-23. 1988.

STROSCHEIN, M. R. et al. Symbiotic efficiency and genetic characteristics of *Bradyrhizobium* sp. strain UFSM LA 1.3 isolated from *Lupinus albus* (H. et Arn). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 67, n. 6, p. 702-706. 2010.

THOMAS, R. J. Role of legumes in providing N for sustainable tropical pasture systems. **Plant and Soil**, London, v. 174, p. 103-118. 1995.

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

TRUJILLO; M. E. et al. Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobacytrum lupini* sp. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 3, p. 1318-1327, 2005.

VAN BERKUM, P.; EARDLY, B. D. The aquatic budding bacteria *Blastobacter denitricans* is a nitrogen fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 29, n. 3, p. 207-215, 2002.

VANDAMME, P. et al. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, Washington, v. 25, n. 4, p. 507-512, 2002.

VARGAS, L. K. et al. Occurrence of plant growth-promoting traits in clover-nodulating rhizobia strains isolated from different soils in Rio Grande do Sul state. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, p. 1227-1235, 2009.

VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. **Biologia dos solos dos cerrado**. Planaltina: EMBRAPACAPAC, 1997. 524 p.

VESSEY J. K.; WATERER, J. In search of the mechanism of nitrate inhibition of nitrogenase activity in legume nodules: recent developments. **Physiologia Plantarum**, Helsinki, v. 84, p. 171-176, 1992.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 255, p. 571-586, 2003.

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

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

WILLEMS A. The taxonomy of rhizobia: an overview. In: VELAZQUEZ, E; BARRUECO, C. (Ed.) **First international meeting on microbial phosphate solubilization**. Berlin: Springer, 2007. p. 314

YOUNG, J. M. The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al. 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination '*Sinorhizobium adhaerens*' (Casida 1982) Willems et al. 2003 legitimate? Request for an Opinion. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, California, v. 53, n. 6, 2107-2110, 2003.

ZAHARAN, H. H. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. **Microbiology and molecular biology reviews**, New York, v. 63, n. 9, p. 968-989, 1999.

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

ZHU, Y. P. Inoculation and nitrogen affect herbage and symbiotic properties of annual *Medicago* species. **Agronomy Journal**, Madison, v. 90, p. 781-786, 1998.

CAPÍTULO II

CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE NÓDULOS DE ALFAFA DE DIFERENTES REGIÕES DO RIO GRANDE DO SUL

3.1 INTRODUÇÃO

O Rio Grande do Sul é uma região tradicional do cultivo de alfafa, sendo o primeiro estado brasileiro a ser implantada essa cultura (MOREIRA et al., 2007). Devido à capacidade de adaptação a diferentes condições climáticas, a alfafa é utilizada em diversas regiões do estado do Rio Grande do Sul, principalmente em áreas de produção de leite (MOREIRA et al., 2007). Associado ao alto valor nutricional que esta leguminosa possui, também apresenta a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico quando em simbiose com rizóbios, sendo observados valores variando entre 120 a 250 kg.ha⁻¹.ano⁻¹ nos Estados Unidos (ZHU et al., 1996) e até 650 kg.ha⁻¹.ano⁻¹ em pastagens na Argentina (RACCA et al., 1998). A espécie *M. sativa* estabelece associações efetivas com isolados das espécies *Sinorhizobium meliloti* e *S. medicae* (de LAJUDIE et al., 1994). No entanto, no Brasil existe uma carência de trabalhos visando selecionar e caracterizar estirpes de rizóbio em alfafa que sejam competitivas, tendo alta capacidade de nodular as raízes e fixar nitrogênio.

O princípio básico que deve orientar a seleção de estirpes de rizóbio com propósito da prática de inoculação em leguminosas tem sido objeto de muitos estudos (HARA & OLIVEIRA, 2005; ZAMAN-ALLAH et al., 2007). A seleção deve objetivar estirpes eficientes e adaptadas às condições prevalentes no local de emprego, como os solos ácidos ou ao acúmulo de matéria orgânica encontrado nos sistemas de pastagens no Rio Grande do Sul. Além disso, devem ser competitivas frente à população nativa e apresentarem vários aspectos agronômicos e culturais, tais como potencial de nodulação, fixação de N₂ e crescimento da planta hospedeira (LIMA et al., 2005; ZILLI et al., 2006), além das características fisiológicas como a capacidade de solubilização de fosfatos, produção de melanina e de fitohormônios como ácido indol-acético (THAKURIA et al., 2004). Contudo, a avaliação das características culturais é o primeiro passo da caracterização e identificação de micro-

organismos, sendo que essas características podem indicar diferenças morfológicas e fisiológicas importantes entre micro-organismos, que podem ser detectadas posteriormente mediante estudos mais avançados. Dessa maneira, objetivou-se isolar e caracterizar rizóbios obtidos de nódulos de alfafa quanto às características genéticas e fenotípicas.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Coleta de solo

As amostras de solo foram coletadas em 13 localidades do Rio Grande do Sul, abrangendo as principais regiões do estado, com vistas à obtenção do maior número possível de isolados de rizóbios autóctones capazes de nodular *M. sativa*. Procurou-se realizar a coleta em áreas de pastagens cultivadas com *M. sativa*. Quando isto não foi possível, realizou-se a coleta de solo adjacente de outras leguminosas forrageiras nativas, na tentativa de se obter rizóbios que pudessem estar vivendo na rizosfera destas leguminosas. Os pontos de coleta de solo foram georreferenciados (Anexo I) e as amostras enviadas ao Laboratório de Análise de Solo da Faculdade de Agronomia da UFRGS para determinação das características químicas (Tabela 3.1). Dados do relevo, vegetação e histórico dos locais de coleta também foram coletados.

TABELA 3.1. Análise das características químicas das amostras de solo das diferentes regiões do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2011.

Local de coleta	Tipo de solo	Argila %	pH Água H ₂ O	MO %	P -- mg dm ⁻³ .-	K
Erechim	Latossolo	42	6,6	3,8	100	203
Passo Fundo	Latossolo	52	5,2	2,8	23	347
Santa Rosa	Latossolo	56	5,9	4,3	5	60
Roque Gonzales	Latossolo	60	6,1	3,6	5	45
São Luiz Gonzaga	Latossolo	60	6,0	3,0	12	83
Bom Jesus	Cambissolo	60	5,3	6,5	15	192
Caxias do Sul	Cambissolo	24	6,6	3,7	100	249
Santa Maria	Argissolo	22	5,7	2,1	3	103
Nova Petrópolis	Chernossolo	43	6,3	3,5	40	299
Canguçu	Argissolo	13	4,6	2,1	3	89
Dom Pedrito	Gleissolo	22	5,6	3,4	18	112

3.2.2 Obtenção dos isolados

A obtenção dos nódulos a partir de amostras de solo foi feita pelo cultivo de plântulas de alfafa, cujas sementes foram previamente desinfestadas e pré-germinadas em estufa a 28°C por 24 horas, em vasos contendo uma mistura de vermiculita e areia (2:1), esterilizada em autoclave. Após 7 dias, uma suspensão contendo 10 g de solo misturado a 90 mL de água foi usado como fonte de inóculo para as plantas de alfafa. As plantas foram cultivadas por 40 dias, e durante esse período foi realizada a irrigação com 100 mL de solução nutritiva isenta de nitrogênio, a cada 3 dias (Sarruge, 1975).

Em laboratório, os nódulos radiculares foram destacados e desinfestados por lavagens sucessivas com etanol (70%) por 45s, seguido de hipoclorito (1%) por 30s e, cinco lavagens com água destilada e esterilizada. Em seguida, cada nódulo foi macerado com uma pinça estéril em tubos de microcentrífuga contendo 100 µL de água destilada e esterilizada, a suspensão obtida foi inoculada pela técnica de esgotamento por estrias em placas de Petry contendo o meio ágar Levedura Manitol (LM) (Vincent, 1970) com Vermelho Congo (25 mg/L) e incubadas em estufa a 28°C até o aparecimento de crescimento bacteriano. Os rizóbios obtidos foram purificados utilizando-se a técnica de esgotamento de inóculo por estriamento em placas de Petry com meio ágar LM, até a obtenção de colônias isoladas, homogêneas e com características persistentes. As colônias obtidas foram preservadas em tubos de dois mL contendo glicerol 50% e mantidos em ultra freezer a 80°C.

Para a certificação dos isolados obtidos, estes foram inoculados em plântulas de alfafa crescidas em tubos de ensaio contendo solução nutritiva (Sarruge, 1975) isenta de nitrogênio. Os tubos foram mantidos em lampadário com 12 horas diárias de luz. A avaliação visual da nodulação foi realizada ao longo de 45 dias, sendo descartados os isolados que não formaram nódulos nesse período. As estirpes de *Sinorhizobium meliloti* SEMIA 116, 134 e 135, fornecidas pelo Centro de Fixação Biológica de Nitrogênio da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, RS, Brasil, foram usadas como estirpes-referência para a seleção de rizóbios em alfafa.

3.2.3 Caracterização morfológica dos rizóbios

A avaliação do diâmetro médio das colônias, da modificação do pH do meio foi realizada em meio LMA com azul de bromotimol. E a produção de goma, coloração das colônias e o tempo de crescimento das colônias foram avaliados mediante a inoculação das estirpes em meio LMA (VINCENT, 1970) e incubação a 28 °C por 10 dias.

3.2.4 Resistência dos rizóbios à acidez

A resistência dos rizóbios à acidez (pH 4,2) foi avaliada pela quantificação do crescimento em meio líquido utilizando-se o meio mínimo de WOOD & COOPER (1985) modificado (meio MWC) (SÁ, 2001). A composição do meio foi modificada substituindo-se a fonte de Fe na forma de Fe-EDTA por FeCl₃. O crescimento dos rizóbios foi avaliado a pH 4,2 e pH 6,8. O inóculo foi preparado com culturas crescidas em meio líquido triptona levedura (SOMASEGARAN & HOBEN, 1994), em agitador orbital por sete dias a 28 °C. Ao final deste período, uma alíquota de 200 µL foi retirada de cada frasco e o número de células foi contado em uma câmara de Neubauer em um microscópio óptico (Olympus – CX31) e os inóculos foram padronizados por diluição para a concentração de 1×10^4 cel./mL.

As culturas foram inoculadas em frascos contendo 5 mL meio MWC líquido, previamente esterilizados em autoclave a 120 °C por quinze min., e incubadas com agitação orbital constante de 100 rpm por sete dias a 28 °C. Após, determinou-se o número de células viáveis usando-se o método de diluição sucessiva e inoculação em placas com meio LMA com vermelho congo com o método de gotas. A contagem do número de colônias formadas foi realizada após 4 dias de incubação em estufa a 28 °C. Foram realizadas três repetições por tratamento e considerados como resistentes à acidez as culturas dos rizóbios que apresentaram número de células viáveis, no mínimo, mil vezes maior do que o inóculo.

3.2.5 Resistência dos rizóbios a alumínio tóxico

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

3.2.6 Produção de melanina

A produção de melanina foi avaliada conforme metodologia proposta por CUBO et al. (1988). Os isolados foram inoculados em frascos contendo meio TY (SOMASEGARAN & HOBEN, 1994), incubados a 28°C , sob agitação constante a 120 rpm, durante 48 horas. Após, foram inoculados em placas de Petri contendo meio TY sólido, acrescido de L-tirosina ($600\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) e sulfato de cobre ($40\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), e incubados a 28°C , durante quatro dias. Em seguida, as colônias receberam tratamento com $50\mu\text{L}$ de SDS (dodecil sulfato de sódio) 10%. Como controle negativo foi utilizada a estirpe padrão CIAT 899, conhecida como não produtora de melanina (CUBO et al., 1988; GAO & BORTHAKUR, 1995) e como padrão positivo, os isolados UFRGS Lg 111 e Lg 121, rizóbios isolados de *Lotus glaber* (FONTOURA, 2007).

3.2.7 Solubilização de fosfatos

A capacidade de solubilização de fosfato foi determinada em placas de Petri contendo meio LMA (Vincent, 1970), sem a adição do K_2HPO_4 e suplementado com 0,1% de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Para a inoculação, os isolados foram crescidos em meio LM e mantidos em agitação constante a 120 rpm, por 24

horas a 28°C. A inoculação nos meios de cultura foi por gotas de 20µL, com três repetições por isolado.

As placas foram incubadas em estufa a 28°C por sete dias. Após este período a formação de um halo transparente indicou a solubilização do fosfato pelo isolado. Foram determinados os diâmetros das colônias e dos halos formados para estimar o índice de solubilização de fosfato (ISF) pelos rizóbios, de acordo com a equação abaixo.

$$\text{ISF (\%)} = (\text{Ø colônia} / \text{Ø halo}) \times 100$$

ISF(%): Índice de Solubilização de Fosfato;

Ø colônia: Diâmetro de colônia;

Ø halo: Diâmetro do halo formado.

3.2.8 Produção de ácido indol acético

A produção de ácido indol-acético pelos rizóbios foi avaliada usando-se a metodologia proposta por ASGHAR et al. (2002). Os micro-organismos foram crescidos em caldo levedura manitol (LM) (SOMASEGARAN & HOBEN, 1994), suplementado com 50 mg.L⁻¹ de triptofano. Depois de 48 h, as culturas de bactérias foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 min. Uma alíquota de 60 µL do sobrenadante foi colocada em microplacas de poliestireno para reagirem com 40 µL da solução de Salkowski. A mistura foi mantida no escuro por 30 min. s a temperatura ambiente. As amostras que apresentaram coloração rosa foram consideradas como resultado positivo e classificadas de acordo com a Figura 3.1, em função da coloração rosa obtida pela oxidação dos compostos indólicos pelos sais de ferro (ASGHAR et al., 2002).

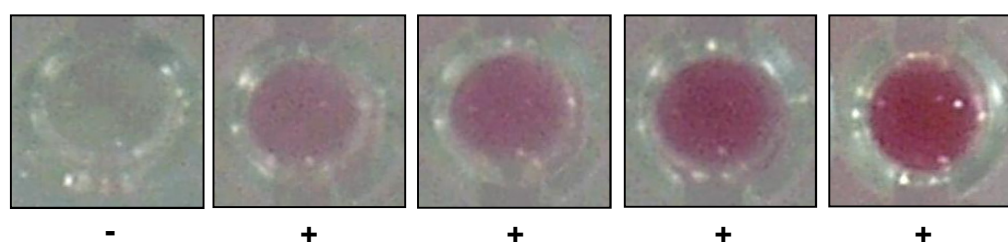


FIGURA 3.1. Produção de ácido indol-acético por rizóbios isolados de alfafa em poços de microplacas de poliestireno. Porto Alegre, 2011.

3.2.9 Caracterização genética dos rizóbios estudados.

Para a caracterização genética dos rizóbios isolados de alfafa, o DNA total das bactérias foi extraído usando o Wizard kit (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. A reação de rep-PCR foi realizada usando-se o oligonucleotídeo iniciador BOX A1 [5' CTACGGCAAGGCGACGCTGACG 3' (VERSALOVIC et al., 1994)] e os oligonucleotídeos ERIC1-R (ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC) e ERIC-2R (AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG) (BRUIJN, 1992). Para a reação de PCR utilizou-se um volume de 25- μ l, contendo 50 ng de amostra de DNA, 1 U Taq DNA polimerase, 1 X tampão de Taq DNA polimerase, 15 mM MgCl₂, 200 mM dNTPs e 10 pmoles de cada oligonucleotídeo. A reação foi realizada num total de 37 ciclos, como segue: um ciclo inicial de desnaturação em 95°C por 7 min. 35 ciclos de desnaturação em 94°C por 1 min. , anelamento em 53°C por 1 min. , e extensão em 65°C por 8 min. e um ciclo final da extensão em 65°C por 16 min.

As reações foram realizadas em um termociclador (TECHNE TC – 512) e os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em cuba horizontal com tampão de TBE 0,5X (SAMBROOK et al., 2001). Como padrão de peso molecular foi utilizado o DNA do fago lambda clivado com as endonucleases de restrição EcoRI e HindIII. As amostras foram coradas com Blue Green (LGC Biotecnologia) e visualizadas sob luz ultravioleta e documentadas com equipamento de fotografia digital Kodak G2200. As bandas foram analisadas pelo programa Gelpro-3.2 (Media Cybernetics). O perfil de bandas no gel de agarose de BOX-PCR e de ERIC-PCR foi transformado em uma matriz binária bidimensional, onde 0 indica a ausência da banda e 1 a presença. O agrupamento foi realizado pelo programa PAST 1.69 (Palaeontological Statistics), usando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with arithmetic mean) e o coeficiente de Jaccard.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Isolamento de rizóbios simbiotes em alfafa

Foram obtidos rizóbios isolados a partir de nódulos de *Medicago sativa* em amostras de solos de 10 localidades do Estado do Rio Grande do Sul. Foram obtidos 143 isolados de rizóbios autóctones. Após o teste de autenticação dos isolados, 116 bactérias apresentaram a capacidade de formar nódulos em *M. sativa*, sendo que em 105 observou-se a coloração avermelhada nos nódulos, indicando a produção de leghemoglobina e a capacidade de fixação biológica de nitrogênio (Tabela 3.2).

TABELA 3.2. Número de isolados de rizóbios obtidos de nódulos de plantas de *Medicago sativa* inoculadas com amostras de solos de diferentes localidades do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2011.

Local de coleta	Numero de Isolados	Cobertura Vegetal
Santa Rosa	21	Alfafa
Erechim	15	Alfafa
Roque Gonzales	15	Alfafa
Bom Jesus	11	Campo Nativo
Caxias do Sul	8	Alfafa
Passo Fundo	7	Campo Nativo
São Luiz Gonzaga	7	Alfafa
Dom Pedrito	7	Campo Nativo
Santa Maria	7	Campo Nativo
Nova Petrópolis	7	Alfafa

Deve-se salientar que cerca de 70% dos isolados foram obtidos de amostras de solos de áreas com cultivo de alfafa (Tabela 3.2). No entanto, 30% dos isolados de rizóbios capazes de nodular alfafa foram obtidos de amostras de áreas de campo nativo, sem histórico de cultivo anterior (Tabela 3.2). Entretanto, este fato não invalida trabalhos de seleção de estirpes mais eficientes a partir de população de rizóbios já adaptadas às condições destes solos com o cultivo de alfafa, o que torna possível encontrar populações de rizóbios distintos dos introduzidos em áreas com prévio histórico de cultura de leguminosa (GIONGO et al., 2007).

3.3.2 Morfologia de colônia e alteração do pH do meio de cultura

A caracterização da morfologia colonial e da reação em meio de cultura possibilitou a formação de 10 grupos fenotípicos, os quais apresentaram como característica comum a formação de colônias gomosas com crescimento rápido e produtoras de ácidos em meio de cultura. As características de coloração de colônia variaram entre rosada e branca, sendo as rosadas translúcidas e as brancas opacas. Com relação ao tamanho de colônia, os isolados apresentaram colônias com variação de diâmetro de 2 a 8 mm, predominando as com diâmetro entre 3 a 5 mm (48%) e acima de 5 mm (35%). Estas características estão associadas aos gêneros de *Sinorhizobium* (WANG et al.; 2002) e *Rhizobium* (de LAJUDIE et al.; 1994; TAN et al.; 2001), podendo ser encontradas também em isolados de *Mesorhizobium loti* (JARVIS et al.; 1997), desta forma torna-se necessário um estudo filogenético mais aprofundado para identificar os micro-organismos isolados.

3.3.3 Seleção de rizóbios promotores de crescimento.

Os isolados de rizóbio foram avaliados em relação à produção de ácido indol-acético e solubilização de fosfato (Tabela 3.5). Encontraram-se isolados com reações positivas para estas duas características, confirmando o potencial destes micro-organismos como promotores de crescimento de plantas. Em quase todas as amostras de solo foram encontrados micro-

organismos com essas características de promoção de crescimento, com exceção das coletadas em Dom Pedrito, onde foram observados apenas isolados produtores de ácido indol-acético. Neste estudo observou-se que 89% e 73% das bactérias eram rizóbio produtores de ácido indol-acético e/ou solubilizadores fosfato, respectivamente.

TABELA 3.3. Número de isolados obtidos nos locais de coleta formadores de melanina, solubilização de fosfato (SF) e produtores de auxinas por isolados de rizóbio de alfafa. Porto Alegre, 2011.

Local de coleta	Melanina	SF	Auxinas
	Isolados	Isolados	Isolados
Erechim	3	15	13
Passo Fundo	0	7	7
Santa Rosa	16	15	18
Roque Gonzales	7	13	9
São Luiz Gonzaga	1	3	6
Bom Jesus	10	11	9
Dom Pedrito	0	0	5
Santa Maria	1	6	6
Caxias do Sul	5	4	7
Nova Petrópolis	0	4	4
Isolados (%)	40	73	89

A avaliação destes resultados sugere que para este grupo de micro-organismos a capacidade de produzir ácido-indol acético e de solubilizar fosfato é comum (RODRIGUEZ & FRAGA 1999). Estes dados colaboram com os encontrados por ANTOUN et al. (1998), que trabalhando com um número similar de isolados de rizóbios, verificaram que 58% dos isolados foram produtores de ácido indol-acético e 54% eram solubilizadores de fosfato. VARGAS et al. (2009) estudando uma população de rizóbios isolados de *Trifolium repens* e *T. vesiculosum*, encontrou um predomínio de rizóbios solubilizadores de fosfato e uma baixa frequência de bactérias produtoras de auxina.

3.3.4 Produção de melanina

Além das características de morfologia colonial e alteração do pH do meio de cultura, os isolados foram caracterizados quanto à produção de melanina. Dentre os 105 isolados de rizóbio estudados, 41% das bactérias e a estirpe SEMIA 116 foram capazes de produzir melanina em placas com meio TY suplementado com L-tirosina e CuSO_4 (Tabela 3.4). A produção de melanina é uma característica que vem sendo descrita no grupo rizóbio e observada no isolamento de rizóbios de alfafa, como encontrado por DEL PAPA et al. (1999), que relata a presença de 62% de rizóbios com esta característica. HUNGRIA et al. (2001) observou que 53% dos rizóbios isolados de nódulos de soja tinham a capacidade de produzir melanina em meio de cultura. O maior número de isolados de rizóbios produtores de melanina foi encontrado nas amostras de solo de Bom Jesus e Santa Rosa, com 91% e 76% dos rizóbios isolados, respectivamente, apresentaram esta característica (Tabela 3.4).

3.3.5 Resistência dos rizóbios a pH 4,2 e a alumínio tóxico

Além da avaliação da resistência ao estresse salino e antibióticos, foi avaliada a resistência dos isolados a pH 4,2 e a alumínio tóxico. Entre os 52 isolados de *Medicago sativa* estudados, 5 deles (UFRGS Ms52, UFRGS Ms67, UFRGS Ms92, UFRGS Ms98, UFRGS Ms204) foram resistentes a pH 4,2 em meio de cultura. Dois desses cinco isolados (UFRGS Ms67 e UFRGS Ms92) foram também resistentes à concentração de 50 μM de alumínio em meio de cultura, produzindo populações, ao final do período de incubação de sete dias, da ordem de 10^7 UFC.mL⁻¹ (Tabela 3.5). Os outros 47 isolados estudados mostraram-se sensíveis a pH 4,2. Estes resultados estão de acordo com os observados por DEL PAPA et al. (1999) em estudo com 466 isolados de alfafa, onde apenas 15 foram resistentes a um baixo pH. Um baixo número de rizóbios tolerantes a baixo pH e presença de alumínio foi descritos por DEL PAPA et. al (1999) e LANGER et. al (2008). No entanto, rizóbios isolados de alfafa resistentes vem sendo encontrados (SEGUNDO et. al, 1999) e interações tolerantes entre rizóbios e alfafa às condições ácidas vem sendo observadas (LANGER et al., 2008).

Das estirpes utilizadas como padrão, a SEMIA 116 e SEMIA 134 não foram resistentes ao baixo pH bem como a presença de alumínio tóxico. A estirpe de *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 (CIAT 899), utilizada como padrão, se mostrou resistente tanto ao pH ácido como ao alumínio tóxico. Resultado semelhante foi obtido por SÁ (2001), no estudo de isolados de feijoeiros em solos ácidos da região de Cunha (SP), em que observou que a SEMIA 4077 apresenta resistência à acidez e ao alumínio. RICCILLO et al. (2000), também, relataram que em seus estudos a estirpe de *R. tropici* tolera baixo pH e alumínio tóxico.

Tabela 3.4. Crescimento de rizóbios de alfafa em meio com pH 4,2 e com 50 μM de alumínio tóxico incubadas em meio MWC modificado. Número de células do inoculo inicial (1×10^4) Porto Alegre, 2011.

Rizóbios	Tratamentos		
	pH 6.8	pH 4.2	pH 4,2+Al ⁺³
Estirpes		----UFC.mL ⁻¹ ----	
SEMIA 477	$2,30.10^7$	$2,10.10^7$	$2,70.10^7$
SEMIA 116	$1,85.10^7$	$3,06.10^6$	$2,00.10^6$
SEMIA 134	$2,62.10^7$	$8,46.10^5$	$9,00.10^5$
Isolados			
UFRGS Ms23	$2,25.10^7$	$7,69.10^5$	$2,16.10^5$
UFRGS Ms24	$1,84.10^7$	$4,77.10^5$	$1,77.10^4$
UFRGS Ms25	$2,81.10^7$	$2,00.10^6$	$3,31.10^6$
UFRGS Ms34	$3,92.10^7$	$1,77.10^5$	$9,77.10^4$
UFRGS Ms52	$2,42.10^7$	$2,15.10^7$	$5,77.10^6$
UFRGS Ms55	$2,56.10^7$	$2,85.10^6$	$2,31.10^6$
UFRGS Ms56	$2,68.10^7$	$2,69.10^6$	$1,77.10^5$
UFRGS Ms59	$2,84.10^7$	$2,77.10^6$	$1,23.10^6$
UFRGS Ms510	$2,48.10^7$	$4,92.10^5$	$6,46.10^4$
UFRGS Ms511	$2,41.10^7$	$1,38.10^6$	$1,31.10^6$
UFRGS Ms512	$3,05.10^7$	$3,08.10^5$	$2,08.10^5$
UFRGS Ms513	$2,90.10^7$	$1,23.10^5$	$3,08.10^4$
UFRGS Ms515	$1,86.10^7$	$5,62.10^6$	$9,23.10^5$
UFRGS Ms518	$3,52.10^7$	$5,38.10^5$	$3,23.10^4$
UFRGS Ms519	$2,32.10^7$	$7,66.10^5$	$3,85.10^5$
UFRGS Ms521	$2,17.10^7$	$2,31.10^6$	$1,08.10^6$
UFRGS Ms62	$2,40.10^7$	$1,08.10^6$	$7,62.10^4$
UFRGS Ms63	$2,47.10^7$	$7,92.10^6$	$4,46.10^4$
UFRGS Ms64	$2,66.10^7$	$1,54.10^6$	$4,62.10^5$
UFRGS Ms67	$3,54.10^7$	$2,78.10^7$	$1,25.10^7$

Tabela 3.4 – Continuação.

Rizóbios	pH 6.8	Tratamentos pH 4.2	pH 4,2+Al ⁺³
Isolados		----UFC.mL ⁻¹ ----	
UFRGS Ms68	2,36.10 ⁷	3,85.10 ⁵	3,08.10 ⁵
UFRGS Ms69	2,35.10 ⁷	1,08.10 ⁶	8,46.10 ⁵
UFRGS Ms610	2,36.10 ⁷	1,23.10 ⁶	1,31.10 ⁵
UFRGS Ms73	3,02.10 ⁷	1,46.10 ⁶	3,85.10 ⁵
UFRGS Ms76	2,28.10 ⁷	7,54.10 ⁶	4,15.10 ⁶
UFRGS Ms77	4,06.10 ⁷	2,00.10 ⁵	4,62.10 ⁵
UFRGS Ms81	2,69.10 ⁷	5,85.10 ⁶	1,31.10 ⁶
UFRGS Ms83	2,74.10 ⁷	4,38.10 ⁶	4,69.10 ⁶
UFRGS Ms86	2,16.10 ⁷	5,85.10 ⁵	6,38.10 ⁵
UFRGS Ms87	2,47.10 ⁷	4,23.10 ⁶	3,31.10 ⁶
UFRGS Ms91	3,24.10 ⁷	1,31.10 ⁶	1,46.10 ⁶
UFRGS Ms92	2,35.10 ⁷	1,54.10 ⁷	1,75.10 ⁷
UFRGS Ms93	2,13.10 ⁷	6,92.10 ⁵	6,15.10 ⁵
UFRGS Ms94	1,98.10 ⁷	3,08.10 ⁵	7,69.10 ⁴
UFRGS Ms96	2,52.10 ⁷	2,46.10 ⁵	6,92.10 ⁵
UFRGS Ms98	2,75.10 ⁷	2,10.10 ⁷	1,15.10 ⁷
UFRGS Ms911	2,17.10 ⁷	3,23.10 ⁶	2,00.10 ⁶
UFRGS Ms121	3,41.10 ⁷	1,08.10 ⁶	2,69.10 ⁶
UFRGS Ms154	2,12.10 ⁷	4,08.10 ⁵	8,62.10 ⁴
UFRGS Ms192	2,12.10 ⁷	5,38.10 ⁵	3,38.10 ⁴
UFRGS Ms193	2,25.10 ⁷	1,38.10 ⁶	2,08.10 ⁶
UFRGS Ms195	3,04.10 ⁷	2,23.10 ⁶	1,00.10 ⁴
UFRGS Ms201	2,16.10 ⁷	3,23.10 ⁶	3,08.10 ⁶
UFRGS Ms202	2,38.10 ⁷	9,65.10 ⁵	9,23.10 ⁵
UFRGS Ms204	2,12.10 ⁷	2,15.10 ⁷	1,23.10 ⁷
UFRGS Ms206	2,48.10 ⁷	2,23.10 ⁶	2,23.10 ⁶
UFRGS Ms209	2,32.10 ⁷	1,54.10 ⁵	1,46.10 ⁶
UFRGS Ms2011	2,66.10 ⁷	1,92.10 ⁶	1,00.10 ⁶
UFRGS Ms2014	1,95.10 ⁷	5,15.10 ⁶	3,85.10 ⁶
UFRGS Ms2012	2,05.10 ⁷	8,46.10 ⁵	6,14.10 ⁴
UFRGS Ms2013	2,00.10 ⁷	9,23.10 ⁵	6,92.10 ⁵

3.3.6 Caracterização genética dos rizóbios isolados de alfafa

Os rizóbios isolados de alfafa produtores de ácido indol-acético foram caracterizados geneticamente pela técnica de rep-PCR com os oligonucleotídeos iniciadores BOX A e ERIC . Foram caracterizados 22 rizóbios isolados de alfafa e 3 estirpes (SEMIA 116, SEMIA 134 e SEMIA 135). O perfil eletroforético dos produtos de amplificação do DNA genômico de dez isolados e uma das estirpes estudadas (Figuras 3.2 e 3.3).

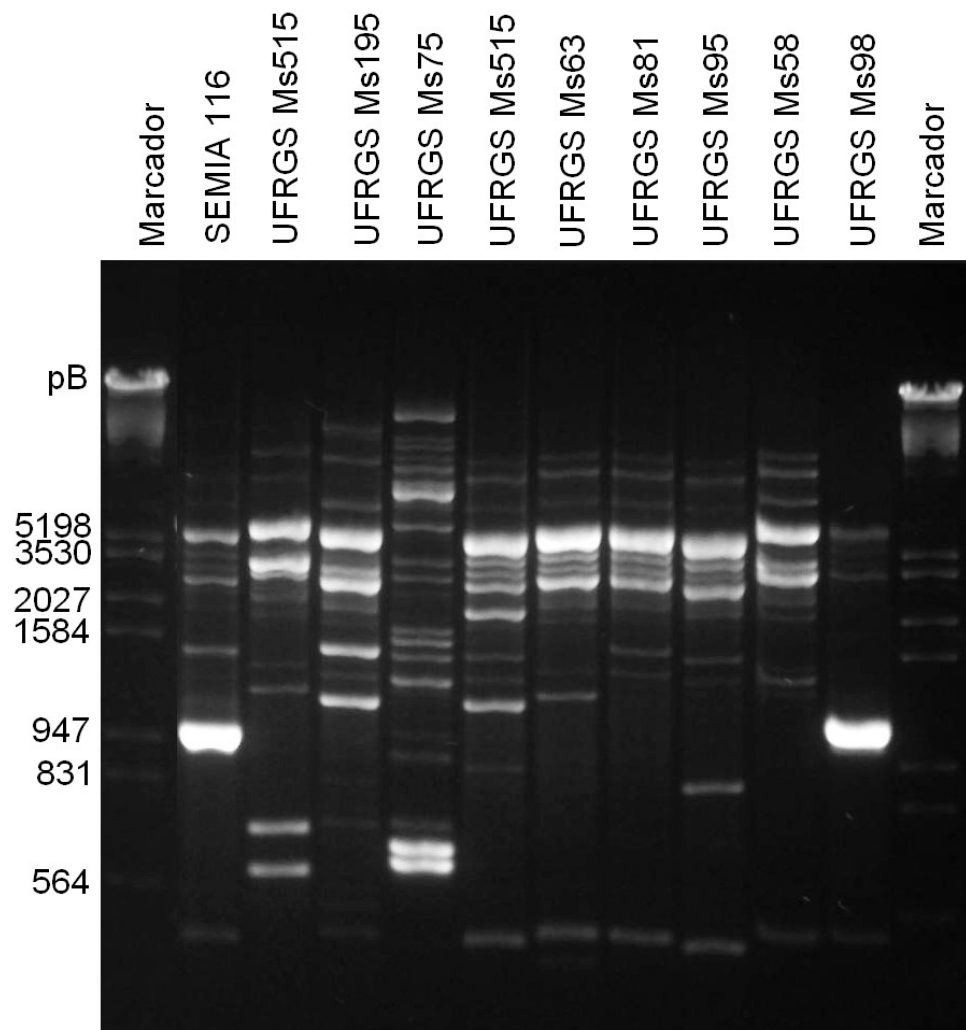


Figura 3.2. Perfil eletroforético em gel de agarose dos fragmentos da amplificação do DNA genômico por Rep PCR BOX de dez isolados de rizóbios estudados neste trabalho e a estirpe SEMIA 116. Porto Alegre, 2011.

O tamanho dos fragmentos de DNA analisados no perfil eletroforético dos produtos de amplificação variou entre 5000 até 500 pares de bases, dependendo do isolado avaliado. Perfis eletroforéticos com semelhante faixa de peso molecular dos fragmentos foram obtidos por FONTOURA (2008) que observaram que a faixa de variação dos produtos de amplificação dos rizóbios simbiotes de plantas de *L. corniculatus*, *L. uliginosus*, *L. glaber* e *L. subbiflorus* ficou entre 5.000 pb a 500 pb. Resultados semelhantes foram obtidos por GRANADA (2010) para rizóbios isolados de *Desmodium incanum*.

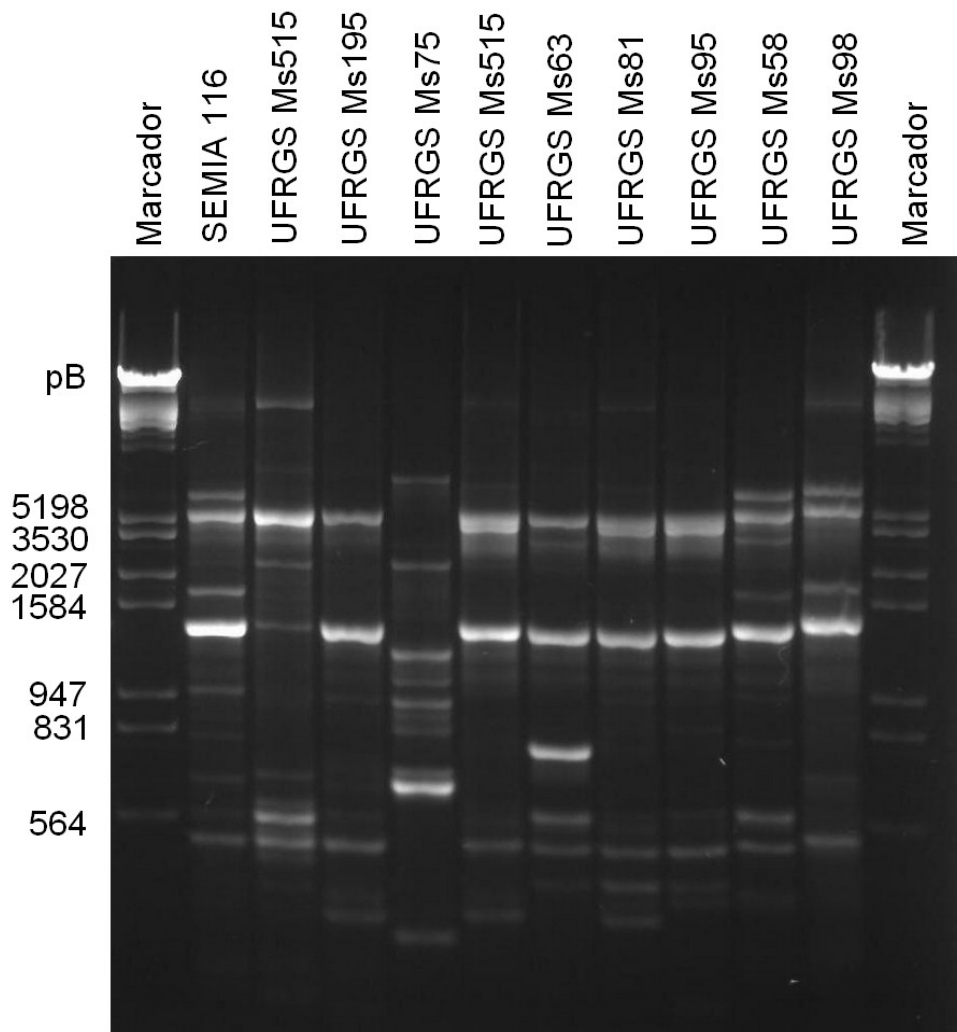


Figura 3.3. Perfil eletroforético em gel de agarose dos fragmentos da amplificação do DNA genômico por Rep PCR ERIC de dez isolados de rizóbios estudados neste trabalho e a estirpe SEMIA 116. Porto Alegre, 2011.

O polimorfismo observado pela análise de rep-PCR, realizado nos isolados testados, possibilitou a elaboração de um dendograma de similaridade genética onde foram formados dois grandes grupos com 58% de similaridade (Figura 3.4). O grupo I foi formado pelos isolados UFRGS Ms72, UFRGS Ms75 e UFRGS Ms55. Neste grupo houve um predomínio de rizóbios produtores de AIA e solubilizadores de fosfato, sendo que somente o isolado UFRGS Ms72 não foi capaz de sintetizar melanina. O grupo II foi formado por dois grupos, A e B, com aproximadamente 65% de similaridade. O grupo B foi formado por 4 isolados, com similaridade de 90% entre os micro-organismos UFRGS Ms204 e Ms2010, e estes dois isolados foram agrupados com Ms515 com 86% de similaridade. O isolado UFRGS Ms195 apresenta um valor de similaridade de 78% a estes isolados (Figura 3.4). No grupo B, todos os isolados produziram AIA e somente o isolado UFRGS Ms210 produziu melanina.

O grupo A se subdividiu em dois subgrupos, A1 e A2 (Figura 3.2). Em A2 foram agrupados os isolados UFRGS Ms32 e UFRGS Ms67 com uma similaridade de aproximadamente 86%. O grupo A1 apresentou dois subgrupos, A1.1 e A.1.2. No grupo A1.1 foram agrupadas as estirpes recomendadas para produção de inoculantes para alfafa (SEMIA 116, SEMIA 134 e SEMIA 135), no entanto nenhum isolado foi obtido com 100 % de similaridade com qualquer das estirpes estudadas, demonstrando que este grupo de micro-organismos isolados é uma potencial fonte para prospecção de novas estirpes de rizóbio mais eficientes (Figura 3.4).

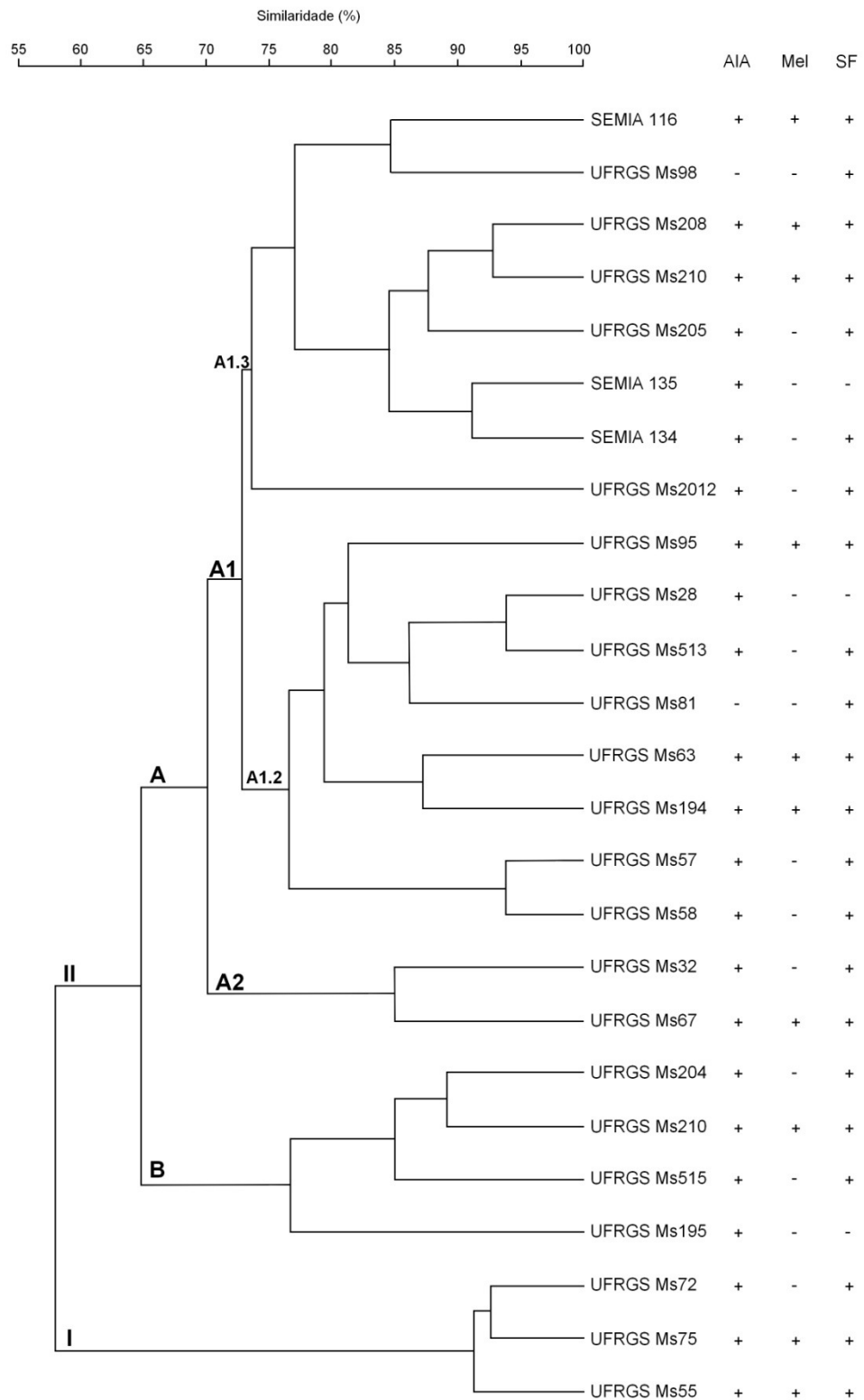


Figura 3.4. Dendrograma de genotipagem de estirpes e isolados de rizóbios para *M. sativa*. Agrupamento obtido por UPGMA, utilizando-se o coeficiente de Jaccard, para perfil de bandas obtido a partir da reação de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores BOX A 1-R + ERIC1-R e ERIC-2. AIA: Ácido Indol-acético; Mel: Melanina; SF: Solubilização de Fosfato. Porto Alegre, 2011.

3.4 CONCLUSÕES

- 1 Cento e cinco isolados de rizóbios de alfafa estão isolados de diferentes regiões do Rio Grande do Sul.
- 2 Os rizóbios isolados quanto às características coloniais, produção de melanina, síntese de ácido indol-acético, solubilização de fosfato, tolerância a pH e teor de alumínio, permite classificá-lo no gênero *Sinorhizobium*.
- 3 Os rizóbios isolados de alfafa apresentam um predomínio de bactérias produtoras de ácido-indol acético e solubilizadores de fosfato.
- 4 A técnica de rep-PCR com os oligonucleotídeos iniciador BOX A1 e ERIC1 e ERIC2 mostrou que existe variabilidade genética entre os isolados.

3.5 REFERÊNCIAS

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

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

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

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

de LAJUDIE, P. et al. Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, n. 4, p. 715-733, 1994.

DEL PAPA, M. F.; BALAGUE, L. J.; SOWINSKI, S. C. Isolation and characterization of alfalfa-nodulating rhizobia present in acidic soils of Central Argentina and Uruguay. **Appl Environ Microbiol**. v. 65, p.1420–1427. 1999.

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

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

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

GRANADA, C. **Seleção de rizóbios e estudo da compatibilidade simbiótica em *Desmodium incanum* e *Lotus* spp.** Dissertação de Mestrado Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Programa de Pósgraduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, 2010.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 40, n. 7, p. 667-672, 2005.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L. M. de O.; COCA, R. G.; MEGÍAS, M. Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soyabean nodules in Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 33, p. 1349-1361. 2001.

JARVIS, B. D. W. et al. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum* and *Rhizobium tianshanense* to *Mesorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 3, p. 895-898, 1997.

LANGER, H.; NANDASENA, K. G.; HOWIESON, J. G.; JORQUERA, M. BORIE, F. Genetic diversity of *Sinorhizobium meliloti* associated with alfalfa in Chilean volcanic soils and their symbiotic effectiveness under acidic conditions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**.v. 24, n. 3, p. 301-308, 2008.

LIMA, A. S.; PEREIRA, J. P. A. R.; MOREIRA, F. M. S. Diversidade fenotípica e eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. de solos da Amazonia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 11, p. 1095-1104, 2005.

MOREIRA, A.; BERNARDI, A. C. C.; RASSINI, J. B.; FERREIRA, R. de P.; OLIVEIRA, P. P. A. **Fertilidade do solo e estado nutricional da alfafa cultivada nos trópicos**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. 40 p. (Embrapa Pecuária Sudeste. Documentos, 67).

RACCA, R.; BASIGALUP, D.; BREZONI, E.; BRUNO, O.; CASTELL, C.; COLLINO, D.; DARDANELLI, J.; DIAZ ZORITA, M.; DUHALDE, J.; GONZALES, N.; HANSEN, W.; HEINS, N.; LAICH, F.; LOPEZ, A.; PERALTA, O.; PERTICARI, A.; QUADRELLI, A.; RIVERO, E.; ROMERO, N.; SERENO, R. Alfalfa symbiotic dinitrogen fixation in the Argentine Pampean Region. In: NORTH AMERICAN ALFALFA IMPROVEMENT CONFERENCE, 36., Bozeman, Montana, 1998. **Proceedings**. Bozeman, Montana, 1998. p.71.

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

RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advantedge**. v. 17, p. 319-339. 1999.

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

SAMBROOK, J. & RUSSEL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2001.

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

TAN, Z. Y. et al. *Rhizobium yanglingense* sp. Nov., isolated from arid and semi-arid regions in China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, v. 51, n. 3, p. 901-914, 2001.

THAKURIA, D.; TALUKDAR, N. C.; GOSWAMI, C.; HAZARIKA, S.; BORO, R. C.; KHAN, M. R. Characterization and screening of bacteria from rhizosphere of rice grown in acidic soils of Assam. **Current Science**, v. 86, n. 7, p. 978-985, 2004.

VARGAS, L. K.; LISBOA, B. B.; SHLINDWEIN, G.; GRANADA, C. E.; GIONGO, A.; BEBEDUZI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Occurrence of plant growth-promoting traits in clover-nodulating rhizobia strains isolated from different soils in Rio Grande do Sul state. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 33, p. 1227-1235, 2009.

VERSALOVIC, J. et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 25-40, 1994.

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

WANG, E. T. et al. *Sinorhizobium morelense* sp. nov., a *Leucaena leucocephala*-associated bacterium that is highly resistant to multiple antibiotics. **International Journal Systematic and Evolutionary Bacteriology**, v. 52, p. 1687-1693, 2002.

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

ZAMAN-ALLAH, M.; SIFI, B.; L`TAIEF, B.; ELAOUNI, M. H.; DREVON, J. J. Rhizobial inoculation and P fertilization response in common bean (*Phaseolus vulgaris*) under glasshouse and field conditions. **Experimental Agriculture**, v. 43, n. 1, p. 67-77, 2007.

ZHU, Y.P.; SHEAFFER, C.C.; VANCE, C.P.; GRAHAM, P.H.; RUSSELLE, M.P.; MONTEALEGRE, C.M. Inoculation and nitrogen affect herbage and symbiotic properties of annual *Medicago* species. **Agronomy Journal**, v.90, p.781-786, 1998.

ZILLI, J. E.; VALICHESKI, R. R.; RUMJANEK, N. G.; SIMOES-ARAUJO, J. L.; FREIRE FILHO, F. R.; NEVES, M. C. P. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isolados de solo do Cerrado em caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 5, p. 811-818, 2006.

CAPÍTULO III

RIZÓBIOS ISOLADOS DE ALFAFA INFLUENCIAM NA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ARROZ

4.1 INTRODUÇÃO

A sustentabilidade da exploração dos recursos naturais é um dos principais desafios da moderna agricultura. O uso de micro-organismos vem sendo apresentado como uma alternativa para o menor uso de insumos no incremento da produção agrícola. A inoculação de leguminosas com rizóbios e a utilização de micorrizas em mudas de diferentes espécies são os exemplos mais notáveis. No entanto, nas últimas décadas, outros micro-organismos têm atraído à atenção dos investigadores, com vista a uma potencial utilização na agricultura (AHMAD et al. 2008; VARGAS et al, 2009). As bactérias presentes na rizosfera são capazes de aumentar a produtividade de algumas lavouras pela colonização das raízes e estimular o crescimento das plantas. Estes micro-organismos são conhecidos como rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (*Plant growthpromoting rhizobacteria*. PGPR) (BISWAS et al., 2000; BARRIUSO et al., 2005; KOKALIS-BURELLE et al., 2006).

Diversos micro-organismos vêm sendo relatados como promotores de crescimento em plantas, que incluem os gêneros *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Gluconacetobacter*, *Pseudomonas* e *Serratia*, que são exclusivamente micro-organismos não simbióticos (SOMERS & VANDERLEYDEN, 2004). Além destes micro-organismos, vem sendo estudada a atividade de promoção de crescimento vegetal por rizóbios em diversas espécies de plantas estabelecendo associações com milho, sorgo, milheto, canola, alface, mostarda, arroz, cevada e trigo (MATIRU & DAKORA, 2004; SINGH et al., 2005; PERRINE-WALKER et al, 2007). Os detalhes dos mecanismos da interação entre rizóbios e não-leguminosas ainda é pouco entendido, no entanto a capacidade de produção de fitohormônios, como o ácido indol-acético (AIA), vem sendo relatada como uma das possíveis formas de estímulo

ao crescimento vegetal (CHEN et al., 2005; SINGH et al., 2005; BANERJEE et al., 2006).

O AIA, fitohormônio pertencente ao grupo das auxinas, atua na alongação das células vegetais, na formação das raízes laterais e pelos radiculares, bem como na germinação das sementes (BISWAS et al., 2000). Nas fases iniciais do desenvolvimento das plantas, a inoculação de rizóbios produtores de AIA pode aumentar a velocidade da germinação das sementes inoculadas, como observado para arroz e alface (SCHLINDWEINI et al., 2008; VARGAS et al., 2009; PALANIAPPAN et al., 2010). Dessa forma, os objetivos deste trabalho foram quantificar o ácido indol-acético produzido por rizóbios isolados de alfafa, avaliar o efeito da inoculação destes micro-organismos na germinação de sementes de arroz e caracterizar geneticamente esses isolados.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os rizóbios estudados foram obtidos da coleção de culturas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sendo escolhidos nove rizóbios que produziam equivalentes ao ácido indol-acético em meio de cultura. A estirpe SEMIA 816 e o isolado de *Lotus corniculatus* UFRGS Lc348 foram usados como referência na quantificação do ácido indol-acético (OSÓRIO FILHO, 2010). Os testes de germinação das sementes foram realizados com a espécie *Oryza sativa*, cultivar IRGA 409.

4.2.1 Quantificação in vitro da produção de auxinas equivalentes ao ácido indol-acético

A quantificação da produção de auxinas equivalentes ao ácido indol-acético pelas bactérias selecionadas, foi realizada utilizando-se o método de ASGHAR et al. (2002). Os micro-organismos foram crescidos em tubos de erlenmeyer contendo 20 mL de caldo levedura manitol (LM) (SOMASEGARAN & HOBEN, 1994), por 48 h em temperatura de 28°C para formação do inóculo inicial. Após esse período de incubação, as células foram contadas e o inóculo padronizado para o número de 1×10^7 células/mL, através de contagens de células em câmara de Neubauer por meio de um microscópio óptico (Olympus – CX31), e inoculado em tubos de centrifuga contendo meio LM suplementado com 50 mg.L^{-1} de triptofano. Os micro-organismos foram incubados em temperatura de 28°C. Após 48 h, as culturas de bactérias foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min. Do sobrenadante, uma alíquota de 3 mL foi transferida para um copo plástico contendo 2 mL de reagente Salkovski. Essa mistura foi acondicionada em um local escuro por 30 min. a temperatura ambiente. As concentrações de ácido indol-acético foram determinadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 530 nm (GORDON & WEBER,

1951) em comparação com uma curva com os seguintes valores: 0, 0,2, 1, 2, 3, 6, 11, 15, 20, 45, 100, 200 e 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de AIA sintético.

4.2.2 Efeito da inoculação de rizóbios produtores de ácido indol-acético na germinação de sementes de arroz

Na avaliação do efeito dos rizóbios sobre a germinação de sementes de arroz, foram utilizadas sementes de arroz da cultivar IRGA 409 submetidas previamente à assepsia com álcool 70% (1min) e hipoclorito de sódio (1min), seguida de cinco lavagens com água esterilizada. Os testes foram conduzidos em placas de Petri com quatro repetições e 36 sementes em cada placa. As sementes foram colocadas em papel toalha previamente esterilizados, sendo umedecidos com 10 mL de meio de cultura LM estéril (tratamento não inoculado – controle). Dos rizóbios avaliados quanto à produção de equivalentes de ácido-indol acético em placa de poliestireno, nove rizóbios isolados de alfafa (UFRGS Ms205, UFRGS Ms75, UFRGS Ms72, UFRGS Ms55, UFRGS Ms58, UFRGS Ms2010, UFRGS Ms2012, UFRGS Ms515 e UFRGS Ms195) foram testados e duas testemunhas, a estirpe SEMIA 816 e o isolado de *Lotus corniculatus* UFRGS Lc348 foram usadas na comparação. Os padrões foram selecionados no trabalho de OSÓRIO FILHO (2009).

Para avaliação da germinação foram utilizadas como parâmetros as porcentagens de germinação após dois, quatro e seis dias de incubação e o índice de velocidade de germinação (IVG%), calculado pela soma do número de sementes germinadas a cada dia e dividido pelo respectivo número de dias transcorridos a partir de germinação, conforme MAGUIRE (1962). Os dados foram obtidos a partir de contagens diárias após a germinação da plântula. Ao final de sete dias, o teste de germinação foi concluído. O tamanho da radícula e parte aérea das plântulas de arroz foi determinado a dois e seis dias após a emergência, aonde em câmara de fluxo laminar 10 plântulas em cada repetição foi medida com auxílio de uma régua.

4.2.3 Caracterização genética dos rizóbios estudados.

Para a caracterização genética e a identificação dos rizóbios isolados de alfafa, o DNA total das bactérias foi extraído usando o Wizard kit (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. A região de DNA do gene que codifica a porção 16S do ribossomo foi amplificada com os oligonucleotídeos 8F (AGAGTTTGATCCTTGGCTCAG) e 1492R (GCYTACCTTGTTACGACTT) (EDWARDS et al., 1989). Os ciclos empregados foram: um ciclo inicial a 95°C por 3 min., 35 ciclos de desnaturação em 94°C por 1 min., anelamento em 55°C por 1 min., e extensão em 72°C para 2 min. e um ciclo final de extensão em 72°C por 3 min. Os fragmentos foram sequenciados usando o sistema de eletroforese por capilaridade MegaBace 500 (Amersham Biosciences). As sequências parciais da região 16S DNAr das estirpes homologas foram pesquisadas no GenBank com o programa BLAST 2.0, analisadas pelo algoritmo Megablast e usadas para a construção da árvore filogenética. As sequências selecionadas foram alinhadas pelo algoritmo ClustalW e as relações filogenéticas foram analisadas usando-se o método Neighbor-joining realizado pelo programa MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de equivalentes ao ácido indol-acético foi observada em todos isolados testados, apresentando valores que variaram de 43,04 a 101,26 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de equivalente ao ácido indol-acético (AIA) em meio de cultura (Tabela 4.1). Os isolados UFRGS Ms205, Ms75, Ms72, Ms55 e Ms58 produziram quantidades de AIA em meio de cultura superiores aos dois controles testados. Valores superiores a 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ vem sendo observados para isolados de rizóbios, como os micro-organismos estudados por CHAGAS Jr. et al. (2009), isolados de caupi. Estes valores foram superiores aos encontrados por MACHADO et al. (2009), para rizóbios isolados de *Lotus corniculatus* e por SCHLINDWEIN et al. (2008), que avaliou a quantidade de AIA produzido por rizóbios isolados de acácia negra e trevo vesiculoso.

Com relação à germinação das sementes de arroz, observou-se um efeito positivo no percentual de germinação com a inoculação de rizóbios em sementes de arroz. As sementes inoculadas germinaram em valores médios de 15% a mais que aquelas não inoculadas. No terceiro dia a diferença na germinação foi de 22% maior para as sementes de arroz que foram inoculadas com os rizóbios produtores de ácido indol-acético (Figura 4.1). A inoculação com rizóbios não alterou o poder germinativo das sementes de arroz, porém interferiu na velocidade de germinação.

A inoculação das sementes de arroz promoveu um aumento inicial das taxas de germinação a partir do segundo dia após a inoculação (Tabela 4.1). Depois de seis dias da inoculação, as taxas de germinação foram equivalentes entre os tratamentos. Embora as taxas de germinação final não fossem afetadas pela inoculação de rizóbios, o aumento nas taxas de germinação inicial favoreceu o índice da velocidade de germinação das sementes de arroz inoculadas com rizóbios (Tabela 4.1). Incrementos da

germinação inicial e aumentos da velocidade de germinação de sementes inoculadas com rizóbios produtores de AIA foram relatados por BISWAS et al. (2000), GUPTA et al. (2002), PANDEY et al. (2005), SCHLINDWEIN et al. (2008), VARGAS et al. (2009) e OSÓRIO FILHO (2009) sendo esse fator importante no estabelecimento da cultura. O aumento na germinação das sementes é um aspecto importante na cultura de arroz, pois pode favorecer a emergência das plântulas, permitindo que as plântulas de arroz superem a concorrência com as espécies daninhas (GIBSON et al., 2002).

Tabela 4.1. Quantidades de equivalentes ao ácido indol-acético (AIA) produzido por rizóbios oriundos de alfafa em meio LM enriquecido com triptofano e efeito da inoculação de rizóbios produtores de ácido indol-acético no índice de velocidade de germinação (IVG) em sementes de arroz da cultivar IRGA 409. Porto Alegre, 2011.

Rizóbios	AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Germinação		IVG
		Inicial	Final	
		----- % -----		
UFRGS Ms72	95,6 a	25,0 a*	95,1 ^{ns}	23,0 a
UFRGS Ms205	101,3 a	18,8 b	100,0	23,0 a
UFRGS Ms55	92,0 a	18,8 b	93,1	21,3 b
UFRGS Ms2012	56,7 b	18,8 b	98,9	20,5 b
UFRGS Ms195	55,6 b	18,8 b	98,9	20,5 b
SEMIA 816	55,0 b	18,8 b	98,9	20,5 b
UFRGS Ms515	55,8 b	17,4 b	92,6	20,1 b
UFRGS Lc 348	43,0 c	16,0 b	95,6	20,1 b
UFRGS Ms58	84,4 a	16,0 b	100,0	20,1 b
UFRGS Ms2010	59,3 b	16,0 b	95,4	20,1 b
UFRGS Ms75	100,3 a	14,8 b	97,2	20,1 b
Controle	-	3,5 c	99,6	17,6 c
CV(%)	10,1	26,3	-	7,2

* Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro.

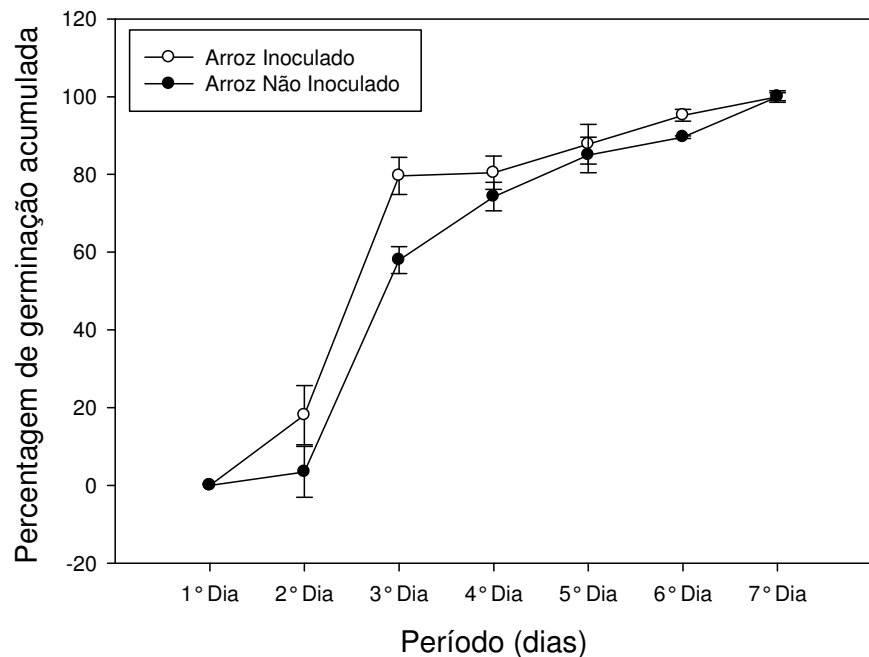


FIGURA 4.1. Efeito da inoculação com rizóbios isolados de alfafa na germinação de sementes de arroz da cultivar IRGA 409. As barras referem ao erro padrão da média de quatro repetições em cada tempo de amostragem. Resultados são referentes à germinação média de todos os tratamentos inoculados. Porto Alegre, 2011.

A inoculação dos rizóbios em sementes de arroz também induziu mudanças no comprimento da raiz e da parte aérea das plântulas de arroz (Tabela 4.2). Cinco isolados, UFRGS Ms72, Ms75, Ms205, Ms55 e Ms515, promoveram o aumento no tamanho das radículas das plântulas de arroz no segundo e sexto dia após a inoculação. As plantas inoculadas com os isolados UFRGS Ms72 e Ms75 apresentaram os maiores valores de crescimento de raiz. Os isolados inoculados em sementes de arroz promoveram aumento no comprimento da parte aérea das plântulas de arroz, com exceção dos isolados UFRGS Ms2012 e UFRGS Ms195 e a estirpe SEMIA 816 (Tabela 4.2). A maior alongação da parte aérea foi observada nos isolados UFRGS Ms72 e Ms75. A promoção do crescimento de plântulas inoculadas com rizóbios promotores de crescimento vem sendo descrita por BISWAS et al. (2000) e VARGAS et al. (2009).

Tabela 4.2. Comprimento da radícula e parte aérea em plântulas de arroz da cultivar IRGA 409, com diferentes isolados de rizóbios produtores de AIA isolados de alfafa. Porto Alegre, 2011.

Rizóbios	Radícula		Parte aérea	
	----- mm.-----			
	2ºDia	6ºDia	2ºDia	6ºDia
UFRGSMs75	24 a*	48 a	27 a	59 a
UFRGSMs72	26 a	53 a	28 a	61 a
UFRGSMs205	21 b	44 b	27 a	54 b
UFRGSMs55	18 b	42 b	21 b	54 b
UFRGSMs515	20 b	45 b	23 b	55 b
UFRGS Lc 348	16 c	44 b	19 b	55 b
UFRGSMs58	14 c	40 c	19 b	50 c
UFRGSMs2010	15 c	40 c	18 b	49 c
UFRGSMs2012	14 c	40 c	17 c	49 c
UFRGSMs195	13 c	39 c	17 c	49 c
SEMIA 816	12 c	41 b	16 c	51 c
NI	11 c	39 c	14 c	48 c
C.V (%)	19,9	16,9	18,1	17,2

* Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade de erro.

Com relação à análise filogenética, a amplificação da região 16S do DNA ribossomal dos rizóbios isolados de alfafa produtores de ácido indolacético com os oligonucleotídeos 8F e 1492R foi de aproximadamente 1000 bp para todas as bactérias sequenciadas (Tabela 4.3). Fragmentos com esse tamanho têm sido considerados suficientes para se realizar a identificação de procariotos (TRÜPER & SCHLEIFER, 2006), por abranger quase todo o tamanho esperado do gene 16S do DNA ribossomal (WEISBURG et al., 1991). A partir dos dados obtidos no sequenciamento dos nucleotídeos do fragmento obtido da amplificação da região 16S DNAr dos isolados mais eficientes avaliados nesse estudo e de representantes dos gêneros *Sinorhizobium*, *Rhizobium* *Mesorhizobium* e *Bradyrhizobium*, foi possível se construir uma árvore filogenética (Figura 4.2). A análise filogenética das sequências obtidas com as depositadas no banco de dados do GenBank revelou que os isolados UFRGS Ms195, Ms2012, Ms515, Ms58 e Ms210 foram identificados como pertencentes à espécie *Sinorhizobium meliloti* (Figura 4.2).

Mesmo que estes isolados apresentassem uma elevada relação filogenética com as estirpes SEMIA 116 e SEMIA 135, a análise de rep-PCR demonstrou que estes micro-organismos não são reisolamentos das estirpes recomendadas para produção de inoculantes para alfafa (Figura 3.2). Os isolados UFRGS Ms72, Ms75 e UFRGS Ms55 foram identificados como pertencentes ao gênero *Rhizobium* (Figura 4.2), como descrito por BROMFIELD et al. (2010).

TABELA 4.3. Identificação de rizóbios isolados de alfafa produtores de ácido indol-acético pelo sequenciamento da região 16S DNAr. Porto Alegre, 2011.

Isolado	Comprimento do Gene (pb)	Organismo homólogo		
		Espécie	Número de acesso	Identidade (%)
UFRGSMs55	1012	<i>Rhizobium</i> sp.	AF510898 AF510923 AF195069	100
UFRGSMs58	1004	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	AM181751 AY904728 FJ025128	99
UFRGSMs515	1017	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	AM181751 AY904728 FJ025128	99
UFRGSMs75	923	<i>Rhizobium</i> sp.	AF510898 AF510923 AF195069	100
UFRGSMs72	1008	<i>Rhizobium</i> sp.	AF510898 AF510923 AF195069	100
UFRGSMs195	985	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	AM181751 AY904728 FJ025128	99
UFRGSMs205	1012	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	AM181751 AY904728 FJ025128	99
UFRGSMs2010	978	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	AM181751 AY904728 FJ025128	99
UFRGSMs2012	983	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	AM181751 AY904728 FJ025128	99

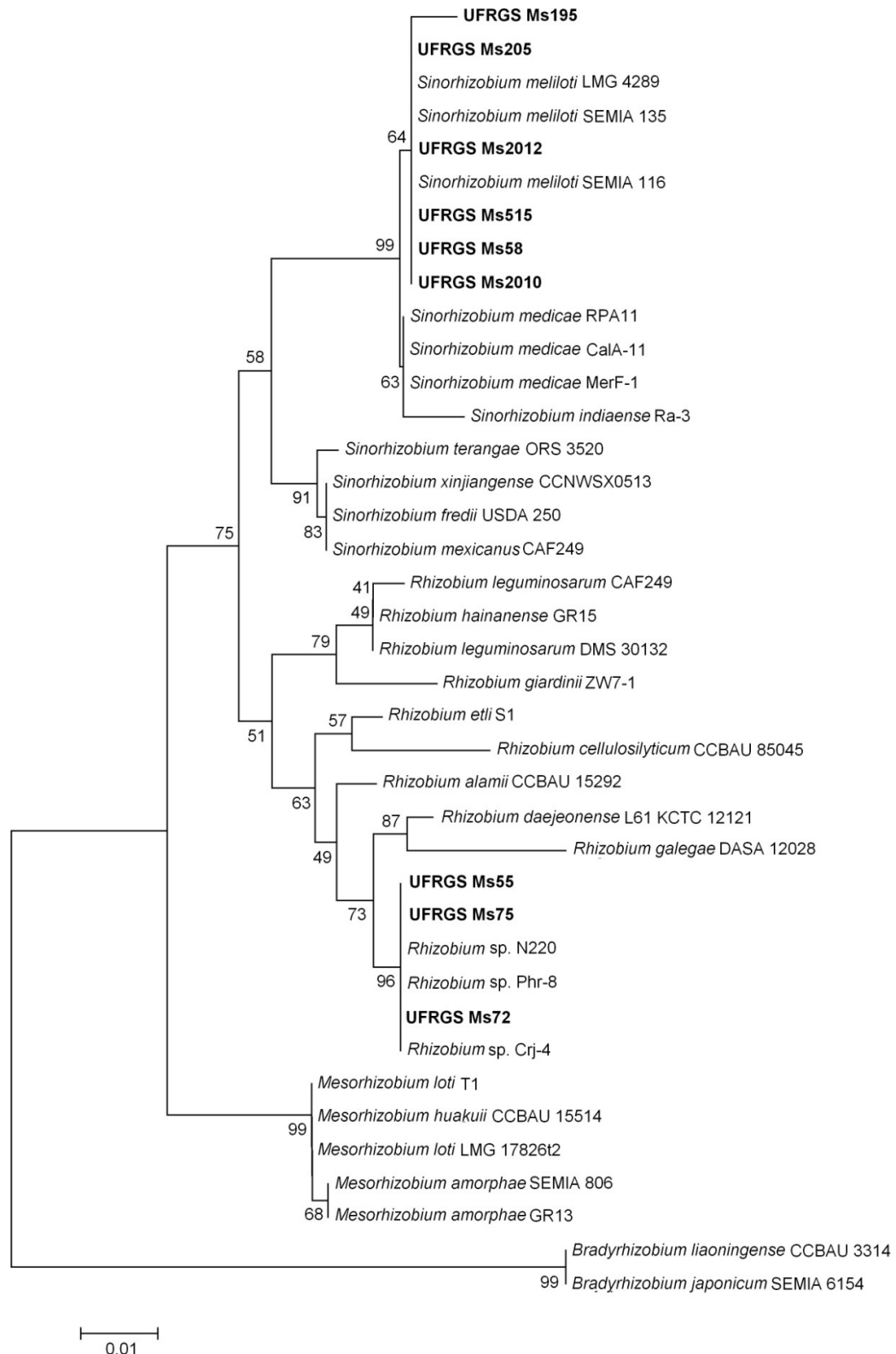


FIGURA 4.2. Arvore filogenética baseada na análise *Neighbor-joining* da região 16S DNAr de isolados de rizóbio e sequencias homologas obtidas. O número representa as ramificações do valor de 1000 reamostragens (*bootstrap*).

4.4 CONCLUSÃO

- 1 Os isolados de rizóbios de alfafa UFRGS UFRGS Ms205, UFRGS Ms75, UFRGS Ms72, UFRGS Ms55, UFRGS Ms58, UFRGS Ms2010, UFRGS Ms2012, UFRGS Ms515 e UFRGS Ms195 produzem substâncias equivalentes ao ácido indol-acético.
- 2 A inoculação com rizóbios acelera o processo de germinação das sementes de arroz e o crescimento das plântulas de arroz.
- 3 Os rizóbios UFRGS Ms58, UFRGS Ms515, UFRGS Ms195 UFRGS Ms205, UFRGS Ms2010 e UFRGS 2012 pertencem à espécie *Sinorhizobium meliloti*. Os rizóbios UFRGS Ms55, UFRGS Ms72 e UFRGS Ms75 pertencem ao gênero *Rhizobium*.

4.5 REFERÊNCIAS

AHMAD, F et al. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth-promoting activities. **Microbiological Research**, Jena, v.163, p. 173-181, 2008.

BANERJEE, M.R.; YESMIN, L.; VESSEY, J. K. Plant-growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers and biopesticides. In. RAI, M.K. (Ed), **Handbook of Microbial Biofertilizers**. Food Products Press: Nova York, 137-181, 2006.

BARAZANI, O.; FRIEDMAN, J. Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? **Journal Chemical Ecology**, New York v. 25, p. 2397-2406, 1999.

BARRIUSO, J et al. Screening for putative PGPR to improve establishment of the symbiosis *Lactarius deliciosus-Pinus* sp. **Microbial Ecology**, New York, v. 50, p. 82-89, 2005.

BIANCO, C.; DEFEZ, R. *Medicago truncatula* improves salt tolerance when nodulated by an indole-3-acetic acid-overproducing *Sinorhizobium meliloti* strain. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 11, p. 3097-3107, 2009.

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

BROMFIELD, E. S. P. et al. *Ensifer*, *Phyllobacterium* and *Rhizobium* species occupy nodules of *Medicago sativa* (alfalfa) and *Melilotus alba* (sweet clover) grown at a Canadian site without a history of cultivation. **Microbiology**, Madison, v. 156, p. 505–520, 2010.

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

CHAGAS Jr. A. F. et al. Produção de ácido indolacético por rizóbios isolados de caupi. **Revista Ceres**, São Paulo, v. 56, n. 6, p. 812-817, 2009

CHEN, X. et al. Modulating DNA bending affects NodD-mediated transcriptional control in *Rhizobium leguminosarum*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 33, p. 2540-2548, 2005.

EDWARDS, U. et al. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. characterization of a gene coding for 16S-ribosomal RNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 17, p. 7843-7853, 1989.

GIBSON, K. D. et al. Implications of delayed *Echinochloa* spp. germination and duration of competition for integrated weed management in water-seeded rice. **Weed Research**, Oxford, v. 42, p. 351-358, 2002.

GORDON, S.A.; WEBER, P.R. Colorimetric estimation of indolacetic acid. **Plant Physiology**, Moscow, v. 26, n. 1, p. 192-195, 1951.

GUPTA, C. et al. Plant growth enhancement and suppression of *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of peanut by fluorescent *Pseudomonas*. **Biology Fertility Soils**, Berlin, v. 35, p. 399-405, 2002.

HILALI, A. et al. Effects of inoculation with *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* on wheat cultivated in clover crop rotation agricultural soil in Morocco. **Canadian Journal of Microbiology**, Canada, v. 47, p. 590. 593, 2001.

KOKALIS-BURELLE KLOEPPER, J. W.; REDDY, M. S. Plant growth promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous microorganisms. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 31, p. 91-100, 2006.

MACHADO, R. G. et al. Promoção de crescimento de capim Tanzânia por inoculação com rizóbios. In.: **VIII Reunião Sul-Brasileira de Ciência do Solo**. Anais. 2010.

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

MANTELIN, S.; TOURAINÉ, B. Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 55, n. 394, p. 27 – 34, 2004.

MATIRU, V. N.; DAKORA, F. D. Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in land races of African cereal crops. **African Journal Biotechnol**, Africa, v. 3, p. 1–7. 2004.

ONA, O. et al. The effect of pH on indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp7. **Symbiosis**, New York, v. 35, p.199– 208. 2003.

OSORIO FILHO, B. D. **Rizóbios eficientes em Lotus em condições de estresse hídrico e promotores de crescimento em arroz irrigado**. 2009. 113 f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2009.

PALANIAPPAN, P. et al. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp. **Biology Fertility Soils**, Berlin, v. 46, p. 807 – 816, 2010.

PANDEY, P. et al. Rhizosphere competent *Pseudomonas aeruginosa* GRC1 produces characteristic siderophore and enhances growth of Indian mustard (*Brassica campestris*). **Current Microbiology**, New York, v. 51, p. 303-309, 2005.

PERRINE-WALKER, F. M. et al. Infection process and the interaction of rice roots with rhizobia. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, p. 3343–50, 2007.

SAMBROOK, J. & RUSSEL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2001.

SCHLINDWEIN, G. et al. Influência da inoculação de rizóbios sobre a germinação e o vigor de plântulas de alface. **Ciência Rural**. Santa Maria, v. 38, p. 658-664, 2008.

SINGH, R. K. et al. Can rhizobial inoculation promote rice growth through nitrogen fixation? **International Rice Research Notes**, Manila, v. 30, p. 28–29. 2005.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, J. H. **Handbook for Rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology**. Springer: Verlag, 450 p. 1994.

SOMMERS, E. & VANDERLEYDEN, J. Rhizosphere bacterial signaling: A love parade beneath our feet. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 30, p. 205-240, 2004.

TAMURA, K. et al. MEGA. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Amsterdam, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TRÜPER, H. G.; SCHLEIFER, K. Prokaryote Characterization and Identification. In: Dworkin, M. (Ed.). **The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria**. 3^a ed, v. 3. 2006. 959p.

VARGAS, L. K. et al. Occurrence of plant growth-promoting traits in clover-nodulating rhizobia strains isolated from different soils in Rio Grande do Sul state. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Piracicaba, v. 33, p. 1227-1235, 2009

WEISBURG, W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Oxford, v. 173, p. 697–703, 1991.

CAPÍTULO IV

SELEÇÃO DE RIZÓBIOS SIMBIONTES EM ALFAFA MAIS EFICIENTES EM PRESENÇA DE NITROGÊNIO

5.1 INTRODUÇÃO

A alfafa (*Medicago sativa* L.) é considerada uma das mais importantes plantas forrageiras de clima temperado, reunindo características desejadas, como alto valor nutritivo, elevada produção de forragem, boa aceitabilidade e digestibilidade (CARVALHO & VILELA, 1994), e seu uso é indicado na alimentação de bovinos para produção de leite de alta qualidade. No Rio Grande do Sul, o aumento no interesse no uso desta cultura é ocasionado pela intensificação dos sistemas de produção de leite. Nestes sistemas, são utilizados animais de maior potencial genético que exigem plantas forrageiras de melhor valor nutritivo (PEDREIRA et al., 2001). Outro fator importante associado ao uso de alfafa é a capacidade de fixação biológica de nitrogênio, em simbiose com rizóbios, e que apresenta grande potencial na sustentabilidade destes sistemas de produção de leite, devido às significativas entradas de nitrogênio no sistema solo-planta-animal, reduzindo a necessidade de fertilizantes nitrogenados e aumentando a disponibilidade de proteína para os animais.

A simbiose entre alfafa e rizóbio pode fixar biologicamente quantidades de nitrogênio que variam entre 120 a 250 kg.ha⁻¹.ano⁻¹ foram observados nos Estados Unidos (ZHU et al., 1998) e em torno de 650 kg.ha⁻¹.ano⁻¹ em pastagens na Argentina (RACCA et al., 1998). A espécie *M. sativa* estabelece associações efetivas com bactérias do gênero *Sinorhizobium meliloti* (de LAJUDIE et al., 1994) e vem sendo encontradas interações eficientes com a espécie *S. medicae* (TALEBI et al., 2008). No entanto, no Brasil, existe uma carência de trabalhos que visem à seleção e caracterização de estirpes de rizóbio em alfafa que sejam mais competitivas e tenham alta capacidade de nodulação e fixação de nitrogênio em concentrações mais elevadas de nitrogênio.

O nitrogênio mineral é o principal regulador do processo de simbiose entre a leguminosa e o rizóbio (CARROL & MATHWES, 1990), em função da interferência no processo de fixação biológica de nitrogênio. Em presença desse elemento, tem sido observadas reduções no número e na massa seca de nódulos, na atividade da nitrogenase, bem como a aceleração da senescência dos nódulos ou sua desintegração (STREETER, 1988). Alguns modelos do efeito regulatório do nitrogênio na nodulação vêm sendo propostos, demonstrando a interferência no processo de formação e manutenção do nódulo e a inibição da produção de polissacarídeos pelos rizóbios, quando em concentrações mais elevadas, dificultando o contato entre a raiz e a bactéria (PATRIARCA et al., 2002). Outro efeito do nitrogênio ocorre na síntese de flavonóides secretados pelas raízes (CORONATO et al., 1992), impedindo a transcrição dos fatores Nod pelos rizóbios, o encurvamento do pêlo radicular e a formação do cordão de infecção (BLADERGROEN et al., 1998; DENARIÉ et al., 1996). Entretanto, concentrações elevadas de nitrogênio podem ou não reduzir a nodulação, pois o grau de inibição pode mudar de acordo com a especiação química do nitrogênio (NO^{-3} ou NH^{+4}), a sua concentração próxima às raízes e, por outros agentes, como temperatura e pH na zona radicular (VESSEY & LUIT, 1999). Somando-se a esses fatores ambientais, deve-se igualmente considerar a variação do efeito do nitrogênio segundo a estirpe de rizóbio e a espécie ou cultivar de leguminosa (GIBSON & HARPER, 1985), razão pela qual a tolerância a esse elemento depende da interação entre o rizóbio e a leguminosa. Nos últimos anos tem se verificado crescente interesse pela seleção de rizóbios isolados de espécies forrageiras de clima temperado. No entanto, poucos estudos têm sido realizados para selecionar rizóbios mais tolerantes a concentrações mais elevadas de nitrogênio, sendo essa uma característica importante a ser pesquisada.

Além do processo de seleção de estirpes mais eficientes na fixação biológica do nitrogênio, a caracterização de bactérias fixadoras de nitrogênio é fundamental para o estudo da sua diversidade e distribuição ecológica. Métodos eficientes são necessários para a identificação de genótipos de estirpes que possuam, por exemplo, eficiência superior na capacidade de fixação biológica de nitrogênio. A biologia molecular tem ajudado o desenvolvimento de métodos fáceis e rápidos para realização da

caracterização microbiana. As técnicas baseadas na reação em cadeia de polimerase (PCR) que utilizam oligonucleotídeos que amplificam sequências repetitivas dispersas no genoma de bactérias sem sendo usados na caracterização de rizóbios por apresentar uma boa discriminação das estirpes de rizóbio (GIONGO et al, 2007; EL-AKHAL et al., 1999). Além dessa técnica de PCR, outro método baseado no sequenciamento da região 16S DNAr tem sido usado na identificação de isolados de rizóbio em nível de gênero e espécie (ESTRELA et al., 2009; WANG et al., 2009; BACERRA-CASTRO et. al., 2010), e para a identificação de rizóbios isolados de alfafa (BROMFIELD et al., 2010; SAIDI et al., 2009; LANGER et a., 2008; ELBOUTAHIRI et al., 2010; VILLAR et al., 2008). Desta maneira, o objetivo deste trabalho foi selecionar e caracterizar geneticamente rizóbios de alfafa autóctones do Rio Grande do Sul e identificar interações mais eficientes em diferentes concentrações de nitrogênio.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os rizóbios usados nesse experimento foram isolados de nódulos de alfafa de diferentes locais do Rio Grande do Sul (Capítulo II), sendo escolhidos aleatoriamente 20 isolados de rizóbios que formavam nódulos e fixavam nitrogênio em alfafa. As estirpes de *Sinorhizobium meliloti* SEMIA 116, 134 e 135, usadas como referência para a seleção de rizóbios em alfafa, foram obtidas no Centro de Fixação Biológica de Nitrogênio da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, RS, Brasil. Utilizou-se para os experimentos a cultivar Crioula de *Medicago sativa*, obtida do banco de germoplasma do Departamento de Plantas Forrageiras e Agrometeorologia da UFRGS.

5.2.1 Seleção de rizóbios em experimento com vasos do tipo “Leonard” em casa de vegetação.

Para a seleção de estirpes mais eficientes na fixação biológica de nitrogênio foi realizado um experimento, em casa de vegetação, com vasos tipo “Leonard” (VINCENT, 1970) contendo mistura de vermiculita e areia (na proporção de 2:1), na parte superior e solução nutritiva (SARRUGE, 1975) isenta de nitrogênio na parte inferior. Em cada vaso foram plantadas cinco sementes de *Medicago sativa* pré-germinadas.

Para inoculação das plantas, o inóculo foi elaborado a partir de rizóbios crescidos em frascos de Erlenmeyer com 50 mL de meio Levedura Manitol (LM), incubados por 48 horas a 28 °C, sob agitação constante a 120 rpm. Ao final deste período, alíquotas de 200 µL foram retiradas de cada frasco para determinação do número de células em câmara de Neubauer com microscópio óptico (Olympus – CX31). Os inóculos foram padronizados por diluição para a concentração de 2×10^8 cel./mL. Foram inoculadas alíquotas de 2 mL por vaso do caldo de cada rizóbio, individualmente. Além dos tratamentos inoculados, foram conduzidos dois tratamentos controle sem inoculação: um

sem adição de nitrogênio e outro com adição de 225 mg de nitrogênio, na forma de uma solução de 13,4 mM NH_4NO_3 , sendo essa dose dividida em três aplicações semanais de 5,35 mg de nitrogênio, durante 14 semanas, equivalendo a aplicação de 80kg de nitrogênio por hectare.

Ao final do período de 98 dias, as plantas foram cortadas e a parte aérea foi separada do sistema radicular, acondicionada em sacos de papel para secagem em estufa a 65°C, até apresentar peso constante. Os nódulos foram destacados das raízes, contados e colocados em estufa a 65°C para secagem. Foram avaliados o número e a massa seca de nódulos, a produção de matéria seca e o acúmulo de nitrogênio total na parte aérea (TEDESCO et al., 1995). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000), e as médias comparadas pelo teste de Scot Knott a 5% de probabilidade de erro.

5.2.2 Seleção de rizóbios em experimento com vasos com solo em casa de vegetação.

Cinco isolados mais promissores obtidos nos ensaios com vasos de Leonard foram testados quanto a sua eficiência na capacidade de fixação simbiótica de nitrogênio em ensaio realizado em casa de vegetação com plantas de alfafa cultivadas em vasos com solo. As sementes foram desinfestadas conforme descrito no item 5.2.1. Em cada vaso foram semeadas cinco sementes e após 10 dias realizou-se o desbaste das plantas, sendo mantidas 3 plantas por vaso. O método empregado para o preparo do inóculo foi semelhante ao descrito no item 5.2.1. Dois tratamentos controle sem inoculação foram conduzidos, um sem adição de nitrogênio e outro com adição de 562 mg de nitrogênio, na forma de uma solução de 26 mM NH_4NO_3 , sendo essa dose dividida em três aplicações semanais de 10,41 mg de nitrogênio, durante 18 semanas, equivalendo a adição de 200 kg de nitrogênio por hectare.

Após 125 dias a partir do plantio, a parte aérea das plantas foi separada do sistema radicular, acondicionada em sacos de papel e secada em estufa a 65°C, até apresentar peso constante. Os nódulos foram destacados das raízes, contados e colocados em estufa a 65°C para secagem. Foram avaliados o número e massa seca de nódulos, a produção de matéria seca e o

acúmulo de nitrogênio total na parte aérea, determinado pelo método de TEDESCO et al., (1995). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2000), e as médias comparadas pelo teste de Scot Knott a 5% de probabilidade de erro.

5.2.3 Seleção inicial de rizóbios tolerantes ao nitrogênio.

Para seleção inicial de rizóbios tolerantes a diferentes concentrações de nitrogênio mineral, foram utilizados tubos de ensaio de 250 mm de comprimento e 24 mm de diâmetro, contendo 20 mL de solução nutritiva SARRUGE (1975) agarizada (6%) e esterilizado em autoclave por 20 min a 121 °C. Os tratamentos avaliados foram diferentes concentrações de nitrogênio (0, 1,25, 2,5, 5, 10, 15 e 30 mM de NH_4NO_3), com quatro repetições. As diferentes concentrações de nitrogênio foram adicionadas durante o preparo da solução nutritiva na forma de NH_4NO_3 . As sementes de alfafa foram desinfestadas em álcool 70% por 30 seg., posteriormente submersas em hipoclorito (5%) por 1 min. e lavadas sucessivamente em água destilada e esterilizada em autoclave por 20 min. Estas sementes foram acondicionadas em papel toalha e pré-germinadas por dois dias a 28 °C. Após esse período, as plântulas de alfafa foram transplantadas para os tubos de ensaio. Os rizóbios foram crescidos em tubos de ensaio contendo 5 ml de meio Levedura Manitol (LM), incubados por 48 horas a 28 °C, sob agitação constante a 120 rpm para elaboração do inóculo. Ao final deste período, uma alíquota de 200 μL foi retirada de cada frasco e o número de células em foi contado em uma câmara de Neubauer em um microscópio óptico (Olympus – CX31) e os inóculos foram padronizados por diluição para a concentração de 2×10^8 cel./mL. A inoculação, individualmente, dos isolados de rizóbio foi realizada com auxílio de um pipetador automático utilizando-se alíquotas de 500 μL por tubo de ensaio. Os tubos foram mantidos em lampadário com fotoperíodo de 12 h de luz diária. A avaliação visual da nodulação nas diferentes concentrações de nitrogênio foi realizada aos 45 dias após a inoculação. Com base nos resultados de formação de nódulos (Anexo V), os dados foram transformados em uma matriz binária bidimensional, onde 0 indica a ausência dos nódulos e 1 a presença. O agrupamento foi realizado pelo programa PAST 1.69 (Palaeontological

Statistics), usando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with arithmetic mean) e o coeficiente de Jaccard.

5.2.4 Tolerância de rizóbios promissores ao nitrogênio mineral

A avaliação do efeito do nitrogênio mineral na simbiose entre rizóbio e alfafa foi realizada conduzindo-se um experimento em casa de vegetação, onde foram utilizados vasos Leonard (VINCENT, 1970) contendo uma mistura de vermiculita e areia (na proporção de 2:1), na parte superior e solução nutritiva (SARRUGE, 1975) isenta de nitrogênio na parte inferior. Em cada vaso, foram plantadas cinco sementes de *Medicago sativa* desinfestadas com álcool 70% por 30 s, posteriormente submersas em hipoclorito (5%) por 1 min. e lavadas sucessivamente em água destilada e esterilizada em autoclave por 20 min. e pré-germinadas em papel toalha por dois dias a 28°C. Os rizóbios foram crescidos em frascos de Erlenmeyer contendo 50 mL de meio Levedura Manitol (LM), incubados por 48 horas a 28°C, sob agitação constante a 120 rpm para elaboração do inóculo. Ao final deste período, uma alíquota de 200µL foi retirada de cada frasco e o número de células em foi contado em uma câmara de Neubauer com um microscópio óptico (Olympus – CX31) e os inóculos foram padronizados por diluição para a concentração de 2×10^8 cel./mL. Foi feita a inoculação com os isolados, individualmente, utilizando-se alíquotas de 2 mL do inóculo por vaso. Os tratamentos foram quatro doses de nitrogênio (0, 5, 10 e 15 mM de N) aplicados na forma de NH_4NO_3 . O delineamento experimental foi o inteiramente ao acaso, com quatro repetições. Ao final do período de 98 dias, a parte aérea foi separada do sistema radicular, acondicionada em sacos de papel e secada em estufa a 65°C, até apresentar peso constante. Os nódulos foram destacados das raízes, contados e colocados em estufa a 65°C para secagem. Foram avaliados o número e a massa seca de nódulos, a produção de matéria seca e o acúmulo de nitrogênio total na parte aérea (TEDESCO et al., 1995). Os dados foram submetidos às análises de variância (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste de Scot Knott a 5% de probabilidade de erro.

5.2.5 Identificação dos isolados

Para caracterização genética e a identificação dos rizóbios isolados de alfafa, o DNA total das bactérias foi extraído usando o Wizard kit (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. A região de DNA do gene que codifica a porção 16S do ribossomo foi amplificada com os oligonucleotídeos 8F (AGAGTTTGATCCTTGGCTCAG) e 1492R (GCYTACCTTGTTACGACTT) (EDWARDS et al., 1989). Os ciclos empregados foram: um ciclo inicial a 95°C por 3 min., 35 ciclos de desnaturação em 94°C por 1 min., anelamento em 55°C por 1 min., e extensão em 72°C para 2 min., e um ciclo final de extensão em 72°C por 3 min. Os fragmentos foram sequenciados usando o sistema de eletroforese por capilaridade MegaBace 500 (Amersham Biosciences). As sequências parciais da região 16S DNAr das estirpes homologas foram pesquisadas no GenBank com o programa BLAST 2.0, analisadas pelo algoritmo Megablast e usadas para a construção da árvore filogenética. As sequencias selecionadas foram alinhadas pelo algoritmo ClustalW e a relações filogenéticas foram analisadas usando-se o método Neighbor-joining realizado pelo programa MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Seleção de isolados de rizóbio em vasos Leonard

Os valores médios do teor de nitrogênio total, massa seca da parte aérea, número de nódulos e da matéria seca de nódulos formados em raízes de plantas de *M. sativa* inoculadas com isolados de rizóbios nativos e estirpes são mostrados na Tabela 5.1. A produção de matéria seca da parte aérea das plantas inoculadas com o isolado UFRGS Ms98 e Ms63 foram maiores que a das plantas dos tratamentos controle. Todas as plantas inoculadas com as estirpes recomendadas e os demais rizóbios estudados (Tabela 5.1). As estirpes SEMIA 135 e 134, liberadas para a produção de inoculantes para alfafa, que foram ineficientes com baixa produção de matéria seca, sendo superiores apenas ao tratamento controle sem adição de nitrogênio (Tabela 5.1).

O número de nódulos variou entre 15 a 64 nódulos por planta, sendo os tratamentos inoculados com os isolados UFRGS Ms81, Ms204 e Ms26 os que apresentaram maior número de nódulos do que as plantas inoculadas com as estirpes SEMIA 116, 134 e 135 (Tabela 5.1). Resultados semelhantes foram observados por OLIVEIRA et al. (2004) e VELAZQUEZ et al. (1999). Com relação à massa seca de nódulos, as plantas inoculadas com os isolados UFRGS Ms26, Ms32, Ms195, Ms57 e Ms67, superaram os demais tratamentos. As plantas inoculadas com os isolados UFRGS Ms81, Ms204, Ms194, Ms63, Ms22, Ms95 e Ms75 formaram massa nodular intermediária, sendo superiores as estirpes recomendadas SEMIA 116, 134 e 135 (Tabela 5.1).

Tabela 5.1. Nitrogênio total acumulado na parte aérea, massa seca da parte aérea, índice de eficiência relativa, número de nódulos e massa seca de nódulos formados em raízes de plantas de *M. sativa* cultivadas em vasos de Leonard e inoculadas com isolados de rizóbios nativos e estirpes. Médias de 4 repetições.

	Nitrogênio Total	Massa Seca da Parte Aérea	Massa nódulos	Número de Nódulos	Índice de eficiência relativa
	----- mg.planta.-----				(%)
T+N	23,0 b*	809,0 b	0	0	100 b
SEMIA 116	17,9 c	736,5 b	18,6 c	44 b	77,8 c
SEMIA 135	14,5 c	483,9 c	14,7 c	33 b	62,7 c
SEMIA 134	9,1 d	236,7 d	13,7 c	32 b	38,9 d
UFRGS Ms98	44,1 a	1337,3 a	11,6 c	27 c	193,6 a
UFRGS Ms63	27,6 b	1178,5 a	21,5 b	38 b	120,3 b
UFRGS Ms208	27,3 b	820,1 b	18,8 c	23 c	119 b
UFRGS Ms204	26,9 b	792,0 b	27,7 b	50 a	117,2 b
UFRGS Ms195	21,9 b	760,6 b	24,1 b	42 b	95,3 b
UFRGS Ms513	20,8 b	412,6 c	16,4 c	17 c	90,2 c
UFRGS Ms81	19,9 b	673,9 b	26,9 b	64 a	86,5 c
UFRGS Ms67	18,1 c	577,7 c	29,9 a	27 c	78,5 c
UFRGS Ms32	17,1 c	703,3 b	37,7 a	44 b	74,1 c
UFRGS Ms 57	16,5 c	794,8 b	30,5 a	29 c	71,6 c
UFRGS Ms95	16,2 c	540,6 c	21,5 b	23 c	70,1 c
UFRGS Ms72	15,2 c	435,4 c	16,8 c	30 c	62,3 c
UFRGS Ms75	14,4 c	763,7 b	30,8 a	15 c	65,6 d
UFRGS Ms194	9,0 d	313,0 d	20,6 b	42 b	38,3 d
UFRGS Ms22	8,9 d	334,1 d	24,0 b	34 b	37,9 d
UFRGS Ms26	8,7 d	482,2 d	34,0 a	49 a	36,8 d
T-N	0,3 e	36,8 e	0	0	0 e
CV (%)	23,3	22,6	26,9	28,7	22,24

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5%. Médias de quatro repetições. T+N: Testemunha com adição de nitrogênio; T-N: Testemunha sem adição de nitrogênio. Porto Alegre, 2011.

Avaliando-se os valores de nitrogênio total acumulado na parte aérea das plantas, observa-se que as plantas inoculadas com o isolado UFRGS Ms98 apresentaram maior valor de nitrogênio total do que as do controle com adição de nitrogênio e as inoculadas com as estirpes SEMIA 116, 134 e 135 (Tabela 5.1). Os índices de eficiência relativa calculados para os tratamentos inoculados variaram de 37 % a 193,5 %, no entanto, segundo MIRANDA (1995), o mínimo a ser considerado como eficiente é de 70%, mas nesse experimento escolheu o ponto de corte de 95% de eficiência relativa para selecionar os isolados a serem testados em experimentos com vaso com solo. Os isolados UFRGS Ms98, Ms63, Ms208 e Ms204 apresentaram os maiores valores do índice de eficiência relativa. (Tabela 5.1). As estirpes SEMIA 116, 135 e 134, liberadas para *M. sativa*, apresentaram baixa eficiência relativa (Tabela 5.1). A estirpe SEMIA 134 foi a que teve menor contribuição em termos de acúmulo de matéria seca e teor de nitrogênio total na parte aérea das plantas. Esses resultados denotam a necessidade selecionar uma nova estirpe no grupo de elite de rizóbios liberados para produção de inoculantes e da continuidade dos programas de seleção de rizóbios para leguminosas.

5.3.2 Seleção de isolados de rizóbio em vasos com solo

Os resultados de teor de nitrogênio total, massa seca da parte aérea, número e massa seca de nódulos de plantas de *M. sativa* inoculadas com isolados de rizóbios selecionados em vaso Leonard são apresentados na Tabela 5.2. Todas as plantas inoculadas com os rizóbios estudados apresentaram valores de nitrogênio total e matéria seca superiores às plantas do tratamento controle sem adição de nitrogênio, indicando que o ambiente solo não afetou a interação dos rizóbios selecionados com as plantas de alfafa inoculadas. As plantas inoculadas com o isolado UFRGS Ms98 apresentaram os maiores valores de nitrogênio e matéria seca, não diferindo do controle com adição de nitrogênio equivalente a 200 kg de N.ha⁻¹. A produção de matéria seca das plantas inoculadas com os rizóbios UFRGS Ms63, Ms208, Ms204 e Ms195 não diferiram daquelas inoculadas com a estirpe SEMIA 116 (Tabela 5.2). As plantas inoculadas com a estirpe SEMIA 135 apresentaram os menores valores de matéria seca, em comparação às inoculadas com os

outros isolados e com a estirpe SEMIA 116. O número de nódulos formados nas raízes de alfafa variou de 20 a 52 nódulos por planta, sendo que as plantas inoculadas com os isolados UFRGS Ms204 e Ms63 apresentaram maior número de nódulos do que as plantas inoculadas com a estirpe SEMIA 116 (Tabela 5.2). Valores semelhantes foram observados por SAIDI et al. (2009), em experimento com plantas de alfafa cultivadas em vasos com solo, onde observaram variação de 30 a 57 nódulos por planta em diferentes variedades de alfafa estudadas.

O índice de eficiência relativa na fixação simbiótica do nitrogênio dos isolados testados em plantas cultivadas em vasos com solo variou entre 90% a 50% (Tabela 5.2). O isolado UFRGS Ms98 apresentou uma eficiência de 90%. Segundo MIRANDA (1995), na seleção de estirpes de rizóbios se devem escolher aquelas que promovam efetividade de pelo menos 70% em relação à testemunha com N mineral. Os resultados indicam que este isolado possui potencial para ser incluído no grupo de elite de estirpes recomendadas para inoculação de alfafa no Brasil, no entanto testes a campo devem ser realizados para confirmação dessa característica.

5.3.3 Seleção inicial de interações entre rizóbios e alfafa tolerante ao nitrogênio

O efeito do nitrogênio na simbiose entre rizóbio e alfafa *in vitro* pode ser observada na Figura 6.1 e no Anexo IV. Nenhum dos 19 rizóbios testados nesse experimento apresentou formação de nódulos nas concentrações de 15 e 30 mM de nitrogênio. Concentrações elevadas de nitrogênio mineral vêm sendo descritas como inibidoras do processo de simbiose entre rizóbios e leguminosas, como observado por MENDONÇA & SCHIAVINATO (2005) e FEY & VESSEY (2009). Além disso, a presença de nitrogênio em meio de cultura inibiu a formação de nódulos em sete isolados de rizóbio (UFRGS Ms22, UFRGS Ms26, UFRGS Ms63, UFRGS Ms72, UFRGS Ms75, UFRGS Ms95 e UFRGS Ms194) e na estirpe SEMIA 134, recomendada para inoculação em sementes de alfafa. No entanto nove isolados de rizóbio e duas estirpes testadas houve a formação de nódulos em raízes de alfafa em concentrações superiores a 1,25 mM de nitrogênio, indicando que a interação

entre rizóbios e alfafa em diferentes concentrações de nitrogênio varia com o microrganismo inoculado, sendo possível selecionar interações mais tolerantes a presença de nitrogênio mineral. Dos nove isolados que formaram nódulos em presença de nitrogênio, em quatro (UFRGS Ms195, UFRGS Ms208, UFRGS Ms57 e UFRGS Ms81) foram observados nódulos nas concentrações de até 10 mM de nitrogênio e dois (UFRGS Ms32 e UFRGS Ms98) rizóbios em concentrações de até 5 mM. Estes micro-organismos foram selecionados para testes em casa de vegetação.

TABELA 5.2. Nitrogênio total, massa seca da parte aérea, número de nódulos, matéria seca de nódulos e eficiência relativa na fixação biológica de nitrogênio em raízes de plantas de *M. sativa* inoculadas com isolados de rizóbios nativos e estirpes em vasos com solo.

	Nitrogênio Total -----	Massa Seca da Parte Aérea mg.planta.-----	Massa nódulos	Número de Nódulos	EFR %
T+N	18,9 a	455 b	0,0 d	0 d	100 a
SEMIA 116	13,5 b	456 b	17,4 b	41 b	66 b
SEMIA 135	10,8 b	379 c	8,9 c	20 c	50 b
UFRGS Ms98	17,3 a	588 a	14,4 c	34 b	90 a
UFRGS Ms63	13,3 b	483 b	29,4 a	52 a	60 b
UFRGS Ms208	12,5 b	428 b	20,4 b	25 c	65 b
UFRGS Ms204	11,2 b	427 b	29,6 a	52 a	58 b
UFRGS Ms195	12,1 b	422 b	14,7 c	27 c	52 b
T-N	2,7 c	80 e	0,0 d	0 d	0 c
CV (%)	20,5	17,5	20,8	21,2	

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5%. Médias de quatro repetições. T+N: Testemunha com adição de nitrogênio; T-N: Testemunha sem adição de nitrogênio. Porto Alegre, 2011.

5.3.4 Efeito do nitrogênio na interação entre rizóbio e alfafa.

Para avaliar o efeito do nitrogênio na simbiose de rizóbio e alfafa, seis isolados e duas estirpes foram testadas em condições de casa de vegetação. A partir dos resultados obtidos, a análise da variância mostrou que ocorreu uma interação significativa entre dose de nitrogênio com todos os parâmetros avaliados, indicando que a simbiose de *M. sativa* entre os diferentes rizóbios inoculados foi afetada pelas doses de nitrogênio. Este

resultado foi semelhante ao encontrado por OLIVERIA et al. (2004) para interações entre doses e estirpe de rizóbio para alfafa, por HUNGRIA & BOHRER (2000) para o efeito do nitrogênio na simbiose entre *Bradyrhizobium* em soja e por UNOKOVICH & PETE (1998) avaliando o efeito do nitrogênio na simbiose de *Rhizobium* e trevo vermelho.

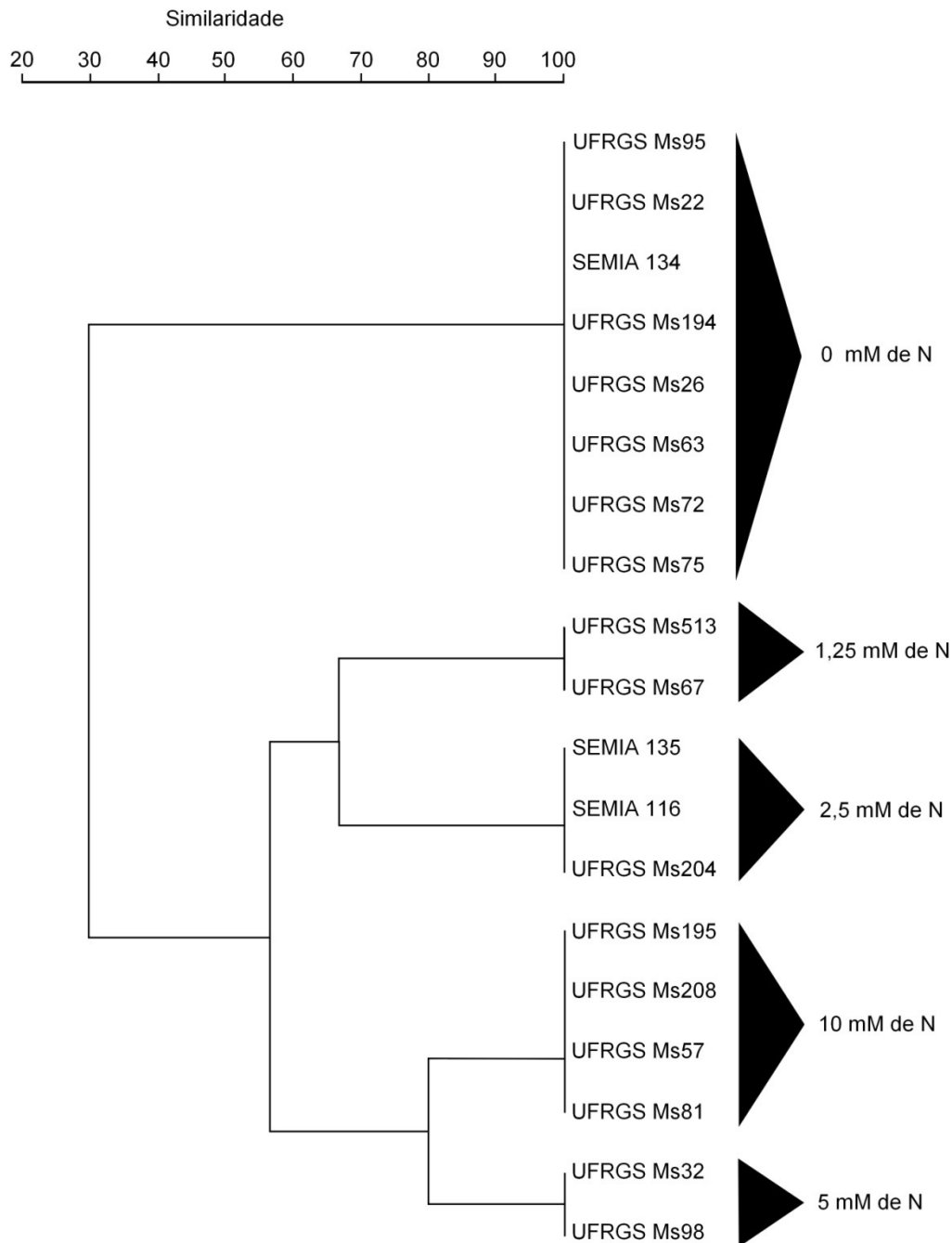


Figura 5.1 Dendrograma de similaridade (%) do número de nódulos formado por diferentes rizóbios em plantas de alfafa em diferentes concentrações de nitrogênio.

Tabela 5.3. Valores de F para número de nódulos, massa de nódulos, massa da parte aérea e massa seca da raiz de *M. sativa* avaliados em 115 dias. Porto Alegre, 2011.

Causas da variação	Massa seca da parte aera	Nitrogênio Total	Massa de nódulos	Número de nódulos
Isolado de Rizóbio (A)	17,01*	23,04*	8,57*	25,56*
Dose de Nitrogênio (B)	1,17*	1,88*	6,80*	10,79*
A x B	2,60*	3,69*	13,12*	12,26*
C.V (%)	26,20	19,58	23,02	27,17

* Significativo a 5% de probabilidade de erro. ns: não significativo a 5% de probabilidade de erro.

A produção de matéria seca e os teores de nitrogênio total das plantas inoculadas com rizóbios variaram em função da concentração de nitrogênio aplicado (Tabela 6.2). As plantas inoculadas com os isolados UFRGS Ms195, UFRGS Ms81 e a estirpe SEMIA 135 aumentaram os valores de matéria seca em virtude do aumento da dose de nitrogênio adicionada (Figura 6.2, Tabela 6.2), sendo que na dose de 15mM, as plantas inoculadas com esses micro-organismos apresentaram os maiores valores de matéria seca (Tabela 6.2). O teor de nitrogênio total das plantas inoculadas com esses micro-organismos também aumentou com a dose de nitrogênio adicionada (Figura 6.2, Tabela 6.3). As plantas inoculadas com os isolados UFRGS Ms32 e a estirpe SEMIA 116 apresentaram um estímulo no desenvolvimento das plantas nas doses de 5 e 10 mM (Figura 6.2, Tabela 6.3), no entanto, o aumento da concentração de nitrogênio não interferiu na quantidade de nitrogênio total acumulado no tecido das plantas de alfafa (Tabela 6.2).

Tabela 5.4. Produção de matéria seca e nitrogênio total da parte aérea em plantas de *Medicago sativa* inoculadas com isolados e estirpes de rizóbio em diferentes concentrações de nitrogênio. Porto Alegre, 2011.

Rizóbios	Massa seca da parte aera (mg.planta ⁻¹)			
	Dose de Nitrogênio (mM)			
	0	5	10	15
UFRGS Ms195	761 bB*	823 bB	800 bB	1000 aA
UFRGS Ms81	860 bA	756 bA	843 bA	974 aA
URGS Ms98	1337 aA	1158 aA	913 bB	724 bB
UFRGS Ms208	820 bB	1074 aA	1278 aA	1052 aA
UFRGS Ms57	795 bA	662 bA	657 bA	664 bA
UFRGS Ms32	703 bA	921 aA	854 bA	579 bB
SEMIA 116	737 bA	951 aA	763 bA	677 bB
SEMIA 135	484 cB	646 bB	689 bB	912 aA
N.I	39 dC	235 cB	577 bB	788 bA

Rizóbios	Nitrogênio total (mg.planta ⁻¹)			
	Dose de Nitrogênio (mM)			
	0	5	10	15
UFRGS Ms195	22 bB	26 aA	26 aA	29 aA
UFRGS Ms81	20 bB	23 aB	17 bB	29 aA
URGS Ms98	44 aA	28 aB	27 aB	19 cC
UFRGS Ms208	27 bA	28 aA	25 aA	25 aA
UFRGS Ms57	17 cA	21 aA	20 aA	20 bA
UFRGS Ms32	17 cA	23 aA	19 bA	18 bA
SEMIA 116	21 bA	21 aA	18 bA	18 bA
SEMIA 135	15 cB	19 aB	18 bB	25 aA
N.I	0,3 dC	2 bC	8 cB	25 aA

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula, dentro de cada coluna, ou maiúscula, dentro de cada linha, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade de erro. N.I: tratamento não inoculado.

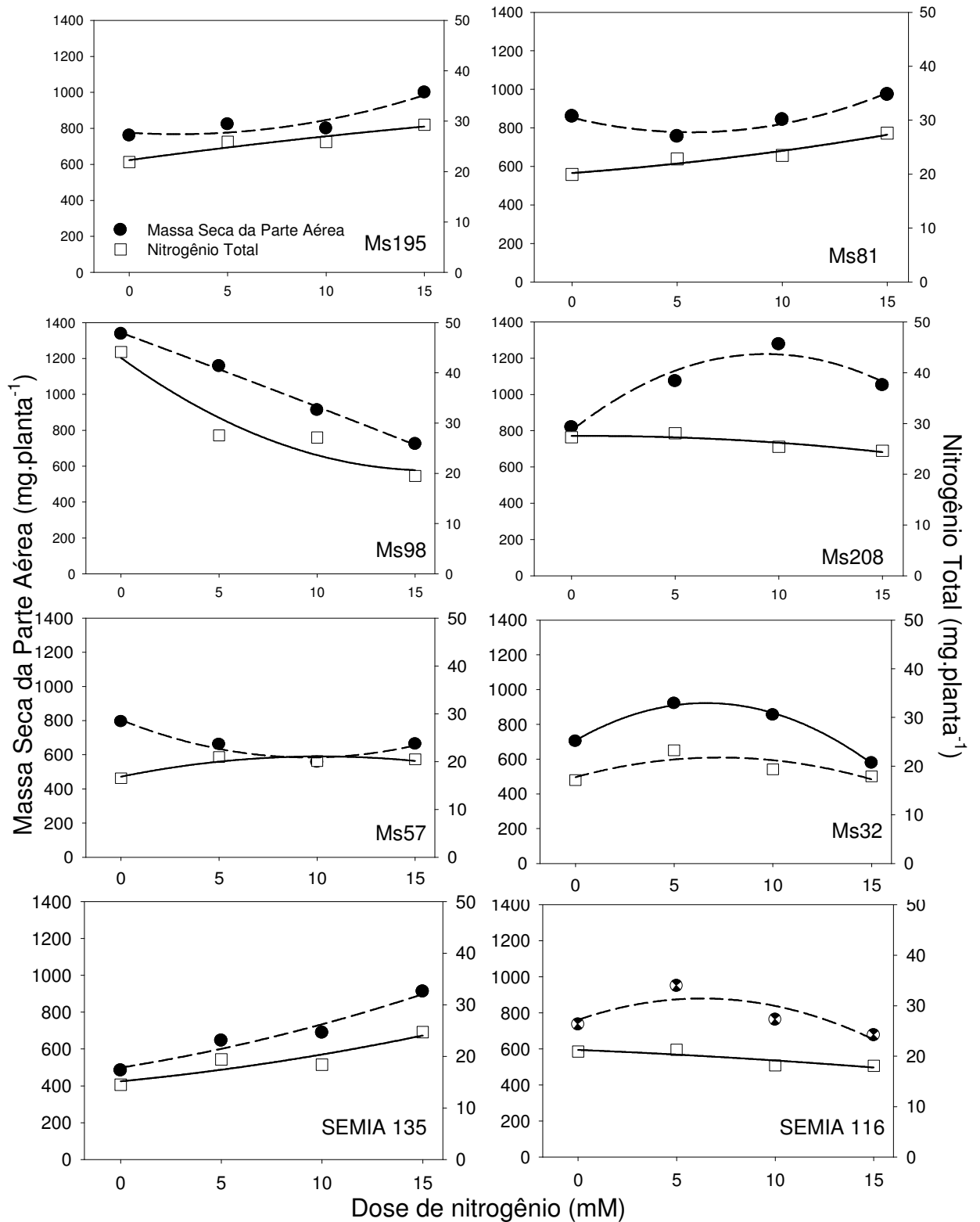


Figura 5.2. Produção de matéria seca e nitrogênio total de plantas de alfafa inoculadas com rizóbios em diferentes concentrações de nitrogênio. Porto Alegre, 2011.

Os valores de matéria seca e nitrogênio da parte aérea das plantas inoculadas com o isolado UFRGS Ms98 foram maiores no tratamento sem adição de nitrogênio, no entanto a interação entre este isolado com alfafa mostrou-se mais sensível as maiores doses de nitrogênio, sendo observada uma redução nos valores destes dois parâmetros (Tabela 6.2, Figura 6.2). O isolado UFRGS Ms208 se destacou por apresentar as plantas com maiores produções de matéria seca nas doses mais elevadas de nitrogênio (10 e 15 mM), e não ocorrendo variação significativa com relação ao teor de nitrogênio na parte aérea (Tabela 6.2, Figura 6.2), indicando que este isolado pode apresentar maior tolerância a doses mais elevadas de nitrogênio e potencial para ser estudado em trabalhos futuros.

Tabela 5.5. Equações de regressão ajustadas aos dados de massa seca da parte aera e nitrogênio total, em função de diferentes doses de nitrogênio. Porto Alegre, 2011.

Rizóbios	Massa seca da parte aera (mg.planta ⁻¹)	
	Equação	R ²
UFRGS Ms195	$y = 1,3713x^2 - 6,6593x + 775,95$	0,86
UFRGS Ms81	$y = 2,3453x^2 - 26,622x + 852,71$	0,95
URGS Ms98	$y = .0,0939x^2 - 40,268x + 1343,4$	0,99
UFRGS Ms208	$y = .4,8028x^2 + 90,012x + 801,17$	0,93
UFRGS Ms57	$y = 2,3969x^2 - 45,884x + 803,94$	0,94
UFRGS Ms32	$y = .4,935x^2 + 65,213x + 707,06$	0,99
SEMIA 116	$y = .2,9994x^2 + 37,682x + 761,69$	0,70
SEMIA 135	$y = 0,6089x^2 + 17,436x + 498,9$	0,95

Rizóbios	Nitrogênio total (mg.planta ⁻¹)	
	Equação	R ²
UFRGS Ms195	$y = .0,0057x^2 + 0,5304x + 22,273$	0,89
UFRGS Ms81	$y = 0,0122x^2 + 0,2902x + 20,202$	0,94
URGS Ms98	$y = 0,0893x^2 - 2,8285x + 42,973$	0,91
UFRGS Ms208	$y = .0,0156x^2 + 0,0214x + 27,545$	0,81
UFRGS Ms57	$y = .0,0408x^2 + 0,8298x + 16,864$	0,82
UFRGS Ms32	$y = .0,0757x^2 + 1,1055x + 17,728$	0,65
SEMIA 116	$y = .0,0046x^2 - 0,1643x + 21,252$	0,76
SEMIA 135	$y = 0,0143x^2 + 0,3775x + 15,171$	0,83

A adição de doses maiores de nitrogênio reduziu a nodulação e a massa de nódulos das plantas inoculadas com os isolados UFRGS Ms195, Ms81, Ms32 e Ms135 com o aumento da concentração de nitrogênio (Tabela 6.4 e Figura 6.3), no entanto no isolado UFRGS Ms57 foi observado um estímulo na nodulação e na massa seca de nódulos com o aumento da concentração de nitrogênio. As plantas inoculadas com o isolado UFRGS Ms98 reduziram o número de nódulos, mas houve um aumento nos valores de massa seca.

Tabela 5.6 Número e massa seca de nódulos em plantas de *Medicago sativa* inoculadas com isolados e estirpes de rizóbio em diferentes concentrações de nitrogênio. Porto Alegre, 2011.

Rizóbios	Massa de nódulos (mg.planta ⁻¹)			
	Dose de Nitrogênio (mM)			
	0	5	10	15
UFRGS Ms195	24 aA	25 bA	20 aA	17 bA
UFRGS Ms81	27 aA	18 bB	18 aB	14 bC
URGS Ms98	12 bA	15 cA	14 aA	14 bA
UFRGS Ms208	19 bA	21 bA	17 aA	13 bB
UFRGS Ms57	30 aA	23 bB	17 aB	38 aA
UFRGS Ms32	34 aA	39 aA	28 aA	28 aA
SEMIA 116	27 aA	20 bB	23 aB	21 bB
SEMIA 135	19 bA	12 cB	13 aB	11 bB
N.I	24 aA	25 bA	20 aA	17 bA

Rizóbios	Número de nódulos (nódulos.planta ⁻¹)			
	Dose de Nitrogênio (mM)			
	0	5	10	15
UFRGS Ms195	42 aA	37 bA	33 bB	32 bB
UFRGS Ms81	64 aA	51 bA	38 bB	30 bB
URGS Ms98	30 bA	22 bB	20 cB	19 cB
UFRGS Ms208	23 bB	20 bB	27 bA	34 bA
UFRGS Ms57	30 bB	27 bB	39 bB	61 aA
UFRGS Ms32	49 aA	45 bA	36 bB	29 bB
SEMIA 116	47 aC	71 aB	90 aA	67 aB
SEMIA 135	54 aA	32 bB	33 bB	31 bB
N.I	42 aA	37 bA	33 bB	32 bB

* Médias seguidas pela mesma letra minúscula, dentro de cada coluna, ou maiúscula, dentro de cada linha, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knot a 5% de probabilidade de erro. N.I: tratamento não inoculado.

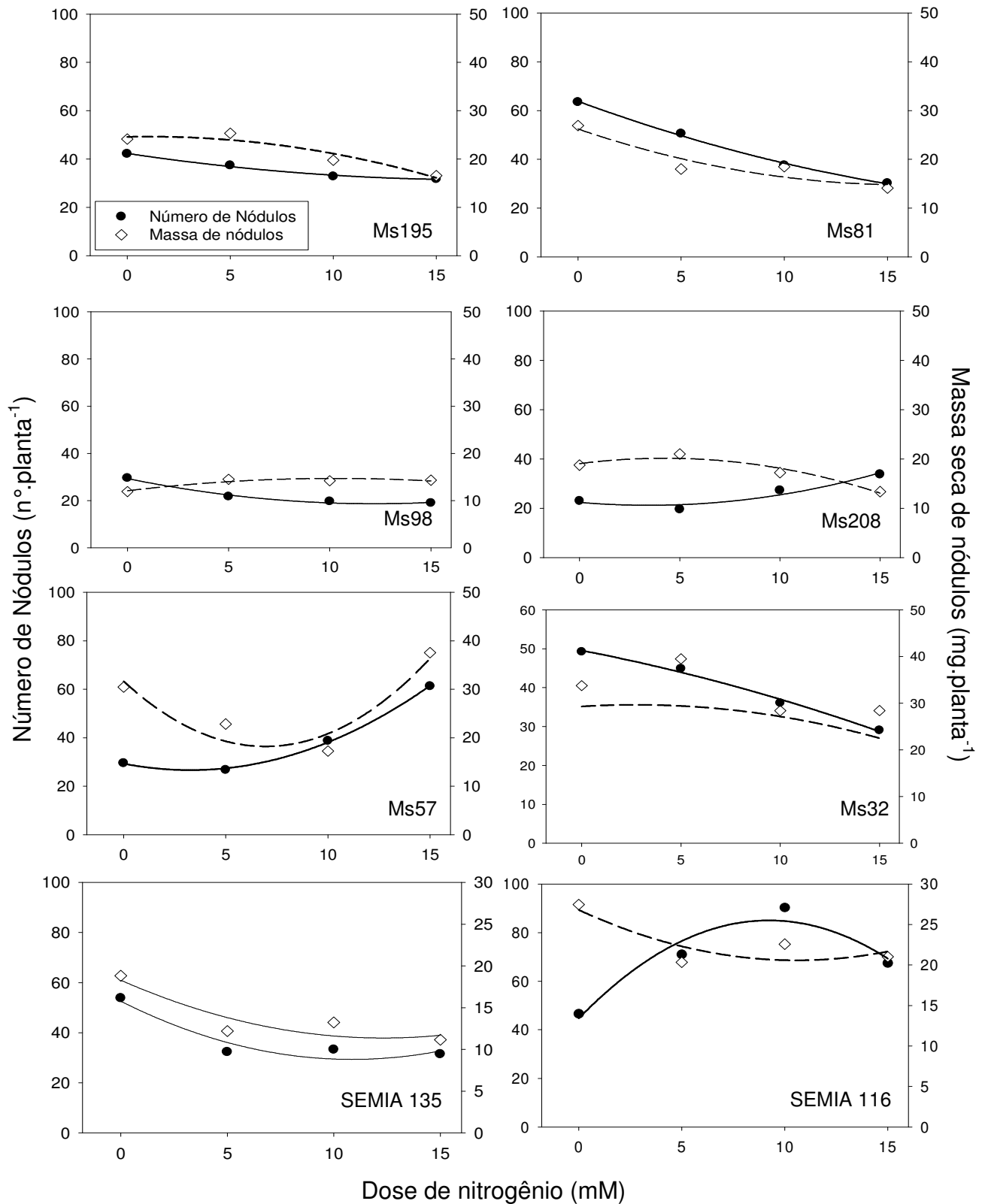


Figura 5.3. Número de nódulos e massa seca de nódulos de alfafa inoculados com rizóbios em diferentes concentrações de nitrogênio. Porto Alegre, 2011.

Para as plantas inoculadas com os isolados UFRGS Ms208 e a estirpe SEMIA 116, foi observado um aumento nos valores de número de nódulos na dose de 5 e 10 mM, mas uma redução na massa seca de nódulos nas doses mais elevadas de nitrogênio (Tabela 6.4 e Figura 6.3). Doses mais elevadas de nitrogênio mineral vêm sendo descritas como inibidoras da simbiose entre rizóbios e leguminosas (FEY & VESSEY, 2009), sendo observada a redução do número de nódulos e a massa dos nódulos. Este padrão foi observado nesse trabalho, no entanto para algumas interações estudadas o comportamento foi diferenciado, indicando que a variabilidade existente nos rizóbios estudados possibilita a seleção de interações mais tolerantes ao nitrogênio mineral.

Tabela 5.7. Equações de regressão ajustadas aos dados de número de nódulos e massa de nódulos, em função de diferentes doses de nitrogênio. Porto Alegre, 2011.

Rizóbios	Número de Nódulos	
	Equação	R ²
UFRGS Ms195	$y = 0,0372x^2. 1,2728x + 42,331$	0,99
UFRGS Ms81	$y = 0,0561x^2. 3,0983x + 63,786$	0,99
URGS Ms98	$y = 0,0989x^2. 0,6833x + 22,389$	0,93
UFRGS Ms208	$y = 0,2531x^2. 1,6519x + 29,338$	0,99
UFRGS Ms57	$y = 0,2531x^2. 1,6519x + 29,338$	0,99
UFRGS Ms32	$y = .0,0267x^2. 0,9867x + 49,539$	0,99
SEMIA 116	$y = .0,4728x^2 + 8,7306x + 44,708$	0,92
SEMIA 135	$y = 0,1969x^2. 4,2769x + 52,574$	0,90

Rizóbios	Massa de Nódulos (mg.planta ⁻¹)	
	Equação	R ²
UFRGS Ms195	$y = .0,0437x^2 + 0,0902x + 24,593$	0,91
UFRGS Ms81	$y = 0,0455x^2. 1,4418x + 26,209$	0,88
URGS Ms98	$y = .0,0608x^2 + 0,5142x + 19,057$	0,94
UFRGS Ms208	$y = 0,2792x^2. 3,8752x + 31,657$	0,88
UFRGS Ms57	$y = 0,2792x^2. 3,8752x + 31,657$	0,87
UFRGS Ms32	$y = .0,057x^2 + 0,3112x + 35,164$	0,53
SEMIA 116	$y = 0,0557x^2. 1,1775x + 26,796$	0,72
SEMIA 135	$y = 0,0456x^2. 1,1232x + 18,289$	0,83

As duas primeiras dimensões da análise de coordenadas principais responderam por 83% da variação total dos dados, sendo que a coordenada 1 apresentou uma variância de 52,9% e a coordenada 2 uma variância de 30,1% (Figura 4). Na análise conjunta dos dados, o parâmetro dose de nitrogênio apresentou uma maior relação com os parâmetros de número de nódulos e massa seca de nódulos, estando em quadrantes opostos. Assim, observa-se que o efeito do nitrogênio afetou mais aos valores de nodulação e massa seca de nódulos que aos parâmetros de massa seca da parte aérea e nitrogênio total, indicando que o aumento da concentração de nitrogênio interfere negativamente a simbiose entre alfafa e rizóbio, como observado por MENDONÇA & SCHIAVINATO (2005).

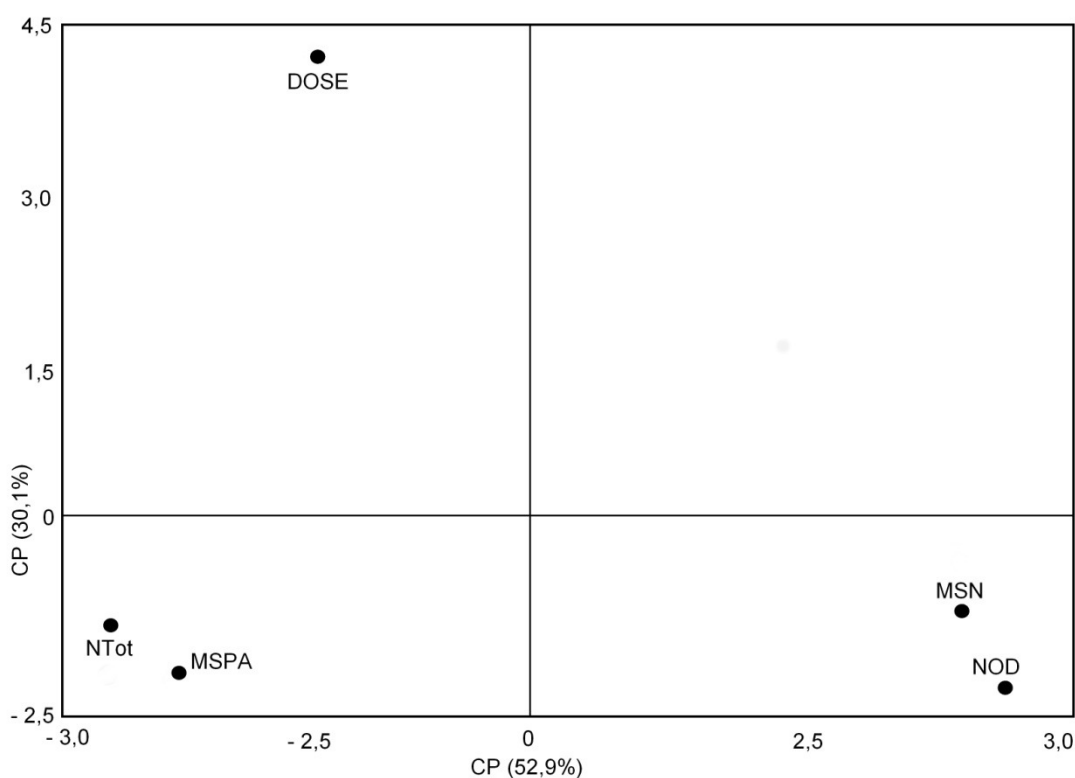


Figura 5.4. Coordenadas principais entre parâmetros dose de nitrogênio (DOSE), nitrogênio total (NTot), massa seca da parte aérea (MSPA), massa seca de nódulos (MSN) e número de nódulos (NOD). Porto Alegre, 2011.

5.3.5 Análise filogenética dos isolados promissores.

O tamanho do fragmento da amplificação da região do gene 16S DNAr por PCR com os oligonucleotídeos 8F e 1492R foi de, aproximadamente, 1000 bp para todas as bactérias analisadas (dados não mostrados). Fragmentos com esse tamanho têm sido considerados suficientes para se realizar a identificação correta de procariotos (TRÜPER & SCHLEIFER, 2006), por compreender quase todo o tamanho esperado do gene 16S do DNA que é de aproximadamente 1500 pb (WEISBURG et al., 1991). A partir dos dados obtidos no sequenciamento dos nucleotídeos do fragmento obtido da amplificação da região 16S DNAr dos isolados mais eficientes avaliados nesse estudo e de representantes dos gêneros *Sinorhizobium*, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, foi possível se construir uma árvore filogenética (Figura 5.2) A análise filogenética das sequências obtidas comparadas com as depositadas no banco de dados do GenBank revelou que os isolados UFRGS Ms63, Ms98, Ms195, Ms204 e Ms208 apresentaram identidade ao gênero *Sinorhizobium*, com valores de similaridade superiores a 96%.

Os isolados de rizóbio UFRGS Ms98, Ms63 e Ms208 formaram um grupo com similaridade da região 16S superior a 99% com a espécie *Sinorhizobium meliloti* (Tabela 5.3). Mesmo estes isolados terem apresentado elevada similaridade com as estirpes SEMIA 116 e SEMIA 135 (Figura 5.1), pelo sequenciamento parcial da região 16S do DNAr, observa-se que pela análise de rep-PCR esses isolados apresentam um perfil genético diferente das estirpes recomendadas para a produção de inoculantes de alfafa no Brasil (Figura 3.2). Além disso, os resultados de eficiência relativa na fixação biológica de nitrogênio e nodulação foram superiores aos das estirpes recomendadas, sugerindo que não são reisolamentos. O isolado UFRGS Ms195 está relacionado à espécie de *Sinorhizobium meliloti*, mas com uma homologia de 98%. O isolado UFRGS Ms204, mesmo sendo agrupado ao gênero *Sinorhizobium*, apresenta uma maior distância filogenética às espécies *S. meliloti* e *S. medicae* (Figura 5.1), evidenciando a necessidade de um estudo filogenético mais aprofundado a fim de possibilitar a identificação deste micro-organismo.

Tabela 5.8. Similaridade de parte região 16S do DNA ribossomal entre os isolados de alfafa e estirpes homologas obtidas no GenBank.

Isolado	Comprimento do Gene (pb)	Organismo homólogo		
		Espécie	Número de acesso	Identidade (%)
UFRGS Ms98	1005	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	AM181751 AY904728 FJ025128	100
UFRGS Ms63	1005	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	AM181751 AY904728 FJ025128	100
UFRGS Ms208	986	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	AM181751 AY904728 FJ025128	100
UFRGS Ms204	1012	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	AM181751 AY904728 FJ025128	96
UFRGS Ms195	985	<i>Sinorhizobium meliloti</i>	AM181751 AY904728 FJ025128	98

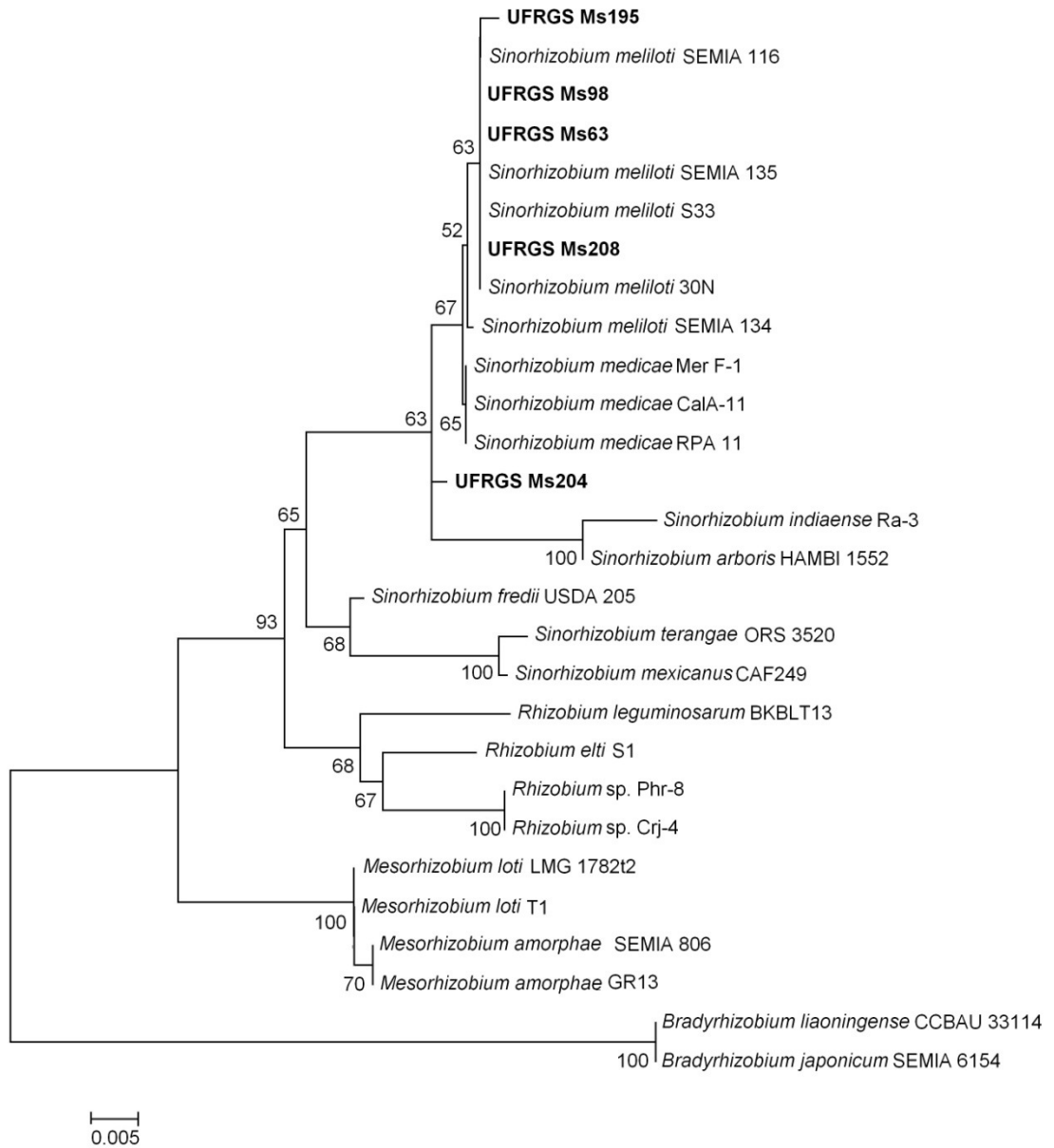


FIGURA 5.5. Arvore filogenética baseada na análise *Neighbor-joining* da região 16S DNAr de isolados de rizóbio e sequencias homologas obtidas. O número representa as ramificações do valor de 1000 reamostragens (*bootstrap*).

5.4 CONCLUSÕES

1. O isolado UFRGS Ms98, nas condições deste trabalho, é mais eficiente na fixação simbiótica de nitrogênio em plantas de alfafa para a variedade Crioula do que as estirpes liberadas para a produção de inoculantes para *Medicago sativa*.
2. O isolado UFRGS Ms208 é mais tolerante ao nitrogênio mineral. Contudo, experimentos a campo devem ser conduzidos para avaliar o efeito do nitrogênio mineral na simbiose entre rizóbio e alfafa.
3. Os rizóbios isolados de alfafa apresentam características genéticas distintas das estirpes recomendadas, indicando que não são reisolamentos.
4. Os isolados testados em vaso com solo foram identificados como pertencentes à espécie *Sinorhizobium meliloti*.

5.5 REFERÊNCIAS

ABOU-SHANAB, R. A. et al. Characterization of Ni-resistant bacteria in the rhizosphere of the hyperaccumulator *Alyssum murale* by 16S rRNA gene sequence analysis. **Word Journal Microbiology of Biotechnology**, New York, v. 26, n. 1, p. 101-108, 2010.

BAYMIEV, A. K. et al. Genetic diversity of Rhizobia nodulating *Lathyrus tuberosus* L. growing in Bashkortostan (Russia) **Archives of Microbiology**, Moscow, v. 191, p. 138-144, 2010.

BECERRA-CASTRO, C. et al. Endophytic and rhizoplane bacteria associated with *Cytisus striatus* growing on hexachlorocyclohexane-contaminated soil: isolation and characterization. **Plant and Soil**, London, v. 340, n. 2, p. 413-433, 2011.

BINDE, D. R. et al. rep-PCR fingerprinting and taxonomy based on the sequencing of the 16S rRNA gene of 54 elite commercial rhizobial strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 83, n. 5, p. 897-908, 2009.

BLADERGROEN, M. R.; SPAINK, H. P. Genes and signal molecules involved in the rhizobia-Leguminosae symbiosis. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, p. 353–359 1998.

BROMFIELD, E. S. P. et al. *Ensifer*, *Phyllobacterium* and *Rhizobium* species occupy nodules of *Medicago sativa* (alfalfa) and *Melilotus alba* (sweet clover) grown at a Canadian site without a history of cultivation. **Microbiology**, Washington, v. 156, p. 505–520, 2010.

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

CARROLL, B. J.; Mathews, A. Nitrate inhibition of nodulation in legumes. In: Gresshoff PM. **Molecular biology of symbiotic nitrogen fixation**, Amsterdam, p. 159-180. 1990.

CARVALHO, L. A., VILELA, D. Produção artificial de feno de alfafa (*Medicago sativa* L.) e seu uso na alimentação animal. In: CARVALHO, L.A., VILELA, D.

(Eds.) **Cultura da alfafa: estabelecimento, fenação, custo de produção e construção de um secador estático**. Coronel Pacheco: EMBRAPA-CNPGL, 1994, p.13-20.

CORONADO, C. J. et al Regulation of flavonoid production in *Medicago sativa*-*Rhizobium meliloti* symbiosis, p. 334. In: PALACIOS, R. et al. **New horizons in nitrogen fixation**. Kluwer Academic Publishers, London, United Kingdom. P. 334. 1992.

de LAJUDIE, P. et al. Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Amsterdam, v. 44, n. 4, p. 715-733, 1994.

DÉNARIÉ J.; DEBELLÉ F.; PROMÉ J. C. Rhizobium lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. **Annual Review of Biochemistry**, New York, v. 65, p. 503–535, 1996.

DIOUF, D. et al. Genetic diversity of *Acacia seyal* Del. rhizobial populations indigenous to Senegalese soils in relation to salinity and pH of the sampling sites. **Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 54, n. 3, p. 553-566, 2007.

DOURADO, A. C. et al. Identification of *Sinorhizobium (Ensifer) medicae* based on a sepecific genomic sequence unveiled by M13-PCR fingerprinting. **International Microbiology**, Amsterdam, v. 12, n. 4, p. 215-225, 2009.

EDWARDS, U. et al. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. characterization of a gene coding for 16S-ribosomal RNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 17, p. 7843-7853, 1989.

EL-AKHAL, M. R. et al. Genetic diversity and symbiotic efficiency of rhizobial isolates obtained from nodules of *Arachis hypogaea* in northwestern Morocco. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 40, p. 2911–2914, 2008.

ELBOUTAHIRI, N. et al. Phenotypic and genetic diversity in *Sinorhizobium meliloti* and *S. medicae* from drought and salt affected regions of Morocco. **Microbiology**, Washington, v. 15. p. 25 – 38, 2010.

ESTRELLA, M. J. et al. Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado River Basin (Argentina). **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 75, n. 4, p. 1088-98, 2009.

FEI, H.; VESSEY, J. K. Stimulation of nodulation in *Medicago truncatula* by low concentrations of ammonium: quantitative reverse transcription PCR analysis of selected genes. **Physiologia Plantarum**, Helsinki, v. 135, p. 317–330. 2009

FERREIRA, D. F. **Sistemas de análises estatística para dados balanceados**. Lavras:UFLA/DEX/SISVAR, 2000. 145p.

GAGE, D. J. Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, Washington, v.68, n. 2, p. 280–300, 2004.

GIBSON, A. H.; HARPER, J. E. Nitrate effect on nodulation of soybean by *Bradyrhizobium japonicum*. **Crop Science**, London, v. 25, p. 497–501, 1985.

GIONGO, A. et al. Genetic diversity and symbiotic efficiency of population of rhizobia of *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. **Biology and Fertility of Soil**, Washington, v. 43, n. 43, p. 593-598, 2007.

HUNGRIA, M.; BOHRER, T. R. J. Variability of nodulation and dinitrogen fixation capacity among soybean cultivars. **Biology and Fertility of Soil**, London, v.3145-52, 2000.

KOLLING, J., SCHOLLES, D., SELBACH, P.A. Seleção de estirpes de *Rhizobium* para trevo subterrâneo, alfafa e cornichão. **Agricultura Sulriograndense**, Porto Alegre, v. 19, n. 2, p. 103-111, 1983.

KWON, S. W. et al. Phylogenetic analysis of the genera *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* on the basis of 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequences. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, Amsterdam, v. 55, n. 1. P. 263 – 270, 2005.

LANGER, H. et al. Genetic diversity of *Sinorhizobium meliloti* associated with alfalfa in Chilean volcanic soils and their symbiotic effectiveness under acidic conditions. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, London, v. 24, p. 301–308, 2008.

LIU, J. et al. Mixture of endophytic *Agrobacterium* and *Sinorhizobium meliloti* strains could induce nonspecific nodulation on some woody legumes. **Archives of Microbiology**, Moscow, v. 192, n. 3, p. 229-234, 2010.

MARABET, C. et al. Multi locus sequence analysis of root nodule isolates from *Lotus arabicus* (Senegal), *Lotus creticus*, *Argyrolobium uniflorum* and *Medicago sativa* (Tunisia) and description of *Ensifer numidicus* sp. nov. and *Ensifer garamanticus* sp. nov. **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, Amsterdam, v. 60, p. 664-674, 2010.

MENDONÇA, E. H. M.; SCHIAVINATO, M. A. Growth of *crotalaria juncea* l. supplied with mineral nitrogen. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Brasília, v. 48, n. 2, p. 181-185. 2005

MIRANDA, C.H.B. Eficiência em fixação de nitrogênio de estirpes de *Bradyrhizobium* sp. em *Centrosema acutifolium*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Lavras, v. 24 p. 185-191, 1995.

MONZA, J. E. et al. Denitrification ability of rhizobial strains isolated from *Lotus* sp. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Paris, v. 85, p. 229 – 235, 2006.

MOREIRA, F. M. M.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Editora da UFLA, 2006, 726 p.

NICK, G. et al. *Sinorhizobium arboris* sp. nov. and *Sinorhizobium kostiense* sp. nov., isolated from leguminous trees in Sudan and Kenya. **International Journal Systematic Bacteriology**, Washington, v. 49, n. 4, p. 1359-1368, 1999.

OGASAWARA, M. et al. *Sinorhizobium indiaense* sp. nov. and *Sinorhizobium abri* sp. nov. isolated from tropical legumes, *Sesbania rostrata* and *Abrus precatorius*, respectively. **Symbiosis**, Washington, v. 34, n. 1, p. 53-68, 2003

OLIVEIRA, P. P. A. et al. Interação entre cultivares, estirpes comerciais de *Rhizobium meliloti* e fungicidas no incremento da produção de alfafa. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 3, p.425-431, 1999.

OLIVEIRA, W. et al. Alfalfa yield and quality as function of nitrogen fertilization and symbiosis with *Sinorhizobium meliloti*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, n. 4, p. 433-438, 2004.

OLIVEIRA, W. S et al. Alfalfa yield and quality as function of nitrogen fertilization and symbiosis with *Sinorhizobium meliloti*. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 61, n. 4, p. 433-438, 2004.

PATRIARCA, E. J. et al. Key of bacterial NH_4^+ metabolism in rhizobium-plant symbiosis. **Microbiology and molecular biology reviews**, Oxford, v. 66, n. 2, p. 203-222, 2002.

PEDREIRA, G.S.P. et al. O processo de produção em pastagens. In: **Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Zootecnia**, 38., 2001, Piracicaba. Anais... Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 2001. p.772-807

RACCA, R. et al. Alfalfa symbiotic dinitrogen fixation in the Argentine Pampean Region. In: NORTH AMERICAN ALFALFA IMPROVEMENT CONFERENCE, 36., Bozeman, Montana, 1998. **Proceedings**, Montana, 1998. p.71.

SAIDI, S. et al. Genetic characterisation and symbiotic proprieties of native *Sinorhizobium* trapped by *Medicago sativa* on Tunisian soils. **Australian Journal of Soil Research**, Australian, v. 47 , p. 321–327, 2009,

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

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

STREETER, J. G. Inhibition of legume nodule formation and N_2 -fixation by nitrate. **Critical Reviews in Plant Science**, London, v. 7, p. 1-23, 1988

TAMURA, K. et al. MEGA. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v. 24, p. 1596-1599, 2007.

TEDESCO, M. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2.ed. Porto Alegre : Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p. (Boletim técnico, 5).

TEDESCO, M. J. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2.ed. Porto Alegre : Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174p. (Boletim técnico, 5).

TRÜPER, H. G.; SCHLEIFER, K. Prokaryote Characterization and Identification. In: Dworkin, M. (Ed.). **The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria**. 3ª ed, v. 3. 2006. 959p.

UNKOVICH, M.J.; PATE, J.S. Symbiotic effectiveness and tolerance to early season nitrate availability in indigenous populations of subterranean clover rhizobia from SW Australian pastures. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 30, p. 1435-1443, 1998.

VAN BERKUM, P. ELIA, P. EARDLY, B. D. Multilocus sequence typing as an approach for population analysis of Medicago-nodulating rhizobia. **Journal of Bacteriology**, Oxford, v.15, p. 5570-7, 2006.

VELAZQUEZ, E. Symbiotic characteristics and selection of autochthonous strains of *Sinorhizobium meliloti* populations in different soils. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 31, p. 1039-1047, 1999.

VERSALOVIC, J. et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology** , v. 5, p. 25-40, 1994.

VESSEY, J. K; LUIT, B. The nitrate-tolerant symbiosis of *Glycine max* (L.) Merr, nts382 and *Bradyrhizobium japonicum* is also tolerant of ammonium. **Canadian Journal of Botany**, Canada, v. 77, p. 1432-1438, 1999.

VILLAR, M. del et al. Stable low molecular weight RNA profiling showed variations within *Sinorhizobium meliloti* and *Sinorhizobium medicae* nodulating different legumes from the alfalfa cross-inoculation group. **Microbiology Letter**. v. 282, p. 273–281, 2008.

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

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

WANG, F. Q. et al. *Mesorhizobium albiziae* sp. nov., a novel bacterium that nodulates *Albizia kalkora* in a subtropical region of China. **International**

Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Oxford, v. 57, p. 1192-1199, 2007.

WANG, F. Q. et al. *Mesorhizobium albiziae* sp. nov., a novel bacterium that nodulates *Albizia kalkora* in a subtropical region of China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 57, p. 1192-1199, 2007.

WEISBURG, W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Oxford, v. 173, p. 697–703, 1991.

WILLEMS, A. et al. Differences between subcultures of the *Mesorhizobium loti* type strain from different culture collections. **Systematic Applied Microbiology**, Oxford, n 24, v. 4, p. 549-553, 2001.

ZHU, Y.P. et al. Inoculation and nitrogen affect herbage and symbiotic properties of annual *Medicago* species. **Agronomy Journal**, New York, v.90, p.781-786, 1998.

CAPÍTULO V

SELEÇÃO A CAMPO DE RIZÓBIOS NATIVOS PARA CORNICHÃO

6.1 INTRODUÇÃO

Algumas espécies do gênero *Lotus* vêm sendo cultivadas no Rio Grande do Sul pelo seu potencial forrageiro, apresentando diversas vantagens que as tornam bem sucedidas, como melhor adaptabilidade a solos ácidos e crescimento em baixa disponibilidade de fósforo, fatores 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 (ACUÑA, 1998). Dentre as espécies de *Lotus*, o cornichão (*Lotus corniculatus* L.) tem sido apontado como uma das forrageiras mais promissoras para o uso no melhoramento de campos nativos no Rio Grande do Sul. A espécie *L. corniculatus* é uma leguminosa forrageira perene hiberno - primaveril, de origem européia e mediterrânea (SOSTER et al., 2004), com excelente adaptação no sul do Brasil, Uruguai, Argentina e Chile. Essa espécie é caracterizada pelo rápido crescimento inicial, boa produtividade, elevada qualidade de forragem e boa ressemeadura natural (BARRIENTOS et al., 2002).

A interação entre rizóbios e plantas leguminosas apresenta grande potencial na sustentabilidade da produção dos sistemas agropecuários devido às significativas entradas de nitrogênio no sistema solo-planta-animal, reduzindo a necessidade de fertilizantes nitrogenados e aumentando a disponibilidade de proteína para os animais. A espécie *L. corniculatus* normalmente estabelece associações efetivas com *Mesorhizobium* sp. (BARAIBAR et al., 1999), tendo sido observado grande variabilidade entre os isolados com relação à resposta da fixação biológica de nitrogênio (LABANDERA, 2004), tornando necessária a seleção de bactérias mais eficientes.

No entanto, pouco se conhece a respeito da interação entre *Lotus corniculatus* com os rizóbios nativos e as condições edafoclimáticas, visando

selecionar estirpes que sejam competitivas, tendo alta capacidade de nodular as raízes e fixar nitrogênio. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar interações eficientes entre rizóbio e *Lotus corniculatus* cv. São Gabriel em condições ambientais de campo e caracterizar geneticamente os isolados de rizóbio estudados

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Origem dos isolados e estirpes estudadas.

Os isolados de rizóbios foram obtidos da coleção de culturas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, tendo sido isolados por FRIZZO (2007). As estirpes recomendadas para produção comercial de inoculantes no o Brasil, SEMIA 816 e SEMIA 806, a estirpes recomendadas no Uruguai, U510 e o isolado U512, que esta sendo estudado no Uruguai, também foram estudadas nos experimentos para a seleção de rizóbios em cornichão. As estirpes foram obtidas no Centro de Fixação Biológica de Nitrogênio da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária, RS, Brasil

6.2.2 Seleção de rizóbios eficientes na fixação biológica de nitrogênio em *Lotus corniculatus*

O experimento foi conduzido na Estação Experimental Agronômica da UFRGS, em uma área de 300 m², em um Argissolo vermelho amarelo e conduzido durante o período de maio de 2007 a novembro de 2008. Foi realizada a análise química do solo e a adubação constou de uma aplicação de 120 kg.ha⁻¹ de P₂O₅ na forma de superfosfato triplo e 90 kg.ha⁻¹ de K₂O na forma de cloreto de potássio, com base nas recomendações de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (ROLAS, 2004). A semeadura foi realizada em maio de 2007, e a inoculação dos rizóbios feita com auxílio de um aspersor manual 15 dias após a semeadura para que não ocorresse favorecimento dos rizóbios inoculados, onde em cada parcela foram adicionados 500 mL de um caldo de meio Levedura Manitol Agar contendo um número 1x10⁸ células/mL de bactérias, sendo aplicados o equivalente de 1667L/ha de caldo. O experimento constitui-se de dois

tratamentos controle sem inoculação, sendo um com a adição de 320 Kg.ha⁻¹ de nitrogênio na forma de uréia. Aplicados 80 kg.ha⁻¹ de nitrogênio na semente e 80 kg.ha⁻¹ de nitrogênio após a cada corte, e outro sem a adição de nitrogênio. Os demais tratamentos foram inoculados com as estirpes SEMIA 816, recomendada para inoculação de *Lotus corniculatus* no Brasil, a estirpe U510, recomendada para inoculação de *Lotus corniculatus* no Uruguai e U512, em estudo no Uruguai, três rizóbios nativos obtidos da coleção de culturas da UFRGS (UFRGS Lc322, UFRGS Lc349, UFRGS Lc269) e um isolado (Iso. 7) obtido no trabalho de OLIVEIRA et al. (2007). O delineamento experimental empregado foi o de blocos ao acaso com quatro repetições. As parcelas eram de 3 m², com área útil de 1 m². As plantas foram cortadas a 10 cm do solo quando atingiram 5% da floração.

Aos 90 dias após a sementeira, coletou-se uma planta por parcela para determinação do número de nódulos radiculares. Para determinação da produção de massa seca da parte aérea foram realizados dois cortes em cada parcela quando as plantas atingiram 5% da floração. Com o auxílio de um quadro amostral de 0,5m², as plantas foram cortadas a 10 cm do solo. Desta amostra composta foi retirada uma subamostra e seu peso fresco determinado. As plantas coletadas foram submetidas à separação botânica e o material foi seco a 60°C até atingir um peso constante. Os cortes foram realizados em dezembro de 2007, fevereiro de 2008 e maio de 2008. Além deste parâmetro, também foi avaliado o teor de nitrogênio na parte aérea (TEDESCO et al., 1995). Os valores de nitrogênio acumulado foram utilizados para calcular o índice de eficiência relativa na fixação biológica de nitrogênio, conforme proposto por BROCKWELL et al. (1966) e definido através da seguinte expressão:

$$Ef(\%) = \frac{(N_{iso} - N_{T-N})}{(N_{T+N} - N_{T-N})} \times 100$$

Sendo: Ef(%) = eficiência relativa na fixação biológica de nitrogênio; N_{iso} = nitrogênio total do tratamento inoculado; N_{T+N} = nitrogênio total do controle com adição de nitrogênio; N_{T-N} = nitrogênio total do controle sem adição de nitrogênio.

6.2.3 Caracterização genética dos rizóbios

O DNA total das bactérias foi extraído usando-se o Wizard kit (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. A reação de rep-PCR foi realizada usando-se o oligonucleotídeo iniciador BOX A1 [5' CTACGGCAAGGCGACGCTGACG 3' (Versalovic et al., 1994)] e os oligonucleotídeos ERIC1-R (ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC) e ERIC-2R (AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG) (BRUIJN, 1992). Para a reação de PCR utilizou-se um volume de 25- μ l, contendo 50 ng de amostra de DNA, 1 U Taq DNA polimerase, 1 X tampão de Taq DNA polimerase, 15 mM MgCl₂, 200 mM dNTPs e 10 pmoles de cada oligonucleotídeo. A reação foi realizada num total de 37 ciclos, como segue: um ciclo inicial de desnaturação em 95°C por 7 min., 35 ciclos de desnaturação em 94°C por 1 min., anelamento em 53°C por 1 min., e extensão em 65°C por 8 min., e um ciclo final da extensão em 65°C por 16 min.

As reações foram realizadas em um termociclador (TECHNE TC – 512) e os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em cuba horizontal com tampão de TBE 0,5X (SAMBROOK et al., 2001). Como padrão de peso molecular foi utilizado o DNA do fago lambda clivado com as endonucleases de restrição EcoRI e HindIII. As amostras foram coradas com Blue Green (LGC Biotecnologia) e visualizadas sob luz ultravioleta e documentadas com equipamento de fotografia digital Kodak G2200. As bandas foram analisadas pelo programa Gelpro-3.2 (Media Cybernetics). O perfil de bandas no gel de agarose de BOX-PCR e de ERIC-PCR foi transformado em uma matriz binária bidimensional, onde 0 indica a ausência da banda e 1 a presença. O agrupamento foi realizado pelo programa PAST 1.69 (Palaeontological Statistics), usando o algoritmo UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with arithmetic mean) e o coeficiente de Jaccard.

A região de DNA do gene que codifica a porção 16S do ribossomo foi amplificada com os oligonucleotídeos 8F (AGAGTTTGATCCTTGGCTCAG) e 1492R (GACYTACCTTGTTACGACTT) (EDWARDS et al., 1989). Os ciclos empregados foram: um ciclo inicial a 95°C por 3 min., 35 ciclos de desnaturação em 94°C por 1 min., anelamento em 55°C por 1 min., e extensão em 72°C para 2 min., e um ciclo final de extensão em 72°C por 3 min. Os

fragmentos foram sequenciados usando o sistema de eletroforese por capilaridade MegaBace 500 (Amersham Biosciences). As sequências parciais da região 16S DNAr das estirpes homologas foram pesquisadas no GenBank com o programa BLAST 2.0, analisadas pelo algoritmo Megablast e usadas para a construção da árvore filogenética. As sequências selecionadas foram alinhadas pelo algoritmo ClustalW e as relações filogenéticas foram analisadas usando-se o método Neighbor-joining realizado pelo programa MEGA 4.0 (TAMURA et al., 2007).

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Fixação biológica de nitrogênio de isolados de rizóbio em cornichão

A maior produção de matéria seca acumulada nos três cortes foi obtida nas plantas inoculadas com o isolado UFRGS Lc322 e com a estirpe U510, sendo superior a das plantas dos tratamentos controle com e sem adição de nitrogênio e das inoculadas com a estirpe SEMIA 816. Os valores de matéria seca das plantas inoculadas com a estirpe SEMIA 816, U512 e com o isolado UFRGS Lc349 foram semelhantes ao das plantas do tratamento controle com adição de nitrogênio (Tabela 7.1).

As plantas inoculadas com o isolado UFRGS Lc322 e com a estirpe U510 apresentaram os maiores valores de nitrogênio total na parte aérea (Tabela 7.1), tendo fixado, respectivamente, 43 e 34 kg.ha⁻¹ a mais que o controle com adição de nitrogênio. O nitrogênio total acumulado na parte aérea das plantas inoculadas com a estirpe SEMIA 816 foi semelhante ao das plantas do tratamento controle com adição de nitrogênio. As plantas inoculadas com a estirpe U512 e com os isolados UFRGS Lc349 e Lc269 foram semelhantes ao das plantas controle sem a adição de nitrogênio. Os índices de eficiência relativa calculados para os tratamentos inoculados variaram de 4 a 225% (Tabela 7.1). O isolado UFRGS Lc322 e a estirpe U510 apresentaram maior índice de eficiência relativa. Não foram observadas diferenças significativas no número de nódulos, no entanto, nas plantas inoculadas com a estirpe U510 e o isolado UFRGS Lc322 foram encontrados 135 e 132 nódulos, respectivamente, apresentando cerca de 50% mais nódulos do que o observado nas plantas controle. As plantas inoculadas com o isolado UFRGS Lc349 apresentaram mais de 100 nódulos radiculares, mesmo tendo apresentado baixa produção de

matéria seca e baixo acúmulo de nitrogênio total, indicando que os nódulos eram ineficientes.

TABELA 7.1. Número de nódulos, nitrogênio total da parte aérea e eficiência relativa (ER) na fixação de nitrogênio em plantas de *Lotus corniculatus*, inoculadas com rizóbios, em 210 dias de cultivo. Porto Alegre, 2011.

	Massa Seca ----- kg.ha.-----	Nitrogênio Total	Número de Nódulos	ER %
T+N	7212 b	90 b	61	100
U 510	9879 a	124 a	135 ns	175
UFRGS Lc322	9507 a	133 a	132	225
Iso.7	6851 b	97 b	85	80
UFRGS Lc269	6696 b	57 c	88	8
U 512	6317 c	70 c	99	8
SEMIA 816	5727 c	80 b	91	45
UFRGS Lc349	5002 c	64 c	109	4
T-N	5608 c	68 c	65	0
CV (%)	24,5	13,4	78,3	

T + N = Tratamento controle com adição de nitrogênio; T – N = Tratamento controle sem adição de nitrogênio. ns: Não significativo a 5% de probabilidade de erro.*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

6.3.2 Caracterização genética dos rizóbios isolados de cornichão.

O polimorfismo observado pela análise de rep-PCR, realizado nos isolados testados a campo, possibilitou a construção de um dendograma de similaridade genética (Figura 7.1) no qual foi possível se distinguir 2 grupos com base nos valores de similaridade. O isolado UFRGS Lc349 apresentou uma similaridade de 42% com os rizóbios do grupo B em relação ao polimorfismo de bandas com os oligonucleotídeos iniciadores BOXA e ERIC. O grupo B apresentou dois subgrupos, B1 e B2, com uma similaridade de aproximadamente 60%. O grupo B1 foi formado pelo isolado UFRGS Lc322 e a

estirpe U510 e o Grupo B2 pelas estirpes SEMIA 806, SEMIA 816 e U512 e o isolado UFRGS Lc269. Observou-se também que, nas condições do experimento, não foram obtidos isolados com 100 % de similaridade com qualquer das estirpes estudadas, indicando que os micro-organismos não são reisolamento das estirpes recomendadas.

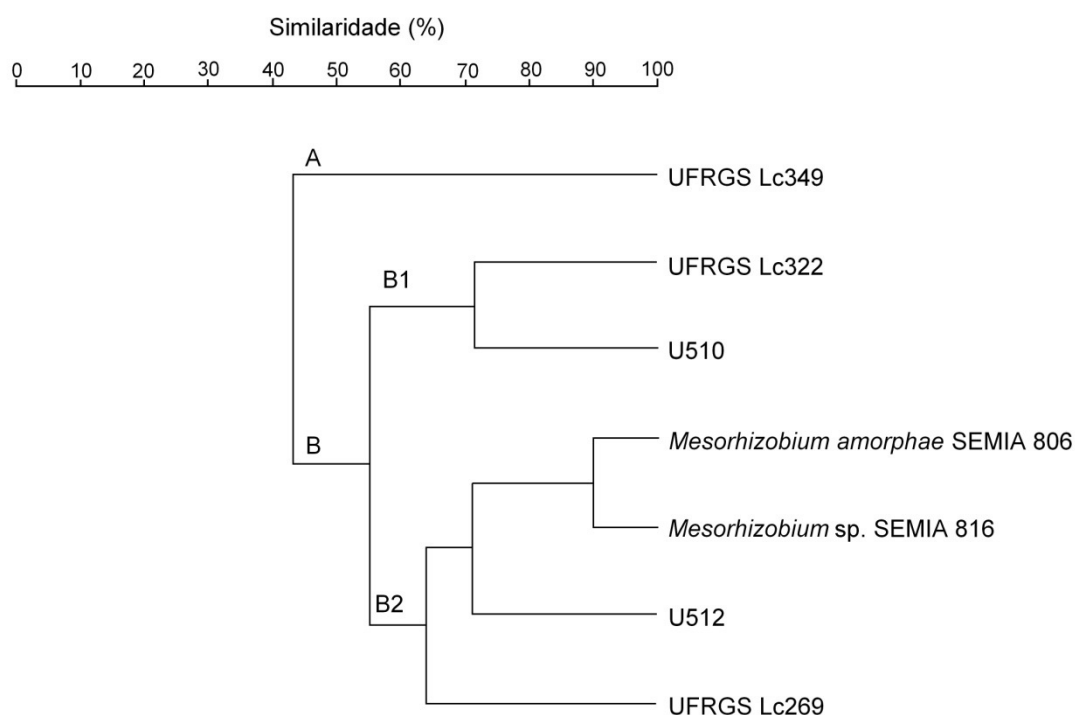


Figura 7.1.. Dendrograma de genotipagem de estirpes e isolados de rizóbios para *L. corniculatus*. Agrupamento obtido por UPGMA, utilizando-se o coeficiente de Jaccard, para perfil de bandas obtido a partir da reação de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores BOX A 1-R + ERIC1-R e ERIC-2.

6.3.3 Análise filogenética dos isolados promissores.

A região 16S DNAr foi amplificada por PCR e o produto gerado apresentou um tamanho de banda de aproximadamente 1000 bp para todas as bactérias analisadas (Tabela 7.2). Fragmentos com esse tamanho têm sido

considerados suficientes para se realizar a identificação correta de procaríotos (TRÜPER & SCHLEIFER, 2006), por compreender quase todo o tamanho esperado do gene 16S do DNA (WEISBURG et al., 1991). O sequenciamento da região 16S DNAr dos isolados dos rizóbio estudados a campo em *L. corniculatus*, permitiu a construção de uma árvore filogenética, que revelou a formação de quatro grandes grupos, um formado com os isolados UFRGS Lc269, Lc322 e Lc349. Os outros três grupos foram formados pelas sequências obtidas no banco de dados do GenBank e usadas na comparação, compreendendo os gêneros *Sinorhizobium*, *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (Figura 7.2). Quando comparadas as sequências ao banco de dados do GenBank, os isolados foram atribuídos ao gênero *Mesorhizobium*, com similaridade superior a 95%, para UFRGS Lc269, UFRGS Lc322 e UFRGS Lc349.

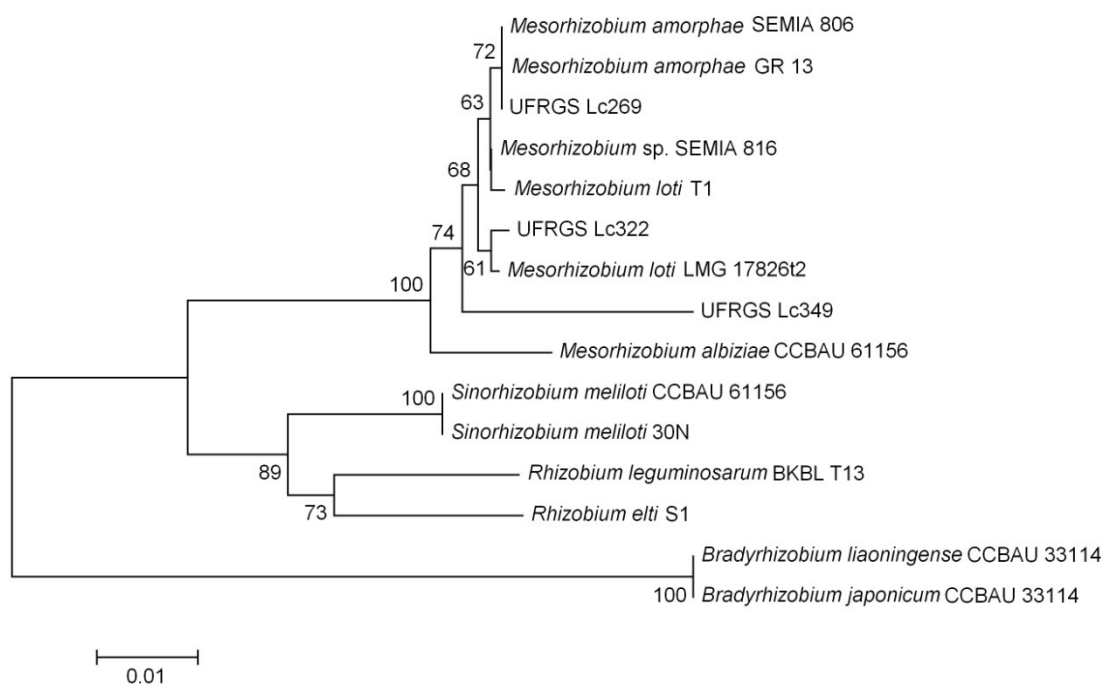


Figura 7.2. Árvore filogenética baseada na análise *Neighbor-joining* da região 16S DNAr de isolados de rizóbio e sequências homólogas obtidas. O número representa as ramificações do valor de 1000 reamostragens (*bootstrap*).

O isolado UFRGS Lc322 apresentou uma maior relação filogenética com as espécies *M. loti*, mostrando uma identidade de 98,6% com a estirpe *M. loti* LMG 17826t2 (WANG et al., 2009). O grupo formado pelo isolado UFRGS Lc269 indicou uma relação filogenética com a espécie *M. amorphae*. Foi observada uma elevada similaridade da região 16S do DNAr para o isolado UFRGS Lc269 em relação à estirpe SEMIA 816, contudo a análise de rep-PCR indicou que esse isolado apresenta um perfil genético diferente da estirpe recomendada para produção de inoculante de cornichão no Brasil (Figura 7.1).

O isolado UFRGS Lc 349 foi agrupado no gênero *Mesorhizobium* com uma similaridade de 97%. Estes resultados indicam uma heterogeneidade encontrada entre os rizóbios estudados simbiotes em *L. corniculatus*, que podem ser de outras espécies distintas de *M. loti*, que vem sendo descrita tradicionalmente como principal espécie simbiote em cornichão (BARRIENTOS et al., 2002; BROCKWELL et al., 1994). Resultados semelhantes também têm mostrado que existe uma maior diversidade de espécies de rizóbios simbiotes em *L. corniculatus*, além de *M. loti*. (LORITE et al. 2010) e a espécie *M. amorphae* vem sendo apontada como simbiote em cornichão (BINDE et al., 2009).

6.4 CONCLUSÕES

1. O isolado de rizóbio nativo UFRGS Lc322 e a estirpe U510 são mais eficientes na fixação biológica de nitrogênio, em condições de campo, do que a estirpe SEMIA 816, recomendada para cornichão no país.
2. O isolado UFRGS Lc322 pode ser indicado para o grupo de elite de estirpes usadas para produção de inoculantes.
3. Os rizóbios isolados de *Lotus corniculatus* testados a campo não apresentam características genéticas das estirpes recomendadas para cornichão.
4. Os isolados estudados apresentaram relação filogenética com o gênero *Mesorhizobium*.

6.5 REFERÊNCIAS

ABOU-SHANAB, R. A. et al. Characterization of Ni-resistant bacteria in the rhizosphere of the hyperaccumulator *Alyssum murale* by 16S rRNA gene sequence analysis. **World Journal Microbiology of Biotechnology**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 101-108, 2010.

ACUÑA, H. Comparación de variedades de tres especies del género *Lotus* (*L. corniculatus* L., *L. uliginosus* Cav. y *L. tenuis* Wald et Kit.) en suelos de aptitud arrocera. **Agricultura Técnica**, Chile, v. 58, p. 7-14, 1998.

BARAIBAR, A. et al. Symbiotic effectiveness and ecological characterization of indigenous *Rhizobium loti* populations in Uruguay. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.34, n.6, p. 1011-1017, 1999.

BARRIENTOS, L. et al. Efectividad simbiótica de cepas naturalizadas de *Mesorhizobium loti* y *Bradyrhizobium* sp. (*Lotus*) en plantas de tres especies del género *Lotus*. **Agricultura Técnica**, Chile, v.62, n.2, p. 226-236, 2002.

BAYMIEV, A. K. et al. Genetic diversity of Rhizobia nodulating *Lathyrus tuberosus* L. growing in Bashkortostan (Russia) **Archives of Microbiology**, Moscow, v. 191, p. 138-144, 2010.

BECERRA-CASTRO, C. et al. Endophytic and rhizoplane bacteria associated with *Cytisus striatus* growing on hexachlorocyclohexane-contaminated soil: isolation and characterization. **Plant and Soil**, London, v. 340, n. 2, p. 413-433, 2011.

BINDE, D. R. et al. rep-PCR fingerprinting and taxonomy based on the sequencing of the 16S rRNA gene of 54 elite commercial rhizobial strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 83, n. 5, p. 897-908, 2009.

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

BRUIJN, F.J. Use of repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria.

Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 58, p. 2180-2187, 1992.

EDWARDS, U. et al. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes: characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. **Nucleic Acids Res**, Oxford, v. 17, p. 17:7843–7853, 1989.

ESTRELLA, M. J. et al. Genetic diversity and host range of rhizobia nodulating *Lotus tenuis* in typical soils of the Salado River Basin (Argentina). **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 75, n. 4, p. 1088-98, 2009.

FERNANDES, M. F. et al. Genetic characterization of indigenous rhizobia strains from the coastal tableland efficient for the pigeonpea and cowpea crops. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, p. 908-920, 2003.

FERREIRA, D. F. **Sistemas de análises estatística para dados balanceados**. Lavras:UFLA/DEX/SISVAR, 2000. 145p.

FONTOURA, R. **Seleção de rizóbios nativos, de solos do Rio grande do Sul, para *Lotus glaber* e *Lotus subbiflorus***. 2008. 87 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

FRIZZO, M. L. dos S. **Seleção e caracterização de rizóbios nativos, de solos do Rio Grande do Sul, para *Lotus corniculatus* L. e *Lotus uliginosus* Schkuhr**. 83f. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

HAN, L. L. et al. Bradyrhizobium spp. and Sinorhizobium fredii are predominant in root nodules of *Vigna angularis*, a native legume crop in the subtropical region of China. **Journal of Microbiology**, Oxford, v. 47, n. 3, 287-296, 2009.

KOLLING, J., et al. Seleção de estirpes de *Rhizobium* para trevo subterrâneo, alfafa e cornichão. **Agronomia Sulriograndese**, Porto Alegre, v.19, p.103-111, 1983.

KORNELIUS, E., et al. Influência do calcário na eficiência e sobrevivência de estirpes de *Rhizobium trifolii* em trevo subterrâneo (*Trifolium subterraneum* L.cv.Mout Barker). **Agronomia Sulriograndese**, Porto Alegre, v.3, p.95-109, 1972.

LABANDERA, C. **Colección Nacional de Cepas de *Rhizobium* spp. Ministerio de Ganaderia, Agricultura y Pesca. Departamento de Microbiología de Suelos. Montevideo** – Uruguay, 2004. Disponível em: <http://www.chasque.net/microlab/LMSCI/TraTe/metaplic.htm>. Acesso em 12 de fevereiro de 2007.

LAGUERRE, G. et al. Compatibility of Rhizobial Genotypes within Natural Populations of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* for nodulation of host legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 4, p. 2276-2283, 2003.

LIU, J. et al. Mixture of endophytic *Agrobacterium* and *Sinorhizobium meliloti* strains could induce nonspecific nodulation on some woody legumes. **Archives of Microbiology**, Moscow, v. 192, n. 3, p. 229-234, 2010.

LORITE, M. J. et al. Characterization of Strains unlike *Mesorhizobium loti* That Nodulate *Lotus* spp. in Saline Soils of Granada, Spain. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 12, p. 4019-4026, 2010.

MARTENS, M. et al. Multilocus sequence analysis of Ensifer and related taxa. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Washington, v. 57, n. 3, p. 489-503, 2007.

MONZA, J. E. et al. Denitrification ability of rhizobial strains isolated from *Lotus* sp. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Paris, v. 85, p. 229 – 235, 2006.

OLIVEIRA, A. M. R. et al. Caracterização genética de rizóbios isolados de *Lotus corniculatus*. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 13, p. 23-27, 2007.

ROLAS. **Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 10 ed. Porto Alegre: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo – Núcleo Regional Sul. 2004. 394p.

SANTILLANA VILLANUEVA, N. L. **Avaliação de estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* para a produção de inoculantes para trevo vermelho (*Trifolium pratense*)**. 97f. 1995. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1995.

SOSTER, M. T. B. et al. Caracterização Agronômica de Genótipos de Cornichão (*Lotus corniculatus* L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.33, n.6, p.1662-1671, 2004.

TAMURA, K. et al. **MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution**, Washington, v 24, p. 1596-1599, 2007.

TEDESCO, M. J. et al. **Análise de solo, planta e outros materiais**. 2.ed. Porto Alegre:UFRGS/DS. 1995. 443p.

TRÜPER, H. G.; SCHLEIFER, K. Prokaryote Characterization and Identification. In: Dworkin, M. (Ed.). **The Prokaryotes A Handbook on the Biology of Bacteria**. 3^a ed, v. 3. 2006. 959p.

VERSALOVIC, J. et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequencebased polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 5, p. 25-40, 1994.

WANG, F. Q. et al. *Mesorhizobium albiziae* sp. nov., a novel bacterium that nodulates *Albizia kalkora* in a subtropical region of China. **International**

Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Oxford, v. 57, p. 1192-1199, 2007.

WILLEMS, A. et al. Differences between subcultures of the *Mesorhizobium loti* type strain from different culture collections. **Systematic Applied Microbiology**, Washington, n 24, v. 4, p. 549-553, 2001.

YOUNG, J. M. et al. Diversity of 16S rRNA sequences of *Rhizobium* pp. implications for species determinations. **FEMS Microbiology Letters**, Washington, v. 238, p. 125–131, 2004.

7. CONCLUSÕES GERAIS

Nesse trabalho foi realizada a seleção de rizóbios considerando-se além das características de eficiência na fixação biológica de nitrogênio, novos potenciais biotecnológicos, como a produção de ácido indol-acético e a solubilização de fosfato, e a tolerância a condições edáficas desfavoráveis. Neste trabalho foi possível encontrar rizóbios simbiotes a alfafa e cornichão mais eficientes na fixação biológica de nitrogênio, que possuem potencial para serem incluídos no grupo de elite de micro-organismos recomendados para leguminosas no Brasil.

O isolamento de rizóbios de *Medicago sativa* possibilitou a obtenção de um grande grupo de micro-organismos que apresentaram variabilidade fenotípica e características que possuem potencial biotecnológico importante na seleção de rizóbios. Foram encontrados rizóbios autóctones nos solos do Rio Grande do Sul que apresentam características genéticas distintas das estirpes recomendadas para a produção de inoculantes em alfafa, sendo possível identificar esses micro-organismos nas espécies *Sinorhizobium meliloti* e *Rhizobium* sp. Dentre os micro-organismos isolados houve um predomínio de rizóbios produtores de melanina, sendo que foi possível encontrar micro-organismos solubilizadores de fosfato, produtores de ácido indol-acético e resistentes a baixos valores de pH e alumínio tóxico. Dos micro-organismos selecionados para os ensaios de produção de AIA, todos produziram substâncias equivalentes ao ácido indol-acético sendo que a associação entre rizóbios e arroz acelerou o processo de germinação das sementes de arroz e o crescimento das plântulas de arroz.

Nos trabalhos seleção de rizóbios para alfafa e cornichão, foi possível selecionar o isolado UFRGS Ms98, sendo esse microrganismo mais eficiente na fixação biológica de nitrogênio em plantas de alfafa para a variedade Crioula em ensaios em casa de vegetação do que as estirpes

liberadas para a produção de inoculantes para *Medicago sativa*. O ensaio a campo de eficiência de rizóbios para cornichão possibilitou a seleção do isolado UFRGS Lc322 e a estirpe U510 como mais eficientes na fixação biológica de nitrogênio, em condições de campo, do que a estirpe SEMIA 816, recomendada para cornichão no país e estes dois rizóbios podem ser indicados para o grupo de elite de estirpes usadas para produção de inoculantes. No estudo de efeito do nitrogênio na simbiose de rizóbios em alfafa, o aumento da dose de nitrogênio afetou a interação entre rizóbio e alfafa, sendo que as doses de nitrogênio influenciaram os parâmetros massa seca de nódulos e número de nódulos, no entanto foi possível selecionar o isolado UFRGS Ms208 como sendo mais tolerante ao nitrogênio mineral.

A caracterização genética dos isolados, usando os oligonucleotídeos BOX e ERIC mostrou que existe variabilidade genética entre os rizóbios estudados e nenhum isolado foi obtido com 100 % de similaridade com qualquer das estirpes estudadas, demonstrando que este grupo de micro-organismos isolados é uma potencial fonte para prospecção de novas estirpes de rizóbio mais eficientes. A identificação dos isolados pelo sequenciamento da região 16S DNA ribossomal mostrou que os micro-organismos pertencem a espécie *Sinorhizobium meliloti*, sendo que os isolados UFRGS Ms72, Ms75 e UFRGS Ms55 foram identificados como pertencentes ao gênero *Rhizobium*.

8. ANEXO

Anexo I. Coordenadas geográficas dos locais de coleta de solo.

Local de coleta	Coordenadas Geográficas	
Erechim	27°37'25" S	52°12'27" O
Passo Fundo	28°15'29" S	52°23'32" O
Santa Rosa	27°47'07" S	54°32'04" O
Roque Gonzales	28°06'09" S	55°02'25" O
São Luiz Gonzaga	28°19'41" S	54°58'06" O
Bom Jesus	28°38'38" S	50°26'00" O
Caxias do Sul	29°05'07" S	51°09'59" O
Santa Maria	29°42'41" S	53°45'57" O
Nova Petrópolis	29°22'15" S	51°09'22" O
Canguçu	31°20'15" S	54°40'11" O
Dom Pedrito	30°58'33" S	54°36'33" O

ANEXO II. Solução Nutritiva (Sarruge, 1975).

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

Obs.: O nitrogênio é adicionado usando-se uma solução de 20 g de NH₄NO₃ por litro.

O componente CuCl₂ foi substituído por CuSO₄ · 5H₂O, preservando-se a proporção do elemento Cobre.

Retirou-se MnCl₂ · 4H₂O, pois a areia utilizada nos vasos Leonard contém Mn.

Componentes com Potássio devem ser adicionados por último, para evitar precipitação.

O pH da solução foi ajustado em torno de 6,0.

Para elaboração de meio semi-sólido, acrescentar 7 g de ágar por litro de meio.

ANEXO III. Meio extrato de levedura-manitol. LM (Vincent, 1970).

Manitol.....	10,0 g
K ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,2 g
NaCl.....	0,1 g
Extrato de levedura.....	0,5 g
Água destilada.....	1000 mL

Obs.: Para elaboração de meio sólido, acrescentar 15 g de ágar por litro de meio. Ajustar pH para 6,8.

* Para formular o meio extrato de levedura-manitol-vermelho congo (LMV), adicionar 10 mL de vermelho congo (solução de 250 mg de vermelho congo em 100 mL de água destilada) em 1 L de meio LM.

ANEXO IV. Meio extrato de levedura-triptona (TY) (Somasegaram & Hoben, 1994).

Triptona.....	5,0 g
Extrato de levedura.....	3,0 g
CaCl ₂ · H ₂ O.....	0,87g
Água destilada.....	1000 mL

Obs.: Ajustar pH para 6,8.

ANEXO V. Nodulação de alfafa inoculada com rizóbios e estirpes em diferentes concentrações de nitrogênio.

Isolados	0	1,25	2,5	5	10	15	30
	----- mM de N-NH ₄ NO ₃ .-----						
SEMIA116	+	+	+	-	-	-	-
SEMIA134	+	-	-	-	-	-	-
SEMIA135	+	+	+	-	-	-	-
UFRGS Ms194	+	-	-	-	-	-	-
UFRGS Ms195	+	+	+	+	+	-	-
UFRGS Ms204	+	+	+	-	-	-	-
UFRGS Ms208	+	+	+	+	+	-	-
UFRGS Ms22	+	-	-	-	-	-	-
UFRGS Ms26	+	-	-	-	-	-	-
UFRGS Ms32	+	+	+	+	-	-	-
UFRGS Ms513	+	+	-	-	-	-	-
UFRGS Ms57	+	+	+	+	+	-	-
UFRGS Ms63	+	-	-	-	-	-	-
UFRGS Ms67	+	+	-	-	-	-	-
UFRGS Ms72	+	-	-	-	-	-	-
UFRGS Ms75	+	-	-	-	-	-	-
UFRGS Ms81	+	+	+	+	+	-	-
UFRGS Ms95	+	-	-	-	-	-	-
UFRGS Ms98	+	+	+	+	-	-	-

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BACANAMWO M.; HARPER J. E. The feedback mechanism of nitrate inhibition of nitrogenase activity in soybean may involve asparagines and/or products of its metabolism. **Physiologia Plantarum**, Helsinki, v. 100, p. 371-377. 1997.

BARAIBAR, A. et al. Symbiotic effectiveness and ecological characterization of indigenous *Rhizobium loti* populations in Uruguay. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 34, n. 6, p. 1011-1017, jun. 1999.

BRONDANE, M. A. A. S. **Utilização de marcadores fonológicos para utilização de alfafa precoce com aptidão ao pastejo e fixação biológica de nitrogênio**. 2009. 230 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Zootecnia. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

CARROLL B. J.; MATHEWS, A. Nitrate inhibition of nodulation in legumes. In: GRESSHOFF, P. M. **Molecular biology of symbiotic nitrogen fixation**. California: Crc Press, 1990. p. 159-180.

CHAPAVAL, L. et al. Detecção de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* pela técnica de Rep-PCR no monitoramento da qualidade do leite de cabra em sala de ordenha. **Comunicata Scientiae**, Bom Jesus, v. 1, n. 1, p. 49-56, 2010.

CHUEIRE, L. M. O. et al. Identificação das estirpes de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* utilizadas em inoculantes comerciais para as culturas da soja e do feijoeiro pela técnica de PCR com “primers” aleatórios ou específicos. **Agricultura Tropical**, Cuiabá, v. 4, p. 80-95, 2000.

LAJUDIE, P. et al. Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium sahari* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Amsterdam, v. 44, n. 4, p. 715-733, 1994.

FREIRE, J. R. J. Fixação do nitrogênio pela simbiose rizóbio/leguminosas. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. (Ed.). **Microbiologia do Solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. Cap. 9. p. 121-140.

GAGE, D. J. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing, rhizobia during nodulation of temperate legumes. **Microbiology and Molecular Biology Review**, Washington, v. 68, p. 280–300, 2005.

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

GORDON A. J. et al. Short-term metabolic response of soybean root nodules to nitrate. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, p. 423-428. 2002.

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

GUERTS, R.; FEDOROVA, E.; BISSELING, T. Nod factor signalling genes and their function in the early stages of Rhizobium infection. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 8, n. 4, p. 346-352. 2005.

HADADD, C. M.; CASTRO, F. G. G. Sistemas de produção. In: SIMPÓSIO SOBRE O MANEJO DA PASTAGEM, 16., 1999, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1999. p. 7-22.

HAMEED, S. et al. *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* and *Agrobacterium* strain isolated from cultivated legumes. **Biology Fertility Soils**, Berlin, v. 39, p. 179-185, 2004.

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 Amazônica**, Manaus, v. 34, n. 3, p. 343-357. 2004.

HUNGRIA, M. et al. Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brazil. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v. 33, p.1349-1361. 2001.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brasil. **Field Crops Research**, Saint Paul, v. 65, n. 1, p. 151-164, 2000.

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

KEYSER, H. H.; VAN BERKUM, P.; WEBER, D. F. A comparative study of the physiology of symbiosis formed by *Rhizobium japonicum* with *Glycine max*, *Vigna unguiculata*, and *Macroptilium atropurpureum*. **Plant Physiology**, Washington, v. 70, n. 1, p. 1626-1630, 1982.

KHALID, A.; ARSHAD, M.; ZAHIR, Z. A. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. **Journal Applied Microbiology**, Malden, v. 96, p. 473-480, 2004.

LABANDERA, C. **Metodologias aplicadas a la evaluación de Rhizobios para inoculantes para leguminosas forrajeras em Uruguay**. Montevideo: Departamento de Microbiologia de Suelos, 2004.

LAGUERRE G. et al. Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. **Microbiology**, Washington, v. 147, p. 981-993, 2001.

LAL, R. The role of no-till farming in sustainable agriculture in tropics. In: ENCONTRO LATINOAMERICANO SOBRE PLANTIO DIRETO NA PEQUENA PROPRIEDADE, 1., 1993, Ponta Grossa. **Anais...** Ponta Grossa: IAPAR, 1993. p. 62.

MENNA P. et al. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 29, p. 315-332, 2006.

MOREIRA, F. M. M.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2006. 726 p.

NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, G. Ecologia de Bactérias Diazotróficas de Solos Tropicais. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed.) **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA – CNPMA, 1998. p. 15-60.

NUERNBERG, N. J.; MILAN, N. A.; SILVEIRA, C. A. M. **Manual de produção de alfafa**. Florianópolis: Empresa de Pesquisa Agropecuária E Difusão De Tecnologia de Santa Catarina, 1992. 102 p.

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

PETERSON, P. R.; SHEAFFER, C. C. **Drought Effects on Perennial Forage Legume Yield and Quality**. **Agronomy Journal, Madison**, v. 84, p. 777 – 779. 1992.

PRESTES, N. E.; JACQUES, A. V. A. Sobressemeadura do Cornichão (*Lotus corniculatus* L.) cv. São Gabriel em pastagem natural – diferimento e adubação. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 1, n. 2, p. 73-81, 2002.

RACCA, R. et al. Alfalfa symbiotic dinitrogen fixation in the Argentine Pampean Region. In: NORTH AMERICAN ALFALFA IMPROVEMENT CONFERENCE, 36., Bozeman, Montana, 1998. **Proceedings...** Bozeman, Montana, 1998. p. 71.

RASSINI, J. B. et al. **A alfafa (*Medicago sativa* L)**. Disponível em: <www.cnpqgl.embrapa.br/pastprodtextos/folha13.html>. Acesso em: 9 dez. 2010.

RIVAS, R. et al. A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) druce.

Applied Environmental Microbiology, Washington, v. 68, n. 11, p. 5217–5222, 2002.

SCHOLLA, M. H.; ELKAN, G. H. *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Amsterdam, v. 34, n. 3, p. 484-486, 1984.

SIKORA, S.; REDZEPOVIC, S. Genotypic characterisation of indigenous soybean rhizobia by PCR-RFLP of 16S rDNA, rep-PCR and RAPD analysis. **Food Technology Biotechnology**, Zagreb, v. 41, n. 1, p. 61-67. 2003.

SOSTER, M. T. B. et al. Caracterização agronômica de genótipos de cornichão (*Lotus corniculatus* L.) **Revista Brasileira Zootecnia**, Viçosa, v. 33, n.6, p. 1662-1671, 2004.

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

STREETER, J. G. Inhibition of legume nodule formation and N₂-fixation by nitrate. **Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v. 7, p. 1-23. 1988.

STROSCHEIN, M. R. et al. Symbiotic efficiency and genetic characteristics of *Bradyrhizobium* sp. strain UFSM LA 1.3 isolated from *Lupinus albus* (H. et Arn). **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 67, n. 6, p. 702-706. 2010.

THOMAS, R. J. Role of legumes in providing N for sustainable tropical pasture systems. **Plant and Soil**, London, v. 174, p. 103-118. 1995.

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

TRUJILLO; M. E. et al. Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobacytrum lupini* sp. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 3, p. 1318-1327, 2005.

VAN BERKUM, P.; EARDLY, B. D. The aquatic budding bacteria *Blastobacter denitricans* is a nitrogen fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 29, n. 3, p. 207-215, 2002.

VANDAMME, P. et al. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov., nodulate the roots of tropical legumes. **Systematic and Applied Microbiology**, Washington, v. 25, n. 4, p. 507-512, 2002.

VARGAS, L. K. et al. Occurrence of plant growth-promoting traits in clover-nodulating rhizobia strains isolated from different soils in Rio Grande do Sul

state. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 33, p. 1227-1235, 2009.

VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. **Biologia dos solos dos cerrado**. Planaltina: EMBRAPAC, 1997. 524 p.

VESSEY J. K.; WATERER, J. In search of the mechanism of nitrate inhibition of nitrogenase activity in legume nodules: recent developments. **Physiologia Plantarum**, Helsinki, v. 84, p. 171-176, 1992.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 255, p. 571-586, 2003.

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

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

WILLEMS A. The taxonomy of rhizobia: an overview. In: VELAZQUEZ, E; BARRUECO, C. (Ed.) **First international meeting on microbial phosphate solubilization**. Berlin: Springer, 2007. p. 314

YOUNG, J. M. The genus name *Ensifer* Casida 1982 takes priority over *Sinorhizobium* Chen et al. 1988, and *Sinorhizobium morelense* Wang et al. 2002 is a later synonym of *Ensifer adhaerens* Casida 1982. Is the combination '*Sinorhizobium adhaerens*' (Casida 1982) Willems et al. 2003 legitimate? Request for an Opinion. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, California, v. 53, n. 6, 2107-2110, 2003.

ZAHARAN, H. H. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. **Microbiology and molecular biology reviews**, New York, v. 63, n. 9, p. 968-989, 1999.

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

ZHU, Y. P. Inoculation and nitrogen affect herbage and symbiotic properties of annual *Medicago* species. **Agronomy Journal**, Madison, v. 90, p. 781-786, 1998.

10 RESUMO BIOGRÁFICO

Marcos Roberto Dobler Stroschein nasceu em Ijuí, Rio Grande do Sul, Brasil, em 03 de julho de 1981. É filho de Ivo Arnildo Stroschein e Tânia Rejane Dobler Stroschein. De 1987 a 1995, cursou o primeiro grau na Escola Estadual Oswaldo Aranha, e de 1996 a 1998, o segundo grau, na Escola Estadual de Segundo Grau Rui Barbosa. Em 2000 ingressou no curso de Agronomia, na Universidade Federal de Santa Maria. Durante a graduação foi monitor da disciplina de Melhoramento Vegetal e Microbiologia Agrícola, no curso de Agronomia, bolsista PIBIC CNPq, no laboratório de Melhoramento Vegetal e Cultura de Tecidos do Departamento de Fitotecnia da UFSM e posteriormente bolsista FIPE no laboratório de Microbiologia do Solo e do Ambiente do Departamento de Solos da UFSM. Recebeu o título de Engenheiro Agrônomo em dezembro de 2004 e de março de 2005 a fevereiro de 2007 cursou o Mestrado em Ciência do Solo, na Universidade Federal de Santa Maria, sob a orientação do Professor Flávio Luiz Foletto Eltz, na área de Manejo do Solo e Biodinâmica. Em março de 2007 ingressou no curso de Doutorado, do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na área de Biologia e Bioquímica do Solo, sob a orientação do Professor Enilson Luiz Saccol de Sá. Em Junho de 2010 foi aprovado como Professor do Instituto Federal de Santa Catarina, onde é professor de Microbiologia e Bioquímica. Atualmente é membro da Sociedade Brasileira de Microbiologia.