

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

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE RIZÓBIOS NATIVOS, DE
SOLOS DO RIO GRANDE DO SUL, PARA *Lotus corniculatus* L.
e *Lotus uliginosus* Schkuhr.**

Marcio Leandro dos Santos Frizzo
(Dissertação)

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

**SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE RIZÓBIOS NATIVOS, DE
SOLOS DO RIO GRANDE DO SUL, PARA *Lotus corniculatus* L.
e *Lotus uliginosus* Schkuhr.**

MÁRCIO LEANDRO DOS SANTOS FRIZZO
Engenheiro Agrônomo (UFRGS)

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

Porto Alegre (RS),
Setembro de 2007

Dedico este trabalho aos meus pais,
por todo esforço, dedicação e apoio na
educação de seus filhos.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Enilson Luiz Saccol de Sá, por toda dedicação e empenho na orientação, pelas lições de vida e pela amizade.

Ao professor Flavio A. de Oliveira Camargo, pela oportunidade de orientação no início do curso e na iniciação científica.

Aos colegas Benjamin Osório Dias Filho, Andressa de Oliveira Silveira, Adriana Giongo, Brenda Tonon, Luiz Fernando Roesch, Andréia Binz, Mariel Bizarro, Marta Coutinho da Silva, Rodrigo Jacques, Clarissa Bergamaschi e Janine Viezzer Nascimento. Amigos com quem eu tive a satisfação de trabalhar e dividir as dependências do Laboratório de Microbiologia do Solo e que, de alguma forma, deram sua contribuição na minha formação.

Ao amigo Ricardo de Albuquerque Fontoura, pelo empenho no trabalho e pela amizade.

Aos funcionários e amigos Márcio da Silva Silveira, Luis Antonio da Silveira, José (Zé), Jader e Adão Ramos dos Santos, pela grande ajuda ofertada.

Ao professor Miguel Dall' Agnol, do Departamento de Plantas Forrageiras, pela concessão das sementes e pelo auxílio.

Ao pesquisador da FEPAGRO Luciano Kayser Vargas, pela colaboração na execução do trabalho.

Aos professores e colegas do Curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo e Microbiologia Agrícola e do Ambiente, pelos ensinamentos e pela convivência.

Ao CNPq e ao Projeto LOTASSA, pela concessão de bolsa e auxílio financeiro ao projeto.

Aos meus pais e meus irmãos, pelo amor e apoio que vocês sempre me dedicaram.

À Vanessa, pelo amor, compreensão e apoio.

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

SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE RIZÓBIOS NATIVOS, DE SOLOS DO RIO GRANDE DO SUL, PARA *Lotus corniculatus* L. e *Lotus uliginosus* Schkuhr.⁽¹⁾

Autor: Márcio Leandro dos Santos Frizzo

Orientador: Enilson Luiz Saccol de Sá

RESUMO

Leguminosas forrageiras como espécies de *Lotus*, adaptadas às condições ambientais nos estados do sul do Brasil, podem ser uma alternativa importante para aumentar o fornecimento de forragem de alto teor protéico para o gado além de ter boa adaptabilidade a solos de baixa fertilidade. Uma das vantagens do uso de leguminosas forrageiras é a obtenção de nitrogênio a partir da simbiose com bactérias diazotróficas como os rizóbios. Este trabalho objetivou o isolamento, a caracterização e a seleção de rizóbios autóctones, eficientes na fixação simbiótica de nitrogênio em plantas de *Lotus corniculatus* L. e *Lotus uliginosus* Schkuhr, a partir de amostras de solo de oito localidades do Rio Grande do Sul. Foram obtidos 525 isolados de rizóbios em plantas de *Lotus corniculatus* e 65 em *Lotus uliginosus*. Estes isolados foram avaliados quanto à morfologia colonial e 30 destes foram avaliados quanto à eficiência na fixação de nitrogênio em simbiose com plantas, em cultivo em casa de vegetação, produção de melanina e caracterizados geneticamente por comparação do perfil eletroforético dos produtos de amplificação do DNA genômico, pela reação em cadeia da polimerase com os oligonucleotídeos iniciadores BOX e ERIC. Nenhum dos isolados estudados produziu melanina. Com base na eficiência na fixação de nitrogênio, quatro isolados de rizóbios para *L. corniculatus* foram considerados mais eficientes na fixação de nitrogênio do que as estirpes SEMIA 806 e SEMIA 816, com índice de eficiência relativa de 23 a 43%, e apenas o isolado UFRGS Lc299 igualou-se à estirpe U510, com índice de eficiência relativa de 43%. Em *L. uliginosus* onze isolados foram mais eficientes do que as estirpes SEMIA 822 e SEMIA 839, com Índice de eficiência relativa de 22 a 95%. Na caracterização genética, observou-se que nenhum isolado apresentou identidade com as estirpes recomendadas. Estas observações indicam que nos solos do Rio Grande do Sul existem rizóbios autóctones capazes de fixar nitrogênio eficientemente em simbiose com *Lotus corniculatus* e *Lotus uliginosus*, podendo ser recomendados para estudos a campo e para a produção de inoculantes para estas leguminosas no Brasil.

(1) Dissertação de Mestrado em Ciência do Solo, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. (68p.) Setembro, 2007.

**SELECTION AND CHARACTERIZATION OF NATIVE RHIZOBIA,
FROM RIO GRANDE DO SUL SOILS, FOR *Lotus corniculatus* L.
AND *Lotus uliginosus* Schkuhr.⁽¹⁾**

Author: Márcio Leandro dos Santos Frizzo
Adviser: Enilson Luiz Saccol de Sá

ABSTRACT

Forage legume species such as *Lotus*, adapted to the local environmental conditions of South Brazilian States, can be an important alternative to increase the supply of high protein content forage to the cattle besides the good adaptability to low-fertility soils. One of the advantages of using forage legumes relies on the acquisition of nitrogen from the symbiosis with diazotrophic bacteria such as Rhizobia. This work aimed the isolation, characterization and selection of native Rhizobia from soil samples of eight localities of Rio Grande do Sul. It was obtained 525 Rhizobia isolates from plants of *Lotus corniculatus* and 65 from *Lotus uliginosus*. These isolates were evaluated on colonial morphology differences and 30 of those Rhizobia were evaluated on the efficiency of symbiotic nitrogen fixation with plants, grown in greenhouse conditions, capability of melanin production and genetically characterized by PCR genomic DNA fingerprinting using primers BOX and ERIC. None of the 30 Rhizobia isolates studied produced melanin. Based on the nitrogen fixation efficiency, four rhizobia isolates for *L. corniculatus* were considered more efficient on nitrogen fixation than strains SEMIA 806 and SEMIA 816, with relative efficiency index ranging from 23 to 43%, and only the isolate UFRGS Lc 299 was similar to the strain U510, with relative efficiency index of 43%. On *L. uliginosus* eleven isolates were more efficient than strains SEMIA 822 and SEMIA 839, with relative efficiency index of 22 to 95%. Related to the genetic characterization, it was observed that Rhizobia isolates have no identity to the recommended strains. Those results indicate that in the soils of Rio Grande do Sul there are autochthonous Rhizobia capable of efficient symbiotic nitrogen fixation with *Lotus corniculatus* and *Lotus uliginosus*, which could be recommended to field evaluations and to the production of inoculants for those species in Brazil.

⁽¹⁾ M. Sc. Dissertation in Soil Science, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. (68p.) September, 2007.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .	3
2.1 Características das espécies <i>Lotus corniculatus</i> L. e <i>Lotus uliginosus</i> Schkuhr.....	3
2.2 A simbiose entre rizóbios e espécies do gênero <i>Lotus</i>	4
2.3 Caracterização das culturas bacterianas de rizóbios.....	7
2.3.1 Produção de melanina.....	7
2.3.2 Capacidade de fixação biológica do nitrogênio.....	8
2.4 Avaliação da variabilidade genética dos rizóbios.....	9
3 MATERIAL E MÉTODOS.	11
3.1 Locais de amostragem.....	11
3.2 Obtenção dos nódulos.	13
3.3 Isolamento dos rizóbios autóctones.....	13
3.4 Caracterização morfológica dos isolados de rizóbios.....	14
3.5 Autenticação dos isolados.....	14
3.6 Produção de melanina.....	15
3.7 Avaliação da eficiência dos isolados na fixação simbiótica de nitrogênio.	15
3.8 Caracterização genética dos isolados de rizóbios nativos	17
3.8.1 Extração do DNA genômico dos rizóbios.....	17
3.8.2 Amplificação do DNA genômico por oligonucleotídeos iniciadores.	19
3.8.3 Análise dos produtos da amplificação.	21
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Caracterização fenotípica dos isolados de rizóbios.....	23
4.1.1 Tempo de nodulação dos isolados utilizados na avaliação da eficiência simbiótica.....	23
4.1.2 Morfologia colonial.....	24
4.1.3 Capacidade de produção de melanina.....	26
4.2 Avaliação da eficiência simbiótica dos isolados de rizóbios em plantas de <i>L. corniculatus</i> em casa de vegetação.....	26
4.2.1 Capacidade de nodulação em plantas de <i>Lotus corniculatus</i>	26
4.2.2 Matéria seca e teor de nitrogênio total da parte aérea de plantas de <i>Lotus corniculatus</i>	28
4.2.3 Índice de eficiência relativa dos rizóbios para <i>Lotus corniculatus</i>	30
4.3 Avaliação da eficiência simbiótica dos isolados de rizóbios em plantas de <i>Lotus uliginosus</i> em casa de vegetação.....	32

4.3.1	Capacidade de nodulação em plantas de <i>Lotus uliginosus</i>	32
4.3.2	Produção de matéria seca e teor de nitrogênio total da parte aérea de plantas de <i>Lotus uliginosus</i>	33
4.3.3	Índice de eficiência relativa dos rizóbios para <i>Lotus uliginosus</i>	35
4.4	Caracterização genotípica dos isolados de rizóbios e estirpes.	37
4.4.1	Caracterização genotípica dos isolados e estirpes para <i>Lotus corniculatus</i>	37
4.4.2	Caracterização genotípica dos isolados e estirpes para <i>Lotus uliginosus</i>	41
4.5	Índice de diversidade de Shannon.....	44
5	CONCLUSÕES .	45
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
7	APÊNDICES.	53

RELAÇÃO DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Análise das características químicas das amostras de solo das localidades estudadas.....	12
Tabela 2	Composição das misturas para as reações de PCR para cada oligonucleotídeo iniciador.....	20
Tabela 3	Programa dos ciclos utilizados na amplificação do DNA genômico para cada oligonucleotídeo iniciador.....	20
Tabela 4	Número de isolados de rizóbios autóctones obtidos de nódulos de plantas de <i>Lotus corniculatus</i> e <i>Lotus uliginosus</i> inoculadas com amostras de solos de diferentes localidades do Rio Grande do Sul.....	22
Tabela 5	Localidade amostrada, morfologia colonial após sete dias de incubação a 28°C e tempo necessário para nodulação em plantas de <i>L. corniculatus</i> , <i>L. uliginosus</i> e <i>L. subbiflorus</i> dos isolados de rizóbios avaliados quanto à eficiência simbiótica.	25
Tabela 6	Médias do número de nódulos e da matéria seca de nódulos formados em raízes de plantas de <i>Lotus corniculatus</i> inoculadas com isolados de rizóbios nativos e estirpes.....	27
Tabela 7	Médias de produção de matéria seca e teor de nitrogênio total da parte aérea de plantas de <i>Lotus corniculatus</i> inoculadas com isolados de rizóbios nativos e estirpes.....	29
Tabela 8	Médias do número de nódulos e da matéria seca de nódulos formados em raízes de plantas de <i>Lotus uliginosus</i> inoculadas com isolados de rizóbios nativos e estirpes.....	33
Tabela 9	Médias de produção de matéria seca e teor de nitrogênio total da parte aérea de plantas de <i>Lotus uliginosus</i> inoculadas com isolados de rizóbios nativos e estirpes.....	34

RELAÇÃO DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Locais de coleta de amostras de planta ou solo para isolamento de rizóbios.....	12
Figura 2	Índices de eficiência relativa da fixação de nitrogênio em plantas de <i>Lotus corniculatus</i> inoculadas com isolados de rizóbios nativos e estirpes SEMIA 816, SEMIA 806 e U510...	31
Figura 3	Índices de eficiência relativa da fixação de nitrogênio em plantas de <i>Lotus uliginosus</i> inoculadas com isolados de rizóbios nativos e estirpes.....	36
Figura 4	Perfil de bandas obtidas com amplificação do DNA genômico de rizóbios, para <i>L.corniculatus</i> , com o oligonucleotídeo iniciador BOX A 1-R. Lambda = marcador de peso molecular Lambda ECO RI + Hind III. A foto é apresentada em negativo para melhor visualização das bandas.).....	39
Figura 5	Perfil de bandas obtidas com amplificação do DNA genômico de rizóbios, para <i>L.corniculatus</i> , com os oligonucleotídeos iniciadores ERIC1-R e ERIC-2.Lambda = marcador de peso molecular Lambda ECO RI + Hind III. A foto é apresentada em negativo para melhor visualização das bandas.....	39
Figura 6	Dendrograma de genotipagem de estirpes e isolados de rizóbios para <i>Lotus corniculatus</i> . Agrupamento obtido por UPGMA, utilizando-se o coeficiente de Jaccard, para perfil de bandas obtido a partir da PCR com os oligonucleotídeos iniciadores BOX A 1-R + ERIC1-R e ERIC-2.....	40
Figura 7	Perfil de bandas obtidas com amplificação do DNA genômico para <i>L. uliginosus</i> , com o oligonucleotídeo iniciador BOX A 1-R. Lambda = marcador de peso molecular Lambda ECO RI + Hind III. A foto é apresentada em negativo para melhor visualização das bandas.....	42
Figura 8	Perfil de bandas obtidas com amplificação do DNA genômico para <i>L. uliginosus</i> , com os oligonucleotídeos iniciadores ERIC1-R e ERIC-2.Lambda = marcador de peso molecular Lambda ECO RI + Hind III. A foto é apresentada em negativo para melhor visualização das bandas.....	42

Figura 9 Dendrograma de genotipagem de estirpes e isolados de rizóbios para *Lotus uliginosus*. Agrupamento obtido por UPGMA, utilizando-se o coeficiente de Jaccard, para perfil de bandas obtido a partir da PCR com os oligonucleotídeos iniciadores BOX A 1-R + ERIC1-R e ERIC-2.....

43

RELAÇÃO DE APÊNDICES

	Página
APÊNDICE 1 Solução Nutritiva (Sarruge, 1975)	54
APÊNDICE 2 Meio extrato de levedura-manitol - LM (Vincent, 1970).....	55
APÊNDICE 3 Meio extrato de levedura-triptona (TY) (Somasegaram & Hoben, 1994).....	56
APÊNDICE 4 Características de isolados de rizóbios obtidos em <i>Lotus corniculatus</i> L.	57
APÊNDICE 5 Características de isolados de rizóbios obtidos em <i>Lotus uliginosus</i> Schkuhr.....	67

1. INTRODUÇÃO

No Rio Grande do Sul, a alimentação do rebanho bovino e ovino é baseada principalmente em sistemas de pastoreio e, portanto, a produtividade das pastagens é fator determinante da produção animal. O emprego de espécies de leguminosas forrageiras representa uma excelente fonte de proteína para os animais, refletindo na produtividade do rebanho, além da possibilidade de ser utilizada como cobertura vegetal, na rotação com outras espécies, em sistemas de semeadura direta.

Diversas espécies do gênero *Lotus* possuem potencial para serem recomendadas como plantas forrageiras no Estado do Rio Grande do Sul, atendendo a demanda protéica dos animais e fixando nitrogênio atmosférico.

Nos solos do Brasil, pouco se conhece sobre a presença de rizóbios eficientes para *Lotus* e a respeito das interações entre estas plantas leguminosas e rizóbios autóctones. Além disso, existe um pequeno número de estirpes disponíveis e nenhum inoculante específico para espécies de *Lotus* foi selecionado no país, onde a acidez do solo é um dos estresses abióticos mais importantes. Atualmente, existem no Brasil seis estirpes recomendadas para a produção de inoculantes para *Lotus*, duas para *L. corniculatus*, uma para *L. pedunculatus*, duas para *L. subbiflorus* e uma para *L. tenuis* (Diário Oficial da União, 2006).

No Uruguai, tem sido desenvolvidos inoculantes específicos para espécies de *Lotus* os quais tem aumentado significativamente a produtividade destas leguminosas forrageiras. No entanto, problemas agronômicos como a existência de grupos de incompatibilidade *Lotus*/rizóbios ainda não foram solucionados.

A crescente diminuição das áreas de campo nativo do Estado devido à expansão da área cultivada com culturas de maior retorno econômico tem

aumentado o risco de perda de recursos genéticos importantes, tanto de plantas como de microrganismos. Estudos que buscam o isolamento, caracterização e seleção destes microrganismos são importantes para a manutenção desses recursos e desenvolvimento de inoculantes mais eficientes.

Este trabalho se baseou na hipótese de que nos solos do Estado do Rio Grande do Sul, é possível a existência de populações nativas de rizóbios eficientes na fixação de nitrogênio atmosférico em plantas das espécies *Lotus corniculatus* L. e *Lotus uliginosus* Schkuhr., viabilizando o desenvolvimento da cultura no Estado.

Os objetivos deste trabalho foram o isolamento, a caracterização e a seleção de rizóbios autóctones, eficientes na fixação simbiótica de nitrogênio em plantas de *Lotus corniculatus* L. e *Lotus uliginosus* Schkuhr, de solos de diversas áreas do Estado do Rio Grande do Sul.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características das espécies *Lotus corniculatus* L. e *Lotus uliginosus* Schkuhr.

O gênero *Lotus* L. encontra-se amplamente distribuído no mundo, destacando-se pelo alto valor nutritivo como planta forrageira e adaptação em regiões de clima temperado e subtropical as espécies: *Lotus corniculatus* L. e *Lotus uliginosus* Schkuhr. (Paim & Riboldi, 1991). O gênero *Lotus* L. é uma leguminosa forrageira que se destaca por sua capacidade de fixação simbiótica de nitrogênio, tolerância à acidez e baixa fertilidade do solo e seu alto conteúdo de taninos, não provocando timpanismo nos animais (Soster et al., 2004; Risso & Carambula, 1998; Langer, 1990).

A espécie *Lotus corniculatus* L. é uma leguminosa forrageira perene hiberno-primaveril, de origem europeia e mediterrânea (Soster et al., 2004), com excelente adaptação no sul do Brasil, Uruguai, Argentina e Chile, sendo largamente utilizada. O *L. corniculatus*, também conhecido como cornichão, possui hábito de crescimento ereto e um sistema radicular profundo, sendo capaz de adaptar-se a solos mal drenados ou com restrições de umidade por algum tempo (Barrientos et al., 2002; Acuña, 1998).

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, mas apresentando problemas de persistência, devido ao seu hábito de crescimento ereto, não suportando pastejo intenso. O excelente valor nutritivo

dessa espécie deve-se aos seus elevados teores de proteína, podendo alcançar até 24% de proteína bruta e 86% de digestibilidade (López et al., 1965).

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). Apesar de tolerar uma ampla faixa de pH, desde valores próximos de 4,5, até acima de 7,0 (Salerno & Tcacenco, 1986), responde bem a calagem e a correção de fósforo e potássio. Poli & Carmona (1966) obtiveram incrementos de 9,7; 15,5 e 18,9% na produção de cornichão, com a aplicação de doses de 100, 200 e 300 kg*ha⁻¹ de P₂O₅, respectivamente.

Lotus uliginosus (*L. pedunculatus*) é uma espécie leguminosa perene estival, rizomatosa, originária do Mediterrâneo. É mais tolerante a solos ácidos e deficientes em fósforo (Paim & Riboldi, 1991), apresentando também adaptação a áreas úmidas (Scheffer-Basso et al., 2002; Acuña, 1998). Foi constatado por Brock (1973) que em condições de altos teores de fósforo, *L. uliginosus* teve rendimento de matéria seca inferior a trevo-branco (*Trifolium repens*), porém em baixo nível de fósforo, a produção de matéria seca superou a do trevo-branco em 30%.

Na Nova Zelândia foi desenvolvido uma cultivar tetraplóide denominada Maku, a qual foi introduzida no sul do Brasil (Paim & Riboldi, 1991). Apesar da boa qualidade de forragem e das características de adaptação a solos pobres e mal drenados, as deficiências apresentadas, como lento estabelecimento, baixa produção de sementes e de difícil colheita, têm restringido o uso desta espécie no Estado (Paim & Riboldi, 1991). O escasso florescimento nas condições de fotoperíodo do sul do Brasil pode contribuir para a baixa produção de sementes desta espécie (Scheffer-Basso et al., 2002).

2.2 A simbiose entre rizóbios e espécies do gênero *Lotus*

Quando se deseja a introdução e o estabelecimento de leguminosas em novos ambientes, nem sempre se encontram populações de rizóbios

efetivas (tanto qualitativamente como quantitativamente) na fixação de nitrogênio na microbiota do solo. Esta situação pode ser evitada caso existam estirpes eficientes que possam ser inoculadas, favorecendo o desenvolvimento e o rendimento das pastagens com leguminosas, como no caso do gênero *Lotus*.

Na caracterização e classificação de espécies de rizóbio utilizam-se testes morfológicos, fisiológicos, bioquímicos, simbióticos e, mais recentemente, moleculares. Atualmente, os rizóbios estão classificados taxonomicamente em seis gêneros (*Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium*), todos na ordem *Rhizobiales* (Garrity & Holt, 2001).

As bactérias capazes de nodular as espécies de *Lotus* incluem gêneros de crescimento intermediário (*Mesorhizobium loti*) e de crescimento lento (*Bradyrhizobium* sp.) (Jordan, 1982; Jarvis et al., 1997). Mesmo que a maioria das estirpes bacterianas destes dois gêneros seja capaz de nodular grande número de espécies de *Lotus*, observa-se certa especificidade quanto à eficiência da simbiose. A espécie *L. corniculatus* normalmente estabelece associações efetivas com *Mesorhizobium* sp. (Baraibar et al., 1999; Labandera, 2007), enquanto a espécie *L. uliginosus* o faz preferencialmente com bactérias do gênero *Bradyrhizobium* sp. (Irisarri et al., 1996).

A especificidade hospedeira é representada pela habilidade de uma estirpe de rizóbio em induzir a nodulação e/ou fixar nitrogênio atmosférico quando associada a espécies do hospedeiro específico, sendo por isso uma importante característica a ser considerada em programas de seleção de novas estirpes (Peres et al., 1993; Carvalho, 2003). Lopes et al. (1976) relataram que estirpes de *Rhizobium* podem apresentar potencial simbiótico bastante variado dependendo da leguminosa hospedeira com a qual estiverem associados.

No Uruguai, tem sido observada uma série de problemas. Um deles é a grande dificuldade de implantação de *L. subbiflorus* e *L. uliginosus* em solos onde havia anteriormente *L. corniculatus* e *L. tenuis*, ou vice-versa. Os rizóbios eficientes em um grupo de especificidade comportam-se como parasitas em outro (Irisarri et al., 1996; Baraibar et al., 1999; Labandera (comunicação pessoal)). No entanto, existem certas estirpes como NZP2037 (Pankhurst et al. 1987), pertencente ao gênero *Mesorhizobium*, que são

capazes de estabelecer simbiose efetiva com todas as espécies, mas ainda não está claro se esta efetividade simbiótica é expressa em níveis ótimos com todas as espécies de *Lotus*.

A variabilidade para fixação de nitrogênio atmosférico na simbiose entre rizóbio e *Lotus* já foi observada em diversos trabalhos (Baraibar et al., 1999; Brose, 1992 a). Baraibar et al. (1999) obtiveram cinquenta isolados, em dez amostras de diferentes solos do Uruguai, que demonstraram especificidade para *Lotus corniculatus*. O trabalho demonstrou que há grande diversidade entre as estirpes de *Rhizobium loti* (*Mesorhizobium loti*) e a necessidade de selecionar as mais eficientes.

No Brasil, poucos trabalhos têm sido realizados visando o isolamento e seleção de estirpes para *Lotus*. Kolling et al. (1983) realizaram trabalhos de seleção de estirpes para *Lotus corniculatus* cv. São Gabriel e não obtiveram resposta à inoculação com estirpes selecionadas e a fertilização nitrogenada, atribuindo à presença de rizóbios naturalizados e ao nitrogênio disponível no solo, que supriu as necessidades das plantas. Brose (1992 b) isolou 13 estirpes a partir de *Lotus pedunculatus* de solo ácido, com diferentes capacidades de fixação de N, sendo que duas delas, apesar de produzirem grandes nódulos, se mostraram ineficientes como fixadoras. O autor também demonstrou a existência, em solos do sul do Brasil, de rizóbios capazes de realizar a simbiose com plantas do gênero *Lotus*. Também têm sido realizados trabalhos onde, na simbiose entre rizóbios e *Lotus* sp., a fixação biológica de nitrogênio tem sido avaliada com mais ênfase na planta do que no micro-simbionte. Por exemplo, Scheffer-Basso et al. (2001) compararam o desenvolvimento, a morfologia e o acúmulo de matéria seca de plantas de *Lotus corniculatus* cv. São Gabriel inoculadas com rizóbios.

Em solos com população de rizóbios estabelecida é necessário que a estirpe eficiente do inoculante seja capaz de competir pela nodulação e ter capacidade de sobreviver e crescer no solo sem seu hospedeiro. Vance e Graham (1995) perceberam que o sucesso do inoculante é inversamente proporcional à população nativa de rizóbios. Rupela e Sudarshana (1990) constataram maior número de nódulos oriundos de rizóbios nativos nodulando grão-de-bico do que do próprio inoculante.

2.3 Caracterização das culturas bacterianas de rizóbios

Diversas características bioquímicas e fisiológicas são consideradas importantes na avaliação da adaptação de novas estirpes em diferentes regiões, principalmente aquelas sob condições adversas, onde os rizóbios precisam lidar com os mesmos estresses ambientais que suas plantas hospedeiras. Características como resistência a antibióticos (Mueller et al., 1988), resistência a fungicidas (Curley & Burton, 1975), tolerância a baixo pH (Munns & Keyser, 1981; Oliveira & Magalhães, 1999), produção de sideróforos (Neilands, 1981, 1993; Duhan et al., 1998; Sá, 2001), utilização de diferentes fontes de carbono (Martinez-de-Dretz et al., 1974; Chakrabart et al., 1987; Kishinevsky et al., 2003; Marsudi et al., 1999; Idrissi et al., 1996), solubilização de fosfatos inorgânicos (Antoun et al., 1998; Chabot et al., 1998; Rodrigues & Fraga, 1999; Peix et al., 2001; Alves et al. 2004), entre outras, são avaliadas.

2.3.1 Produção de melanina

Segundo Jacobson (2000) a melanina é um pigmento de alto peso molecular, geralmente de coloração escura, formado pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos. Apesar da capacidade de produção de melanina ser amplamente encontrada em estirpes de *Rhizobium*, existem diferenças fisiológicas entre espécies do gênero e pouco se sabe sobre sua função.

A capacidade de produção deste pigmento em meio de cultura têm sido utilizada para a caracterização de isolados de rizóbios nativos de soja (Keyser et al., 1982; Hungria et al., 2001; Grange & Hungria, 2004), alfafa (del Papa et al., 1999) e feijoeiro (Sá, 2001; Andrade et al., 2002; Giongo, 2003).

Pouco se sabe sobre a função da melanina em rizóbios. Alguns autores citam que talvez ela seja utilizada para polimerizar moléculas fenólicas que surjam por ocasião da senescência de nódulos, destoxificando esses compostos que normalmente são letais para a bactéria (Hynes & Priefer, 1988). Estudos indicam que a produção de melanina não está relacionada com a fixação biológica de nitrogênio (Lamb *et al.*, 1982; Cubo *et al.*, 1997), embora os genes *mel*, responsáveis pela produção de melanina, estejam no plasmídeo

simbiótico *sym* (Lamb et al., 1982, Hawkins & Johnston, 1988, Gao & Borthakur, 1995; Rodriguez- Navarro et al., 2000). Estudos recentes indicam que a produção de melanina evoluiu paralelamente em grupos diferentes de organismos para a proteção a estresses ambientais, exceto em organismos patogênicos em que está relacionado com aumento da virulência (Plonka & Grabacka, 2006).

Segundo Romero-Martinez *et al.* (2000), normalmente a melanina é formada durante um período de estresse biótico ou abiótico ao qual os rizóbios estão expostos, servindo como uma ferramenta de auxílio no aumento da capacidade de sobrevivência no ambiente e competição em situações particulares, como as já mencionadas anteriormente.

2.3.2 Capacidade de fixação biológica do nitrogênio.

A fixação biológica de nitrogênio na simbiose com leguminosas forrageiras tem sido avaliada no estado com ênfase no macro-hospedeiro. Scheffer-Basso *et al* (2001) compararam o desenvolvimento, a morfologia, o acúmulo de matéria seca e a fixação de nitrogênio com rizóbios em *Adesmia latifolia* e cornichão cv. São Gabriel e perceberam diferenças no desenvolvimento de cada planta, mas atribuíram os resultados ao hábito de crescimento de cada espécie.

Para uma leguminosa em fase inicial de caracterização, como *Lotus sp.*, tais observações são muito relevantes como base para de se iniciar um estudo em campo. Segundo Bliss (1987), na ausência de fatores físicos limitantes e na presença de rizóbio efetivo, a densidade e o padrão da nodulação são controlados pela planta, embora o meio circundante produza grandes variações.

Brose (1992b) selecionou rizóbios para *L. uliginosus* a partir de solos de Santa Catarina. Em seu experimento, pode-se perceber a distinção de dois grupos de estirpes quanto a nodulação, produção de matéria seca e acúmulo de nitrogênio na parte aérea. Com base no nitrogênio total, os isolados mais eficientes foram EEL 883, EEL 4284, EEL 4484 e EEL 1083, com resultados semelhantes às estirpes SEMIA 839 e USDA 3469.

2.4 Avaliação da variabilidade genética dos rizóbios

Diversos avanços estão sendo obtidos pelo emprego de técnicas de biologia molecular nos estudos de diversidade genética. A utilização de técnicas como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com oligonucleotídeos iniciadores específicos BOX A 1, ERIC e REP e a análise dos perfis dos produtos de DNA obtidos após a reação da PCR permitem a diferenciação das estirpes estudadas (Versalovic et al., 1991, 1994; De Bruijn, 1992; Hungria et al., 1998).

Além da análise de PCR têm sido utilizados outros métodos como a análise do polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) das regiões do 16S rRNA, o 23S rRNA e do espaço intergênico (IGS), usado para detectar diferenças entre gêneros e espécies, sendo possível discriminar, inclusive, linhagens geneticamente relacionadas (Young *et al.*, 1991; Laguerre *et al.*, 1996; Terefework *et al.*, 1998; Tesfaye & Holl, 1998; Vinuesa *et al.*, 1998; Chueire *et al.*, 2000a; Tan *et al.*, 2001).

Para fins de determinação da diversidade genética e agrupamento por similaridade, a técnica de PCR parece demonstrar bons resultados. Fernandes *et al.* (2003) analisaram rizóbios isolados dos tabuleiros costeiros do Sergipe empregando três técnicas: PCR com o oligonucleotídeo específico BOX; PCR-RPFL da região do DNA que codifica para o gene 16S rRNA e da região intergênica entre 16S e 23S rRNA, com cinco enzimas de restrição; e seqüenciamento parcial da região 16S rRNA. Os resultados obtidos neste estudo revelaram diversidade genética elevada entre as estirpes nativas e confirmam que a análise por BOX-PCR é eficiente para discriminá-las, mas como já relatado por outros autores (Laguerre *et al.*, 1997; Chueire *et al.*, 2000b) nem sempre foi adequada nas avaliações filogenéticas, onde houve coerência entre as análises envolvendo a região do 16S rRNA, mas o agrupamento com uma das estirpes diferiu pela análise do espaço intergênico.

Nos estudos conduzidos para avaliar a qualidade dos inoculantes, Chueire *et al.* (2000b) estudaram a variabilidade das estirpes de *Bradyrhizobium* sp. e *Rhizobium* sp. (coleção SEMIA) recomendadas respectivamente para soja e feijoeiro. Desde 1992, variantes naturais destas estirpes foram incluídas na coleção SEMIA. Não foi possível, no entanto, diferenciar entre as estirpes

parentais e as variantes, dentro de cada par de estirpes de *Bradyrhizobium* pela análise sorológica de aglutinação com anticorpos de células totais, ou com anticorpos de lipopolissacarídeos celulares. Contudo, no estudo foi possível distinguir as quatro estirpes pela reação de amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD). Os autores observaram que as estirpes SEMIA 5079, SEMIA 5080 e as duas outras recomendadas para o uso em inoculantes comerciais, SEMIA 587 e SEMIA 5019 (= 29w), mostraram perfis diferenciados pela técnica de PCR com os oligonucleotídeos iniciadores REP e ERIC, no entanto, o REP e ERIC-PCR produziram perfis idênticos para os pares de estirpes SEMIA 566 X SEMIA 5079 e SEMIA 586 X SEMIA 5080. Tanto o RAPD como o REP e ERIC-PCR mostraram perfis distintos para as duas estirpes de *Rhizobium*, SEMIA 4077 (=CIAT 899) e SEMIA 4080 (=PRF 81).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos microbiológicos e a caracterização genética foram realizados nos Laboratórios de Microbiologia do Solo e de Biologia Molecular, ambos localizados na Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os experimentos com plantas foram conduzidos em casa de vegetação do Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia da UFRGS.

3.1 Locais de amostragem

Foram coletadas amostras de solos e plantas de *Lotus corniculatus* L. e *Lotus uliginosus* Schkuhr. de diversas localidades do Estado do Rio Grande do Sul (Figura 1) com vistas à obtenção do maior número possível de isolados de rizóbios autóctones capazes de nodular estas espécies. Procurou-se realizar a coleta em áreas de pastagens com a presença de plantas de *Lotus* spp.. Quando isto não foi possível, realizou-se a coleta de solo adjacente de outras leguminosas forrageiras nativas, como *Desmodium* spp., na tentativa de se obter rizóbios que pudessem estar vivendo na rizosfera destas leguminosas.

Os locais de coleta foram georreferenciados e sub-amostras dos solos foram enviados ao Laboratório de Análise de Solo da Faculdade de Agronomia da UFRGS para determinação das características químicas (Tabela 1). Dados do relevo e vegetação dos locais de coleta também foram coletados.

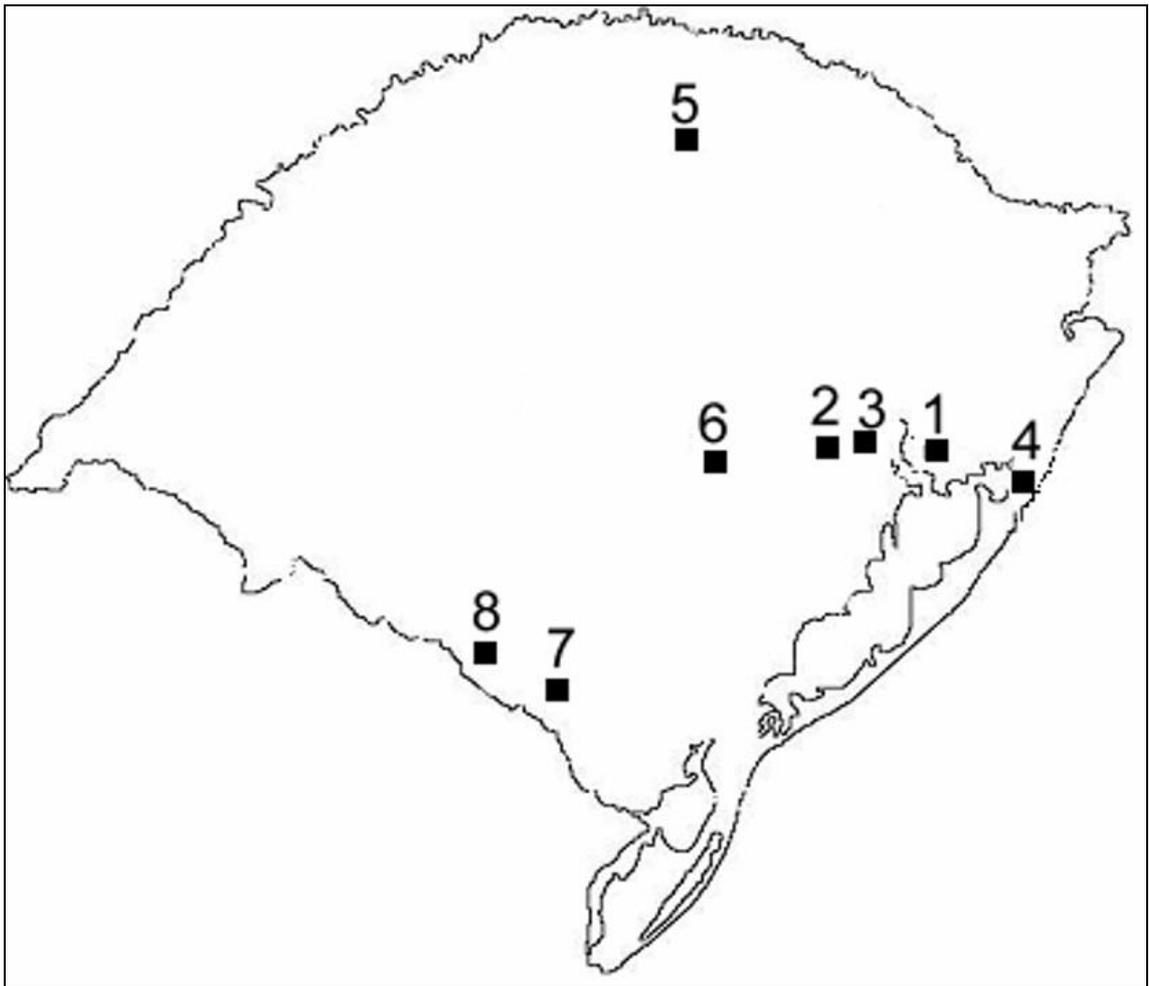


FIGURA 1. Locais de coleta de amostras de planta ou solo para isolamento de rizóbios. Legenda: 1 = Porto Alegre; 2 = Arroio dos Ratos; 3 = Eldorado do Sul; 4 = Mostardas; 5 = Passo Fundo; 6 = Rio Pardo; 7 = Hulha Negra e 8 = Bagé

TABELA 1. Análise das características químicas das amostras de solo das localidades estudadas.

Localidades	Solos	Argila	pH	MO	Al	Ca	Mg	P	K
		%	H ₂ O	%	-----	cmol _c dm ⁻³ -----	---	mg dm ⁻³ ---	
Bagé	Argissolos	14	5,0	4,0	0,2	5,5	2,6	7,6	66
Eldorado do Sul	Argissolos	21	5,1	1,7	0,2	2,2	1,1	12,0	118
Hulha Negra	Vertissolos	13	5,0	3,1	0,6	5,0	1,8	4,0	73
Mostardas	Neossolos	9	5,6	1,8	0,0	3,3	0,9	67,0	159
Passo Fundo	Latossolos	22	6,5	8,0	0,0	12,4	11,3	23,0	347
Rio Pardo	Argissolos	13	5,4	2,6	0,1	3,4	1,6	31,0	83

3.2 Obtenção dos nódulos

Para a obtenção de nódulos a partir das amostras de solo, foi realizado um experimento com a inoculação de plântulas de *Lotus corniculatus* L. e *L. uliginosus* Schkuhr. com uma suspensão dos solos amostrados. As sementes foram previamente escarificadas com lixa nº 100 por 1 minuto, desinfestadas por imersão das sementes em álcool (70%) por 30 segundos, seguido de hipoclorito de sódio (2,5%) por 30 segundos e sete lavagens consecutivas com água destilada esterilizada em autoclave a 120°C por 20 minutos, sendo em seguida colocadas em estufa a 28°C por 24 horas para pré-germinação.

Cinco sementes pré-germinadas foram plantadas em cada vaso do tipo “Leonard” (Vincent, 1970), contendo, como substrato na parte superior, uma mistura de vermiculita e areia (na proporção de 2:1), sendo todo o conjunto esterilizado em autoclave a 120°C por 90 minutos antes do plantio. Após, foi adicionada na parte inferior, solução nutritiva (Sarruge, 1975) sem nitrogênio (Apêndice 1), pH 6,0 e esterilizada em autoclave a 120°C por 20 minutos. Após o plantio, os vasos foram inoculados com uma alíquota de 10 mL da suspensão de cada amostra de solo em solução salina (NaCl 0,85%) esterilizada, sendo utilizada duas repetições para cada amostra de solo. Aos quatorze dias de crescimento, fez-se o desbaste deixando-se duas plântulas por vaso. A solução nutritiva dos vasos foi completada a cada quatro dias utilizando-se a solução nutritiva (Sarruge, 1975) sem nitrogênio, pH 6,0 e esterilizada em autoclave a 120°C por 20 minutos, intercalada com a adição de água destilada esterilizada. Após 40 dias da inoculação, avaliou-se a nodulação de forma expedita, considerando-se tamanho e coloração dos nódulos, e coletando-se os nódulos das plantas para o isolamento dos rizóbios no laboratório.

3.3 Isolamento dos rizóbios autóctones

O isolamento dos rizóbios foi executado a partir dos nódulos radiculares de *Lotus corniculatus* L. e *Lotus uliginosus* Schkuhr. coletados a

campo e dos nódulos obtidos das plantas inoculadas com suspensão de solo, cultivadas na casa de vegetação.

No laboratório, os nódulos foram previamente desinfestados por lavagens sucessivas em álcool (70%) por 30 segundos, seguido de hipoclorito de sódio (2,5%) por 30 segundos e sete lavagens com água destilada esterilizada em autoclave a 120°C por 20 minutos. Após a desinfestação, os nódulos foram esmagados com pinça flambadas em placas contendo meio ágar levedura-manitol (Apêndice 2) com vermelho congo (LMV) (Vincent, 1970) visando-se a obtenção de colônias bacterianas isoladas. Estes isolados foram reinoculados em placas com meio LMV sucessivamente para purificação da cultura, até a obtenção de colônias com características homogêneas e persistentes. Após, os isolados foram preservados em tubos de cultura, contendo meio ágar levedura-manitol (LM) inclinado, e mantidos sob refrigeração a 4°C para estudos de autenticação.

3.4 Caracterização morfológica dos isolados de rizóbios

A avaliação da morfologia das colônias foi realizada a partir da inoculação dos isolados em placas de Petri contendo meio de cultivo LMV, com pH 6,8 por um período de 5 a 7 dias de incubação a 28°C, sendo avaliados o tamanho, forma, elevação, bordas (lisa ou irregular), superfície (lisa ou granular), cor, densidade óptica (opaca, translúcida, transparente) e consistência ao toque com alça (gomosa, pastosa, viscosa ou aquosa).

3.5 Autenticação dos isolados

Para a certificação dos isolados obtidos, foram utilizados tubos de ensaio (250 mm x 24 mm) contendo 22 mL de um gel composto da solução nutritiva de Sarruge (1975) sem nitrogênio e ágar (7,5 g L⁻¹). Os tubos foram fechados com tampão de algodão, e esterilizados em autoclave a 1 atm e 120°C por 20 minutos. Nestes foram colocados sementes pré-germinadas de *Lotus corniculatus* L. e *Lotus uliginosus* Schkuhr. Após dois dias, as plântulas foram inoculadas com caldo de cultura de cada isolado, sendo realizadas duas repetições. Os tubos foram mantidos em lampadário com 12 horas diárias de

luz e com a temperatura da sala mantida em torno de 25°C. A avaliação da nodulação foi realizada visualmente ao longo de 45 dias, sendo descartados os isolados que não formaram nódulos nas raízes das plantas. Avaliou-se também a coloração dos nódulos, verificando-se apresentavam coloração vermelha, atribuído a isolados considerados eficientes na fixação biológica de nitrogênio, e o crescimento das plantas.

Após a autenticação, os isolados foram incubados em meio LM líquido sob agitação a 120 rpm, durante 24 horas, a 28 °C. Alíquotas de 250 µL da cultura foram colocadas em tubos de microcentrífuga, com tampa, contendo 250 µL de glicerol 50%. Os tubos foram identificados e mantidos em refrigerador (8 °C) por 4 horas sendo transferidos para freezer a -18 °C por 24 horas e, em seguida, colocados em ultrafreezer a -80 °C para armazenamento e conservação.

3.6 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 µg.mL⁻¹) e sulfato de cobre (40 µg.mL⁻¹), e incubados a 28°C, durante quatro dias. Em seguida, as colônias receberam tratamento com 50 µL 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 7E e 1AG, rizóbios nativos de solos de São Paulo (Sá, 2001).

3.7 Avaliação da eficiência dos isolados na fixação simbiótica de nitrogênio

Os isolados selecionados anteriormente e autenticados foram avaliados quanto à eficiência na fixação simbiótica de nitrogênio em experimento realizado em casa de vegetação, em vasos de “Leonard” (Vincent,

1970), esterilizados. Os vasos continham uma mistura de vermiculita e areia na proporção de 2:1, na parte superior, e, na parte inferior, solução nutritiva (Sarruge, 1975) isenta de nitrogênio, com pH 6,0, e esterilizada em autoclave a 120°C por 40 minutos. Em cada vaso, foram colocadas cinco sementes de *Lotus corniculatus* L. ou *Lotus uliginosus* Schkuhr, previamente escarificadas, desinfestadas e pré-germinadas, conforme descrito anteriormente, utilizando-se quatro vasos por tratamento. Foram selecionados para estudo em *L. corniculatus* quatro isolados da localidade de Arroio dos Ratos, um de Bagé, dois de Eldorado do Sul, cinco de Hulha Negra e três de Porto Alegre, totalizando quinze isolados. Para inoculação em plantas de *L. uliginosus* foram selecionados três isolados provenientes de amostras de solo de Eldorado do Sul, três de Hulha Negra, oito de Mostardas e um de Porto Alegre, também totalizando quinze isolados.

A inoculação dos vasos foi realizada utilizando-se uma alíquota de 2 mL do caldo de culturas de cada estirpe e isolado estudado, crescidas em meio levedura-manitol, incubadas por 48 horas a 28°C, sob agitação constante a 120 rpm e com cerca de 10^8 ufc mL⁻¹. Nesta avaliação, foram utilizadas para comparação as estirpes SEMIA 816 e SEMIA 806, recomendadas para produção de inoculantes para *Lotus corniculatus*, SEMIA 839, recomendada para produção de inoculantes para *L. uliginosus*, e SEMIA 822, cedidas pela Coleção de Culturas de Rizóbios da Fundação de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul (FEPAGRO). Inoculou-se também em ambas as espécies a estirpe U510, cedida pelo pesquisador Carlos Labandera do Ministerio de Ganaderia, Agricultura y Pesca do Uruguai, recomendada para *Lotus corniculatus*. Além dos tratamentos inoculados, foram conduzidos dois tratamentos controle, um sem adição de nitrogênio e outro com adição de alíquotas da solução de NH₄NO₃ (20 g L⁻¹), equivalente a 100 kg de N ha⁻¹, adicionadas a cada quatro dias, ao longo do experimento. Após quinze dias de desenvolvimento, realizou-se o desbaste das plantas, deixando-se duas por vaso. O experimento foi conduzido por 80 dias, com quatro repetições por tratamento.

Ao final do período, a parte aérea foi separada do sistema radicular, acondicionada em sacos de papel e submetida à secagem em estufa a 65°C, durante três dias. Uma vez seca, a parte aérea foi pesada, sendo em seguida

moída para a determinação química do acúmulo de nitrogênio no tecido, segundo metodologia descrita por Tedesco et al. (1995). Os nódulos foram destacados das raízes, contados e colocados em estufa a 65°C, durante três dias, para secagem. Avaliou-se o número e a massa seca de nódulos. A análise estatística dos dados foi realizada pela análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias pelo teste Scott e Nott ao nível de 1% de probabilidade. Os dados referentes ao número de nódulos foram convertidos pela equação $(X + 1)^{1/2}$ para a análise estatística.

O índice de eficiência de fixação de Nitrogênio relativa (EFR) dos isolados foi calculado através da fórmula descrita abaixo, conforme proposto por Brockwell et al. (1966).

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

onde:

Ntotal tratamento = nitrogênio total da planta do tratamento inoculado

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

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

3.8 Caracterização genética dos isolados de rizóbios nativos

Os isolados de rizóbios testados quanto à eficiência na fixação nitrogênio foram avaliados quanto a caracterização genética pelo método de amplificação do DNA genômico pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se a técnica de rep-PCR. Comparou-se também os perfis eletroforéticos das estirpes estudadas.

3.8.1 Extração do DNA genômico dos rizóbios

Para que os isolados de rizóbios e as estirpes fossem avaliados a partir da PCR, extraiu-se o DNA genômico de cada amostra pelo método de

extração com sílica, segundo metodologia adotada por Campos (1992) e modificado por Sá (2001).

A extração do DNA foi realizada a partir de uma cultura de células crescidas em meio TY (Apêndice 3) e incubados a 28°C durante 48 horas em agitação constante de 120 rpm. Preferencialmente, utiliza-se o meio TY para o crescimento dos isolados para redução da produção de polissacarídeos. Para os isolados que apresentavam características morfológicas de *Bradyrhizobium* sp., utilizou-se meio LM para o crescimento das células.

Transferiram-se alíquotas de 750 µL do caldo de cultura para tubos de microcentrifuga com capacidade de 1,5 mL esterilizados, para submetê-los a lavagens com soluções salinas, para a retirada dos polissacarídeos e resíduos de meio de cultura. Foi adicionado aos tubos 750 µL de solução I (50 mM de Tris pH 8,0, 5 mM EDTA e 50 mM NaCl), invertendo-os várias vezes para homogeneização, submetendo-os, logo em seguida, a um pulso por 15 segundos em microcentrifuga a 12.000 rpm. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se novamente 750 µL de solução I, repetindo-se o procedimento.

Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 100 µL de EDTA-salina (EDTA 10 mM pH 8,0 e NaCl 150 mM), homogeneizando com um pulso em vórtex. Adicionou-se aos tubos 100 µL de SDS 20%, aquecido a 50°C, homogeneizando cuidadosamente. Em seguida, os tubos foram colocados em banho de água a 50°C por dez minutos, sendo periodicamente homogeneizados por inversão.

Após, adicionou-se 50 µL de perclorato de sódio (5 M), gota a gota, com cuidadosa inversão do tubo após a adição de cada gota. Adicionou-se 500 µL da mistura de clorofórmio e álcool isoamílico (24:1), homogeneizando gentilmente por inversão até a formação de emulsão no tubo. Centrifugou-se por 5 minutos a 12.000 rpm.

Depois de centrifugado, transferiu-se cuidadosamente com auxílio de um micropipetador, a fase aquosa para um novo tubo de microcentrifuga esterilizado com capacidade de 1,5 µL. Adicionou-se 250 µL de NaCl 4 M, correspondente ao dobro do volume da amostra, e centrifugou-se por 15 segundos em microcentrifuga a 12.000 rpm. Ocorrendo a presença de depósitos no fundo dos tubos, retirou-se o sobrenadante e transferiu-se para novo tubo.

Em seguida, para que ocorresse a precipitação do DNA, adicionou-se aos tubos 20 μ L de dióxido de sílica, previamente suspenso no vórtex. Os tubos foram homogeneizados e deixados em banho de água a 50°C por 5 minutos. O preparo da solução de dióxido de sílica foi adaptado por Sá (2001), a partir do método de Boyle e Lew (1995) (0,5 g de dióxido de sílica, lavado previamente em tampão fosfato salina (PBS) em 45 mL de NaCl 4 M, mantida refrigerada e no escuro).

Após rápido pulso em microcentrífuga, eliminou-se o sobrenadante e lavou-se o precipitado duas vezes com 250 μ L de solução G (NaCl 50 mM, Tris pH 7,5 10 mM, EDTA 2,5 mM, em etanol 50%, mantida sob refrigeração). Em cada lavagem, o tubo foi invertido 5 a 10 vezes, seguido de um rápido pulso em microcentrífuga e descartado o sobrenadante. Logo após a lavagem, os tubos foram colocados abertos para secar a temperatura ambiente em dessecador sob vácuo por aproximadamente 1 hora.

Ressuspendeu-se o precipitado em 60 μ L de água ultrapura esterilizada, agitando-se gentilmente, colocando-se, em seguida, em banho de água a 40°C por 10 minutos. Após, os tubos em microcentrífuga foram centrifugados a 12 rpm por 3 minutos, transferindo-se o sobrenadante, contendo o DNA, para novos tubos de microcentrífugas esterilizados, conservando-os congelados a -20°C.

3.8.2 Amplificação do DNA genômico por oligonucleotídeos iniciadores

Os DNAs genômicos dos isolados de rizóbios e das estirpes recomendadas foram caracterizados pela técnica de PCR, com a utilização de seqüências repetidas de eric-PCR e box-PCR. A reação de amplificação foi realizada com usando-se os seguintes nucleotídeos iniciadores:

1. ERIC- correspondendo a seqüências repetitivas intergênicas de enterobactérias (de Bruijn, 1992):

ERIC1-R - (5' - ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C - 3')

ERIC-2 - (5' - AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G - 3').

2. BOX A1- amplifica regiões conservadas e repetitivas do DNA cromossômico (Versalovic *et al.*, 1994).

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

A reação de amplificação do DNA genômico com o *primer* BOX foi realizada de acordo com o protocolo de Versalovic *et al.* (1994) (Tabela 2), sendo a reação de amplificação utilizando o *primer* ERIC realizada segundo protocolo descrito por de Bruijn (1992) modificado (Tabela 2). As condições empregadas para a programação do termociclador são descritas na Tabela 3.

Em todas as reações de amplificação do DNA genômico utilizou-se como controle negativo uma reação contendo 20 µL de cada mistura e 5 µL de água ultrapura esterilizada. A concentração de DNA genômico usada nas amplificações variou de 30 a 50 ng de DNA.

TABELA 2. Composição das misturas para as reações de PCR para cada oligonucleotídeo iniciador.

Componentes	oligonucleotídeos iniciadores	
	BOX A 1-R	ERIC1-R + ERIC-2
Tampão 10x *	1x	1x
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 mM	1,5 mM
dNTP's (10mM)	200 µM	200 µM
Taq pol (5 U µL ⁻¹)	1 U	1 U
DMSO	1 µL	1 µL
primer	10 pM	10 pM
H ₂ O ultra pura **		

(*) Tampão 10x (500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 100 mM Tris-HCl, pH 9,0)

(**) Água ultrapura esterilizada em quantidade suficiente para completar o volume de 25 µL por tubo

TABELA 3. Programa dos ciclos utilizados na amplificação do DNA genômico para cada oligonucleotídeo iniciador

Ciclo	n° de vezes	oligonucleotídeos iniciadores	
		BOX A 1-R	ERIC1-R + ERIC-2
1	1	95 °C - 7 min	95 °C - 7 min
		94 °C - 1 min	94 °C - 1 min
2	30	53 °C - 1 min	51 °C - 1 min
		65 °C - 8 min	65 °C - 8 min
3	1	65 °C - 16 min	65 °C - 16 min
4		4 °C - ∞	4 °C - ∞

Para fins de comparação, as estirpes recomendadas SEMIA 806, SEMIA 816 SEMIA 822 e SEMIA 839, além da estirpe U510 também tiveram seu produto de PCR analisado em perfil de bandas. As amplificações foram repetidas no mínimo duas vezes para verificação da reprodutibilidade do perfil de bandas para cada oligonucleotídeo.

3.8.3 Análise dos produtos da amplificação

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em cuba horizontal com tampão TBE 0,5x durante 90 minutos a 80 V. Como padrão de peso molecular foi utilizado Lambda DNA/*Eco* R I + *Hind* III na primeira e última canaleta dos géis de BOX-PCR e ERIC-PCR. Os géis foram corados durante 10 minutos em solução de brometo de etídio ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) e, em seguida, imersos em água deionizada por 10 minutos. A visualização dos fragmentos amplificados foi realizada com transluminador com luz ultravioleta e documentada com equipamento de fotografia Polaroid.

O perfil de bandas no gel foi transformado em uma matriz binária bidimensional, pelo programa GelPro Analyser 3.1, onde 0 (zero) indicava a ausência de banda e 1 (um) a presença. A similaridade/dissimilaridade genética entre os isolados foi medida pelo coeficiente de Jacard (i,j) que não considera as similaridades negativas. As matrizes foram analisadas em conjunto pelo programa NTSYS-PC 2.01a e os dendrogramas obtidos pelo método de agrupamento Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages (UPGMA) pelo programa SAHN CLUSTERING do NTSYS.

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

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletadas amostras de solos de oito diferentes localidades do Estado do Rio Grande do Sul, obtendo-se rizóbios de amostras de solo de sete locais isolados a partir de nódulos de *Lotus corniculatus*, e de quatro locais para *Lotus uliginosus*. Foram obtidos 590 isolados de rizóbios autóctones, dentre estes 525 foram obtidos de nódulos de raízes de plantas de *L. corniculatus* e 65 de *L. uliginosus*.

Não foram obtidos nódulos em plantas de *L. corniculatus* inoculadas com suspensão de solo de Mostardas o que impossibilitou o isolamento de rizóbios autóctones deste local para esta espécie. O mesmo ocorreu em plantas da espécie *L. uliginosus* inoculadas com as amostras de solo provenientes de Arroio dos Ratos, Bagé, Passo Fundo e Porto Alegre.

TABELA 4. Número de isolados de rizóbios autóctones obtidos de nódulos de plantas de *Lotus corniculatus* e *Lotus uliginosus* inoculadas com amostras de solos de diferentes localidades do Rio Grande do Sul.

Localidade	<i>L. corniculatus</i>	<i>L. uliginosus</i>
	----- n° de isolados obtidos -----	
Arroio dos Ratos	68	-
Bagé	10	-
Eldorado do Sul	221	21
Hulha Negra	76	13
Mostardas	-	28
Passo Fundo	13	-
Porto Alegre	88	-
Rio Pardo	49	3
Total/espécie	525	65

Legenda: - = ausência de nodulação

Observou-se que, na maioria das localidades amostradas, obteve-se rizóbios para *L. corniculatus* (Tabela 4). Resultados semelhantes foram observados por Brose (1992), em solos do planalto de Santa Catarina, onde se obteve maior número de isolados para *L. corniculatus* do que para *L. uliginosus*. Resultados divergentes foram observados em solos da Nova Zelândia, onde Greenwood & Pankhurst (1977) constataram uma maior frequência e distribuição de rizóbios para *L. uliginosus*. O maior número de isolados de rizóbios para *L. Corniculatus* obtido neste trabalho (Tabela 4) pode se dever ao fato de a introdução desta espécie no Rio Grande do Sul ter ocorrido em meados de 1940 (Soster et. al, 2004) e também ao desenvolvimento da cultivar São Gabriel, durante os anos de 1955 e 1965 (Paim, 1988), contribuindo para a maior disseminação desta espécie no Estado.

4.1 Caracterização fenotípica dos isolados de rizóbios

Todos os isolados obtidos foram caracterizados quanto à morfologia colonial, ao tempo de aparecimento do primeiro nódulo na planta (tempo de nodulação), e quanto à capacidade para produção de melanina. As plantas inoculadas com os isolados de rizóbio diferiram quanto ao tempo de aparecimento do nódulo. Observou-se variação no tempo de nodulação de 9 a 47 dias (Apêndices 4 e 5). Estas características foram consideradas na escolha dos isolados de rizóbios nativos utilizados na avaliação da eficiência simbiótica em casa de vegetação.

4.1.1 Tempo de nodulação dos isolados utilizados na avaliação da eficiência simbiótica

Na avaliação da capacidade de nodulação, entre as plantas de *L. corniculatus* inoculadas, observou-se que os isolados UFRGS Lc 322, Lc 323 e Lc 353 induziram nódulos em apenas 10 dias de condução do ensaio (Tabela 5). Enquanto que nas plantas inoculadas com o isolado UFRGS Lc 349 o aparecimento dos nódulos ocorreu 47 dias após a inoculação (Tabela 5).

Já em *L. uliginosus*, observou-se que nos tratamentos inoculados com os isolados UFRGS Lu 15, Lu 20 e Lu 38 os nódulos apareceram 9 dias após a inoculação (Tabela 5).

Nenhum relato anterior sobre observações quanto as diferenças no tempo para o aparecimento de nódulos, conforme verificado nas plantas inoculadas no experimento de autenticação dos isolados de rizóbios, foi encontrado na bibliografia pesquisada.

4.1.2 Morfologia colonial

A observação da morfologia das colônias dos isolados de rizóbios, avaliada após sete dias de incubação, permitiu verificar que muitos destes apresentam características distintas, com variações, principalmente, no diâmetro das colônias, superfície e densidade ótica (Apêndice 4 e 5).

Os rizóbios isolados de *L. corniculatus* apresentaram colônias com diâmetro variando desde 1 até 10 mm, sendo que a maioria dos isolados (63%) formaram colônias com entre 3 e 5 mm. Apenas 20% dos isolados obtidos para esta espécie formaram colônias pequenas (1 a 2 mm) e cerca de 17% formaram colônias grandes, variando de 6 a 10 mm de diâmetro.

Já nos isolados de *L. uliginosus* predominou a ocorrência de colônias pequenas, variando de 1 a 2 mm de diâmetro (63% dos isolados). Também houve a formação de colônias de 3 a 5 mm (23%) e de 5 a 10 mm (14%). Estes resultados mostram que, provavelmente, a maioria dos isolados obtidos de *L. corniculatus* pertencem ao gênero *Mesorhizobium*, de crescimento intermediário (Jarvis et. al, 1982), e que a maioria dos rizóbios isolados de *L. uliginosus* pertencem ao gênero *Bradyrhizobium*, de crescimento lento (Baraibar et. al, 1999), por apresentarem, respectivamente, diâmetros de colônia semelhantes aos descritos para estes gêneros.

Na Tabela 5 são apresentadas as características da morfologia colonial de 30 isolados de rizóbios, sendo 15 deles para *L. corniculatus*, 14 para *L. uliginosus* e um para *L. subbiflorus*, estudados quanto à eficiência na fixação simbiótica de nitrogênio.

TABELA 5. Localidade amostrada, morfologia colonial após sete dias de incubação a 28°C e tempo necessário para nodulação em plantas de *L. corniculatus*, *L. uliginosus* e *L. subbiflorus* dos isolados de rizóbios avaliados quanto à eficiência simbiótica.

Isolados	Local	Diâmetro (mm)	Nodulação (dias)	Densidade ótica	Produção de goma
UFRGS Lc 10	HN	2	13	Opaca	gomosa
UFRGS Lc 20	ES	5	11	Translúcida	aquosa
UFRGS Lc 31	ES	5	14	Opaca	gomosa
UFRGS Lc 236	PA	4	18	Opaca	gomosa
UFRGS Lc 246	PA	2	11	Translúcida	aquosa
UFRGS Lc 269	PA	7	18	Opaca	gomosa
UFRGS Lc 322	HN	10	10	-	gomosa
UFRGS Lc 323	HN	5	10	-	gomosa
UFRGS Lc 349	HN	10	47	Translúcida	gomosa
UFRGS Lc 353	HN	2	10	Translúcida	gomosa
UFRGS Lc 387	AR	4	11	Translúcida	gomosa
UFRGS Lc 388	AR	4	11	Translúcida	gomosa
UFRGS Lc 391	AR	5	14	Translúcida	gomosa
UFRGS Lc 398	AR	5	18	Translúcida	gomosa
UFRGS Lc 524	Ba	3	-	Opaca	-
UFRGS Ls 54	PA	<1	16	Opaca	gomosa
UFRGS Lu 4	Mo	1	15	Translúcida	gomosa
UFRGS Lu 10	Mo	1	15	Translúcida	gomosa
UFRGS Lu 15	Mo	1	9	Translúcida	gomosa
UFRGS Lu 16	Mo	1	13	Translúcida	gomosa
UFRGS Lu 20	Mo	1	9	Translúcida	gomosa
UFRGS Lu 26	Mo	<1	13	Opaca	gomosa
UFRGS Lu 28	Mo	<1	15	Opaca	gomosa
UFRGS Lu 30	Mo	2	22	Translúcida	gomosa
UFRGS Lu 35	ES	2	13	Translúcida	gomosa
UFRGS Lu 38	ES	1	9	Translúcida	gomosa
UFRGS Lu 40	ES	3	15	Translúcida	gomosa
UFRGS Lu 54	HN	2	-	Translúcida	gomosa
UFRGS Lu 57	HN	2	-	Opaca	gomosa
UFRGS Lu 62	HN	3	-	Translúcida	gomosa

Legenda: AR = Arroio dos Ratos; Ba = Bagé; ES = Eldorado do Sul; HN = Hulha Negra; Mo = Mostardas; PA = Porto Alegre

4.1.3 Capacidade de produção de melanina

Entre todos os isolados obtidos, 80 isolados de *L. corniculatus* e 37 de *L. uliginosus* foram estudados quanto à capacidade de produção de melanina. Nenhum dos isolados estudados apresentou capacidade para produção do pigmento escuro em placas com meio TY suplementado com L-tirosina e CuSO₄. Resultados semelhantes foram obtidos por Fontoura (2007) em estudo com rizóbios isolados de *L. subbiflorus*. Aparentemente estes rizóbios ou não apresentam o gene *mel* (Cubo *et al.* 1997) ou falharam na expressão do mesmo.

4.2 Avaliação da eficiência simbiótica dos isolados de rizóbios em plantas de *L. corniculatus* em casa de vegetação.

Os 15 isolados de rizóbios testados em *L. corniculatus* quanto ao seu potencial de fixação biológica de nitrogênio foram selecionados entre os 525 isolados obtidos. Estes foram os que formaram nódulos mais rapidamente nas plântulas durante o processo de autenticação (Tabela 5) com formação de nódulos vermelhos e que apresentavam morfologia colonial distinta. Os rizóbios selecionados para ensaio de eficiência, bem como as estirpes SEMIA 806, SEMIA 816 e U510, induziram nodulação e fixaram nitrogênio em simbiose com plantas de *L. corniculatus* em condições de casa de vegetação.

4.2.1 Capacidade de nodulação em plantas de *Lotus corniculatus*

Na Tabela 6 são mostrados os valores médios do número de nódulos e da matéria seca de nódulos produzidos nas plantas dos tratamentos inoculados com as estirpes e isolados de rizóbios. As plantas dos tratamentos inoculados com os isolados UFRGS Lc 391, Lc 388, Lc 20, Lc 524, Lc 398, Lc 246, Lc 322, Lc 349, Lc 353, Lc 10 e Lc 387 e com a estirpe U510 apresentaram maior número de nódulos do que as inoculadas com os isolados UFRGS Lc 269, Lc 31, Lc 323 e Lc 236 e com as estirpes SEMIA 816 e SEMIA 806 (Tabela 6).

TABELA 6. Médias do número de nódulos e da matéria seca de nódulos formados em raízes de plantas de *Lotus corniculatus* inoculadas com isolados de rizóbios nativos e estirpes.

Tratamento	Nº de nódulos planta ⁻¹ *	Matéria seca de nódulos mg planta ⁻¹
UFRGS Lc 391	81,1 a	27 a
UFRGS Lc 388	80,5 a	15 a
UFRGS Lc 20	74,3 a	38 a
U510	64,8 a	54 a
UFRGS Lc 524	63,4 a	44 a
UFRGS Lc 398	63,4 a	37 a
UFRGS Lc 246	59,1 a	30 a
UFRGS Lc 322	58,9 a	41 a
UFRGS Lc 349	52,0 a	42 a
UFRGS Lc 353	50,9 a	26 a
UFRGS Lc 10	48,6 a	33 a
UFRGS Lc 387	42,0 a	82 a
UFRGS Lc 269	38,9 b	40 a
UFRGS Lc 31	36,8 b	32 a
SEMIA 816	25,3 b	34 a
UFRGS Lc 323	23,6 b	15 a
SEMIA 806	17,6 b	7 a
UFRGS Lc 236	8,9 b	2 a
CV (%)	27,04	84,43
Erro padrão	0,91	0,01

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 1%. Médias de quatro repetições. * Dados transformados por $(x + 1)^{1/2}$.

Neste trabalho, os maiores números de nódulos em *L. corniculatus* variaram de 42 a 81 nódulos por planta. Estes valores foram inferiores aos observados por Fontoura (2007) em *L. tenuis* (203 nódulos por planta), mas foram superiores aos obtidos por Barrientos et al. (2002) com isolados autóctones de regiões do Chile, cuja maior nodulação foi de dois nódulos por planta.

Não se observou diferença na massa de nódulos produzida pelas plantas dos tratamentos inoculados, apesar do número de nódulos por planta ter apresentado variação. Alguns isolados, como o UFRGS Lc 387,

apresentaram um valor de massa de nódulos muito superior aos demais, mas devido ao elevado coeficiente de variação, estes valores não diferiram.

Não se observou correlação entre a matéria seca de nódulos com a matéria seca da parte aérea das plantas. Observação semelhante foi realizada por Brose (1992) em um trabalho com 16 estirpes de *Mesorhizobium loti* inoculadas em plantas de *L. corniculatus*, cultivadas em vasos contendo solo da unidade de mapeamento Vacaria (Latosolo Bruno), em condições de casa de vegetação.

4.2.2 Matéria seca e teor de nitrogênio total da parte aérea de plantas de *Lotus corniculatus*

A produção de matéria seca da parte aérea das plantas de *L. corniculatus* do tratamento controle sem inoculação e com adição de nitrogênio foi superior aos demais tratamentos (Tabela 7). As plantas inoculadas com os isolados UFRGS Lc 269, Lc 349, Lc 524, Lc 322, Lc 246, Lc 398, Lc 10, Lc 20, Lc 353, Lc 31, Lc 387 e Lc 391 e com as estirpes U510 e SEMIA 816 produziram massa seca da parte aérea menor do que o tratamento controle com adição de nitrogênio, porém maior do que as plantas dos demais tratamentos (Tabela 7). As plantas dos tratamentos inoculados com os isolados UFRGS Lc 323, Lc 388, Lc 236 e com a estirpe SEMIA 806 apresentaram a menor produção de matéria seca da parte aérea, não diferindo da massa produzida no tratamento controle sem inoculação e sem adição de nitrogênio. Estes resultados mostram que os isolados UFRGS Lc 323, Lc 388, Lc 236 e a estirpe SEMIA 806, nas condições do experimento, foram ineficientes em suprir nitrogênio para o crescimento da parte aérea da planta.

Avaliando-se os valores de acúmulo de nitrogênio total na parte aérea das plantas, observa-se que o tratamento controle com adição de nitrogênio acumulou teor de nitrogênio superior aos demais tratamentos (Tabela 7). Entre os tratamentos inoculados, as plantas inoculadas com a estirpe U510 e com o isolado UFRGS Lc 269 apresentaram maior acúmulo de nitrogênio total no tecido, superior aos demais tratamentos inoculados e ao tratamento controle sem adição de nitrogênio (Tabela 7).

Já a avaliação do teor de nitrogênio total observado nas plantas inoculadas com os isolados UFRGS Lc 322, Lc 349, Lc 524 e Lc 246 e com a estirpe SEMIA 816 (Tabela 7), indica que, apesar de fixar nitrogênio, estes rizóbios não foram capazes de suprir nitrogênio para as plantas equivalente ao obtido no tratamento controle com adição de nitrogênio via solução nutritiva, formando um grupo intermediário, sendo, no entanto, superiores aos demais tratamentos inoculados. Observa-se também que o teor de nitrogênio fixado nas plantas dos demais tratamentos inoculados com os isolados e com a estirpe SEMIA 806, não diferiram do teor de nitrogênio total das plantas do tratamento controle sem inoculação e sem adição de nitrogênio.

TABELA 7. Médias de produção de matéria seca e teor de nitrogênio total da parte aérea de plantas de *Lotus corniculatus* inoculadas com isolados de rizóbios nativos e estirpes.

Tratamentos	Matéria seca	N total
	----- mg planta ⁻¹ -----	
T+N	1682,0 a	26,47 a
U510	370,1 b	12,15 b
UFRGS Lc 269	392,9 b	11,65 b
UFRGS Lc 322	278,5 b	7,69 c
UFRGS Lc 349	315,5 b	6,63 c
UFRGS Lc 524	290,4 b	6,28 c
SEMIA 816	291,8 b	6,16 c
UFRGS Lc 246	234,8 b	5,76 c
UFRGS Lc 398	223,0 b	4,94 d
UFRGS Lc 10	222,0 b	4,81 d
UFRGS Lc 353	214,0 b	4,77 d
UFRGS Lc 20	220,5 b	4,54 d
UFRGS Lc 31	212,3 b	4,20 d
UFRGS Lc 387	186,1 b	3,11 d
UFRGS Lc 391	174,9 b	2,52 d
UFRGS Lc 323	118,6 c	2,05 d
UFRGS Lc 388	89,0 c	1,52 d
UFRGS Lc 236	72,9 c	1,49 d
SEMIA 806	67,8 c	0,95 d
T-N	20,8 c	0,24 d
CV (%)	40,37	46,38
Erro padrão	57,30	1,37

T + N = Tratamento controle com adição de nitrogênio; T – N = Tratamento controle sem adição de nitrogênio. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste Scott-Knott 1%. Médias de quatro repetições.

A estirpe SEMIA 816, neste ensaio, demonstrou uma boa capacidade de fixar nitrogênio, já a estirpe SEMIA 806 igualou-se ao controle sem adição de N, mostrando ineficiente na fixação de nitrogênio atmosférico nas condições do experimento. Os isolados UFRGS Lc 391 e Lc 388 apresentaram baixa eficiência na fixação de nitrogênio (Tabela 7), apesar de induzir uma grande quantidade de nódulos e pequena massa nodular (Tabela 6), mostrando desta forma que muitos nódulos pequenos e ineficientes foram formados. Este fenômeno tem sido observado em outros trabalhos (Brose, 1992a; Brose, 1992b; Giongo, 2003; Laguerre et al., 2003; Maâtallah et al., 2002; Fontoura, 2007) podendo ser a razão das dificuldades de implantação desta espécie de *Lotus*, em determinadas áreas onde tais rizóbios possam predominar no solo, de forma semelhante ao observado em estudos com ervilha (Laguerre et al., 2003).

4.2.3 Índice de eficiência relativa dos rizóbios para *Lotus corniculatus*

Os índices de eficiência relativa na fixação simbiótica de nitrogênio, apresentados na Figura 2, indicam a percentagem da contribuição, em termos de nitrogênio fixado, do tratamento inoculado em relação aos tratamentos controle com adição de nitrogênio de acordo com a fórmula empregada por Brockwell et al. (1966).

Os índices de eficiência relativa calculados para os tratamentos inoculados variaram de 45% a menos de 5%. Na Figura 2, observa-se a formação de quatro grupos principais com base nos valores do índice de eficiência relativa. O primeiro grupo, com índices acima de 40%, inclui o tratamento inoculado com a estirpe U510 (45,4%), e o inoculado com o isolado UFRGS Lc 269 (43,5%). O segundo grupo apresenta índices intermediários, entre 20 e 30%, e inclui os isolados UFRGS Lc 322, Lc 346, Lc 524, Lc 246 e a estirpe SEMIA 816. Os demais tratamentos inoculados apresentaram índices de eficiência relativa muito baixos. Os inoculados com os isolados UFRGS Lc 398, Lc 10, Lc 353, Lc 20, Lc 31, Lc 387 apresentaram índice abaixo de 20%, e com os isolados UFRGS Lc 391, Lc 323, Lc 388, Lc 236 e a estirpe SEMIA 806, abaixo de 10% de eficiência.

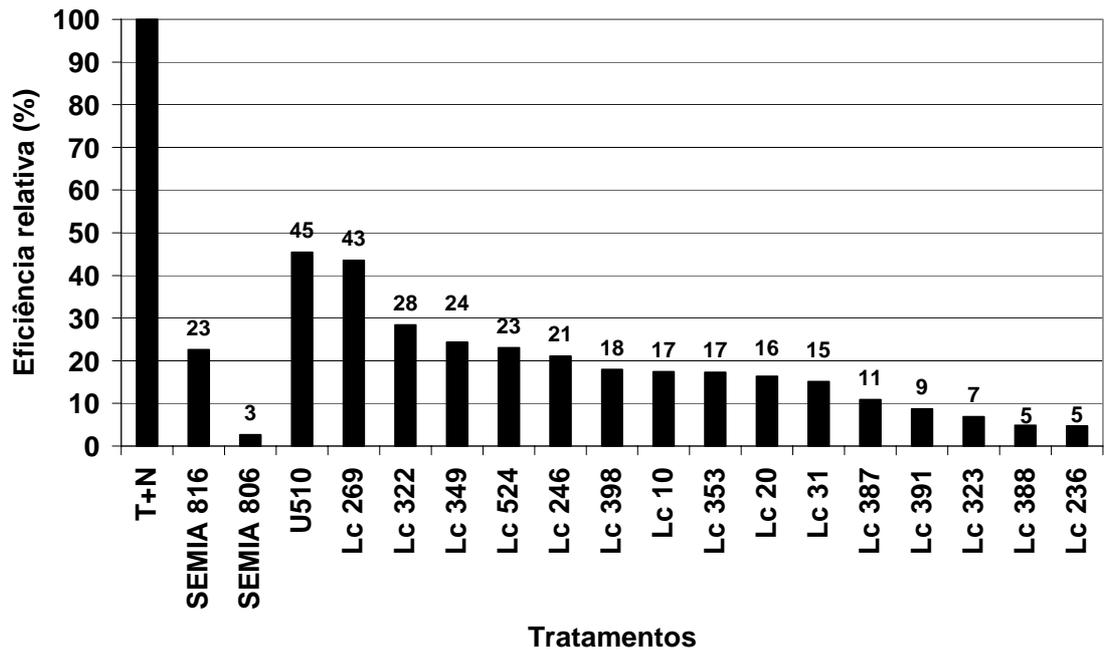


FIGURA 2. Índices de eficiência relativa da fixação de nitrogênio em plantas de *Lotus corniculatus* inoculadas com isolados de rizóbios nativos e estirpes SEMIA 816, SEMIA 806 e U510.

As estirpes SEMIA 816 e SEMIA 806, recomendadas para *L. corniculatus*, apresentaram desempenho insatisfatório no experimento, sendo a SEMIA 806 a que teve menor contribuição em termos de acúmulo de matéria seca e teor de nitrogênio total na parte aérea, não diferindo do tratamento controle sem nitrogênio. Também apresentou baixo índice de eficiência relativa e baixo número de nódulos e matéria seca de nódulos (Tabela 6), evidenciando uma provável perda de eficiência desta estirpe, o que deve acarretar na sua saída da coleção de estirpes recomendadas para esta cultura. Diversos autores já relataram a perda de eficiência de estirpes devido a mutações espontâneas (Date, 1982; Barrientos et. al, 2002) ou pela perda dos plasmídeos onde estão localizados os genes responsáveis pela fixação.

O isolado UFRGS Lc 269 apresentou índice de eficiência relativa da fixação de nitrogênio semelhante à estirpe U510, recomendada para inoculação de *L. corniculatus* no Uruguai. Além disso, entre os tratamentos inoculados, foi o que teve maior produção de matéria seca da parte aérea. Considerando-se que a média do número de nódulos formados por planta deste tratamento, apresentado na Tabela 6, foi menor que a média da estirpe

U510, a contribuição de cada nódulo para a fixação de nitrogênio foi superior, indicando um bom potencial deste isolado para estudos a campo.

4.3 Avaliação da eficiência simbiótica dos isolados de rizóbios em plantas de *Lotus uliginosus* em casa de vegetação.

Sob condições de casa de vegetação, os isolados estudados e a estirpe recomendada para *L. uliginosus*, SEMIA 839, e a estirpe SEMIA 822 foram capazes de fixar nitrogênio atmosférico em simbiose. A estirpe U510, que é recomendada para *L. corniculatus* e *L. tenuis*, não foi capaz de estabelecer simbiose efetiva com *L. uliginosus*, como já se esperava. No entanto, funcionou muito bem como um tratamento comparativo negativo

4.3.1 Capacidade de nodulação em plantas de *Lotus uliginosus*

As raízes das plantas de *L. uliginosus* inoculadas com os rizóbios estudados apresentaram elevado número de nódulos. Alguns isolados proporcionando a formação de mais de 300 nódulos por planta. O número de nódulos formados por planta e a matéria seca de nódulos por planta dos tratamentos inoculados com isolados de rizóbios e estirpes, são apresentados na Tabela 8.

O isolado UFRGS Lu 10 induziu o maior número de nódulos por planta, mas não diferiu dos tratamentos inoculados com os isolados UFRGS Lu 35, Lu 38, Lu 40, Lu16, Lu 26, Lu 4 e Ls 54. Estes foram superiores, quanto à produção de nódulos nas raízes das plantas, aos tratamentos inoculados com as estirpes SEMIA 839, recomendada para *L. uliginosus*, SEMIA 822 e U510, recomendada para *L. corniculatus*. O tratamento UFRGS Ls 54, isolado obtido de nódulos formados em plantas de *L. subbiflorus*, foi capaz de formar nódulos quando inoculado em plantas de *L. uliginosus*, formando mais de 130 nódulos por planta.

Os isolados avaliados neste trabalho demonstram grande capacidade de nodular o hospedeiro em comparação com os resultados obtidos por Barrientos et al. (2002), com rizóbios nativos de solos chilenos

avaliados em *Lotus uliginosus*, que produziram menos de dois nódulos por planta em experimento conduzido por 45 dias.

TABELA 8. Médias do número de nódulos e da matéria seca de nódulos formados em raízes de plantas de *Lotus uliginosus* inoculadas com isolados de rizóbios nativos e estirpes.

Tratamento	Nº de nódulos planta ⁻¹ *	Matéria seca de nódulos mg planta ⁻¹
UFRGS Lu 10	308,0 a	164 a
UFRGS Lu 16	218,6 a	134 a
UFRGS Lu 40	211,9 a	142 a
UFRGS Lu 28	199,4 a	155 a
UFRGS Lu 38	195,0 a	185 a
UFRGS Lu 35	184,0 a	131 a
UFRGS Lu 4	178,4 a	101 a
UFRGS Lu 26	147,8 a	115 a
UFRGS Ls 54	136,1 a	98 a
UFRGS Lu 57	130,8 b	60 b
SEMIA 822	111,6 b	57 b
UFRGS Lu 20	81,8 b	33 b
UFRGS Lu 15	72,6 b	27 b
SEMIA 839	55,0 b	25 b
UFRGS Lu 30	53,3 b	61 b
UFRGS Lu 62	20,6 b	1 b
UFRGS Lu 54	4,4 b	0,7 b
U510	0,3 b	0 b
CV (%)	21,42	41,30
Erro padrão	1,10	0,02

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott a 1%. Médias de quatro repetições. Dados transformados por $(x + 1)^{1/2}$.

4.3.2 Produção de matéria seca e teor de nitrogênio total da parte aérea de plantas de *Lotus uliginosus*

O tratamento controle com adição de nitrogênio foi significativamente superior a todos os tratamentos inoculados com isolados de rizóbios e estirpes, quanto à produção de matéria seca da parte aérea de plantas de *L. uliginosus* (Tabela 9). Os isolados UFRGS Lu 35, Lu 38, Lu 10, Lu 40, Lu 16 e Lu 28 foram os que tiveram maiores produções de matéria seca da parte aérea entre

os tratamentos inoculados, sendo estatisticamente superiores às estirpes SEMIA 822 e SEMIA 839.

TABELA 9. Médias de produção de matéria seca e teor de nitrogênio total da parte aérea de plantas de *Lotus uliginosus* inoculadas com isolados de rizóbios nativos e estirpes.

Tratamentos	Matéria seca	N total
	----- mg planta ⁻¹ -----	
T+N	3507,6 a	33,9 a
UFRGS Lu 35	1704,7 b	32,3 a
UFRGS Lu 38	1606,7 b	30,8 a
UFRGS Lu 10	1814,2 b	26,2 a
UFRGS Lu 40	1393,7 b	24,0 a
UFRGS Lu 16	1183,9 b	16,6 b
UFRGS Lu 28	1101,6 b	14,5 b
UFRGS Lu 26	759,0 c	12,3 b
UFRGS Lu 4	773,0 c	12,1 b
UFRGS Lu 30	516,6 c	9,3 b
UFRGS Lu 57	501,0 c	8,9 b
UFRGS Ls 54	630,5 c	7,8 b
SEMIA 822	311,9 d	4,4 c
UFRGS Lu 20	237,0 d	3,6 c
UFRGS Lu 15	213,1 d	3,0 c
SEMIA 839	209,4 d	2,9 c
UFRGS Lu 62	77,4 d	0,7 c
UFRGS Lu 54	73,9 d	0,5 c
U510	55,6 d	0,4 c
T-N	65,7 d	0,5 c
CV (%)	41,4	59,05
Erro padrão	173,3	3,61

Legenda: T + N = Tratamento controle com adição de nitrogênio; T – N = Tratamento controle sem adição de nitrogênio. Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott 1%. Médias de quatro repetições.

A produção de matéria seca da parte aérea das plantas inoculadas com as estirpes SEMIA 822 e SEMIA 839 não diferiram das do tratamento controle sem adição de nitrogênio, tampouco as inoculadas com os isolados UFRGS Lu 20, Lu 15, Lu 62 e Lu 54. A baixa eficiência destas estirpes e isolados no experimento também é evidenciada pelos teores de nitrogênio total da parte aérea das plantas (Tabela 9), que não diferiu da testemunha não inoculada e sem adição de nitrogênio mineral.

Os isolados UFRGS Lu 35, Lu 38, Lu 10 e Lu 40 apresentaram um alto acúmulo de nitrogênio total no tecido (Tabela 9), não diferindo do tratamento controle com adição de nitrogênio. O elevado teor de nitrogênio total na parte aérea das plantas inoculadas com estes isolados evidencia que o fornecimento de nitrogênio via simbiose rizóbio específico - *L. uliginosus* é eficiente e contribuiu para o desenvolvimento das plantas.

4.3.3 Índice de eficiência relativa dos rizóbios para *Lotus uliginosus*

Os valores médios dos índices de eficiência relativa da fixação de nitrogênio das plantas de *L. uliginosus* inoculadas com isolados de rizóbios e estirpes, em comparação com os tratamentos controle com e sem adição de nitrogênio, de acordo com Brockwell et al. (1966), são apresentados na Figura 3. Os resultados indicam que os tratamentos podem ser separados em três grupos, um superior, com mais de 70% de eficiência, um intermediário, variando de 20 a 50% de eficiência, e um ruim, com eficiência abaixo de 15%. No grupo superior destacam-se os isolados Lu 35 e Lu 38 que apresentaram mais de 90% de índice de eficiência relativa, sendo muito superiores ao obtido com a estirpe SEMIA 839, recomendada para a produção de inoculantes para esta espécie de *Lotus* e a estirpe SEMIA 822.

Observa-se na Figura 3 que os tratamentos inoculados que apresentaram eficiência relativa acima de 70% são os mesmos que não diferiram quanto ao teor de nitrogênio total da parte aérea do tratamento controle com adição de nitrogênio (Tabela 9). Entre estes isolados, UFRGS Lu 35, Lu 38 e Lu 40, foram obtidos da amostra de solo proveniente da Estação Experimental Agronômica da UFRGS, em Eldorado do Sul. Já o isolado UFRGS Lu 10, que também faz parte do grupo com maiores índices de eficiência relativa, foi obtido da amostra de solo proveniente do município de Mostardas, situado na região litorânea do Estado.

Entre os tratamentos que apresentaram índices de eficiência relativa inferiores a 15% está a estirpe SEMIA 839, atualmente recomendada para a produção de inoculantes para *L. uliginosus*. A baixa contribuição da inoculação das estirpes estudadas no acúmulo de nitrogênio total pelas plantas pode ser

um indicativo da perda de eficiência do material. A estirpe U510, que não é recomendada para esta espécie de *Lotus*, apresentou índice de eficiência relativa negativo, sendo o valor mais baixo entre os tratamentos inoculados, o que já era esperado.

Os rizóbios com alto potencial de fixação de nitrogênio em *L. uliginosus*, analisados neste trabalho, podem significar aumento de produção de massa vegetal a campo. Paim e Riboldi (1991) concluíram em seu trabalho que a produção de *L. corniculatus* em área com outras espécies espontâneas foi superior a de *Lotus subbiflorus* e de *Lotus uliginosus*. No entanto, os autores mencionam o uso de um único inoculante para todas as espécies de *Lotus*, sendo possivelmente a causa do baixo resultado observado com *L. subbiflorus*.

Os resultados obtidos neste trabalho foram superiores aos relatados em experimento com *L. uliginosus* por Barrientos *et al.* (2002), que observaram eficiência relativa satisfatória em apenas duas estirpes, sendo que em ambos os casos o acúmulo de nitrogênio na parte aérea do vegetal foi de 7% a mais do que o controle com adição de nitrogênio.

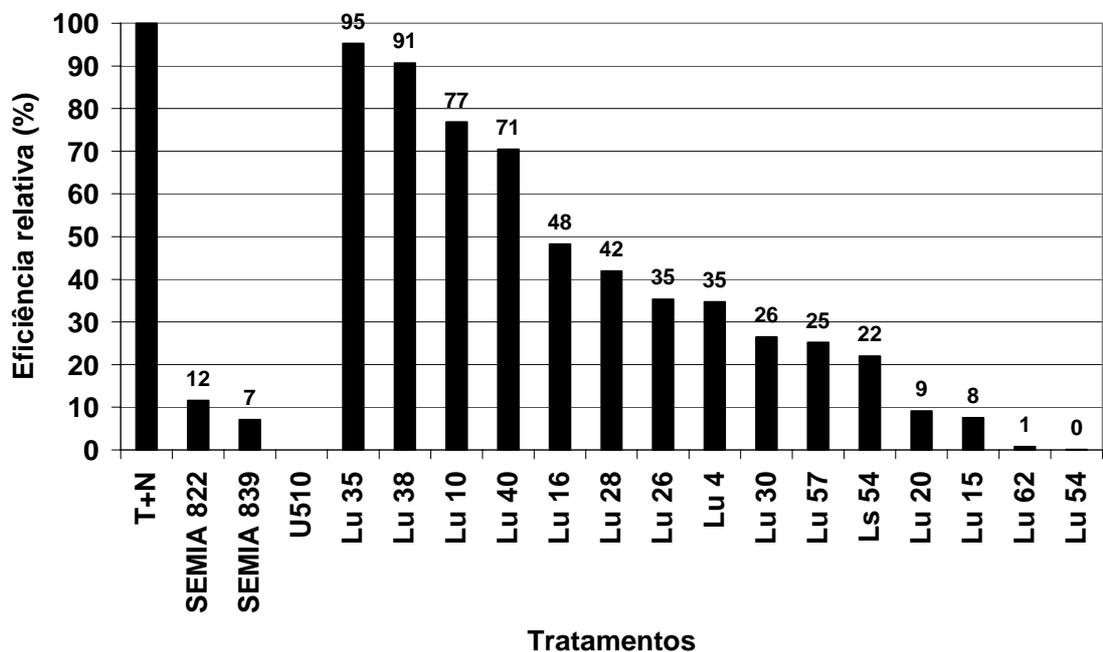


FIGURA 3. Índices de eficiência relativa da fixação de nitrogênio em plantas de *Lotus uliginosus* inoculadas com isolados de rizóbios nativos e estirpes.

Neste trabalho consideramos que, em *L. corniculatus*, nenhum dos rizóbios ou estirpes estudadas conseguiu obter metade do índice de eficiência

do tratamento controle com adição de nitrogênio, o que mostra que ainda persiste a necessidade de se realizar outros estudos para seleção de rizóbios mais eficientes para esta espécie de *Lotus*. No entanto, o isolado UFRGS Lc 269 foi tão eficiente quanto a estirpe uruguaia U510 e muito superior as estirpes SEMIA 816 e SEMIA 806 da coleção oficial brasileira.

Em *L. uliginosus*, os isolados UFRGS Lu 35 e Lu 38 foram equivalentes ao controle não inoculado e com adição de nitrogênio, quanto ao índice de eficiência utilizado. Além disso, também se observa que, nas condições do experimento, estes isolados de rizóbios foram muito superiores a estirpe 839 da coleção SEMIA, atualmente recomendada para a produção de inoculantes para esta espécie de *Lotus* no Brasil. Estes isolados apresentam grande potencial para a recomendação como inoculante, necessitando que sejam realizadas novas avaliações em solos e a campo para que, repetindo os resultados obtidos, possam fazer parte da coleção brasileira.

4.4 Caracterização genotípica dos isolados de rizóbios e estirpes

A caracterização genotípica dos isolados de rizóbios, estudados quanto à eficiência simbiótica, mostrou grandes diferenças quando analisados quanto ao perfil eletroforético de fragmentos de DNA oriundos da amplificação do DNA genômico pela PCR com os oligonucleotídeos iniciadores BOXA1 e ERIC.

4.4.1 Caracterização genotípica dos isolados e estirpes para *Lotus corniculatus*.

As amplificações do DNA genômico com oligonucleotídeos iniciadores BOX A 1-R e ERIC (ERIC1-R e ERIC-2), submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5%, permitiu a obtenção de perfis característicos para as estirpes e isolados utilizados. Na Figura 4 é apresentado o perfil eletroforético dos produtos de amplificação com o oligonucleotídeo iniciador BOX A 1-R das estirpes SEMIA 816, SEMIA 806 e U510 e dos isolados UFRGS Lc 10, Lc 323, Lc 353, Lc 349, Lc 322, Lc 387, Lc 388, Lc 398, Lc 391, Lc 524, Lc 20, Lc 31,

Lc 236, Lc 246 e Lc 269, testados quanto à eficiência da fixação de nitrogênio em plantas de *L. corniculatus*. Na Figura 5 apresentado o perfil eletroforético dos produtos de amplificação do DNA genômico dos mesmos tratamentos com os oligonucleotídeos iniciadores ERIC1-R e ERIC-2.

O dendrograma de similaridade formado pelo agrupamento dos dois perfis eletroforéticos dos isolados de rizóbios e estirpes para *L. corniculatus* é mostrado na Figura 6. No dendrograma, observa-se a formação de dois grandes grupos que apresentaram similaridade em torno de 40% entre si. Em um destes foram agrupadas as estirpes SEMIA 816 e 806 e a estirpe U510, além dos isolados Lc 322, Lc 323, Lc 349 e Lc 10, todos provenientes de amostra de Hulha Negra. No outro, foram agrupados os isolados Lc 353 de Hulha Negra, Lc 387, Lc 388, Lc 398 e Lc391 de Arroio dos Ratos, Lc 20 e Lc 31, de Eldorado do Sul, e Lc 524 de Bagé. Um grupamento formado pelos isolados Lc 236 e Lc 246, oriundos de amostra de Porto Alegre, apresentou apenas 30% de similaridade com os demais. As estirpes SEMIA 816 e U510, ambas recomendadas para inoculação em *L. corniculatus*, agruparam-se com cerca de 85% de similaridade.

O isolado UFRGS Lc 269, que apresentou o maior índice de eficiência relativa (43%) semelhante ao obtido com a estirpe U510 (Figura2), proveniente de amostra de solo coletada em Porto Alegre, de uma área experimental onde se tem histórico de inoculação freqüente com diferentes estirpes, destaca-se por apresentar menos de 25% de similaridade com os demais rizóbios estudados. Também se pode observar que os isolados estudados não mostraram similaridade com as estirpes SEMIA 816, SEMIA 806 e U510, o que descarta a possibilidade de se ter recuperado uma destas estirpes do campo.

Os isolados UFRGS Lc 387 e Lc 388 agruparam-se com 100% de similaridade, podendo-se considerá-los idênticos, levando-se em conta além de suas características genéticas, a sua morfologia colonial, o desempenho na avaliação da fixação biológica (Tabela 6 e Figura 2) e o local de origem, Arroio dos Ratos. Da mesma forma, os isolados UFRGS Lc 391 e Lc 398, também oriundos da amostra de Arroio dos Ratos, que apresentaram 100% de similaridade podem ser considerados idênticos analisando-se as demais características.

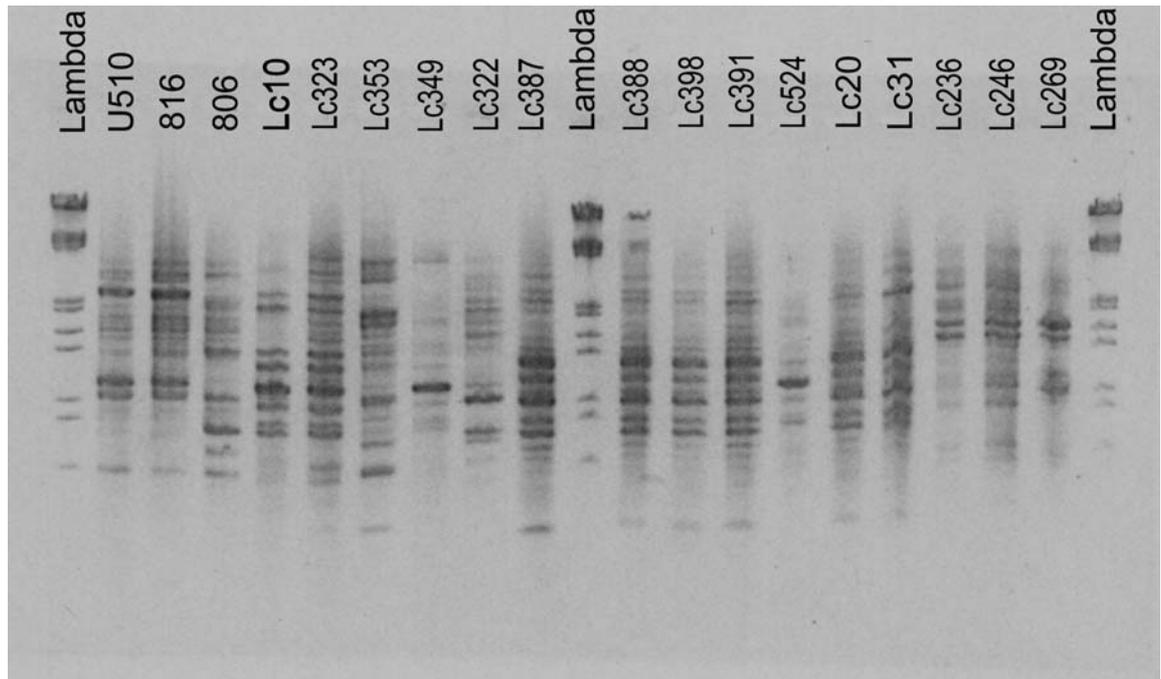


FIGURA 4. Perfil de bandas obtidas com amplificação do DNA genômico de rizóbios, para *L. corniculatus*, com o oligonucleotídeo iniciador BOX A 1-R. Lambda = marcador de peso molecular Lambda ECO RI + Hind III. A foto é apresentada em negativo para melhor visualização das bandas.

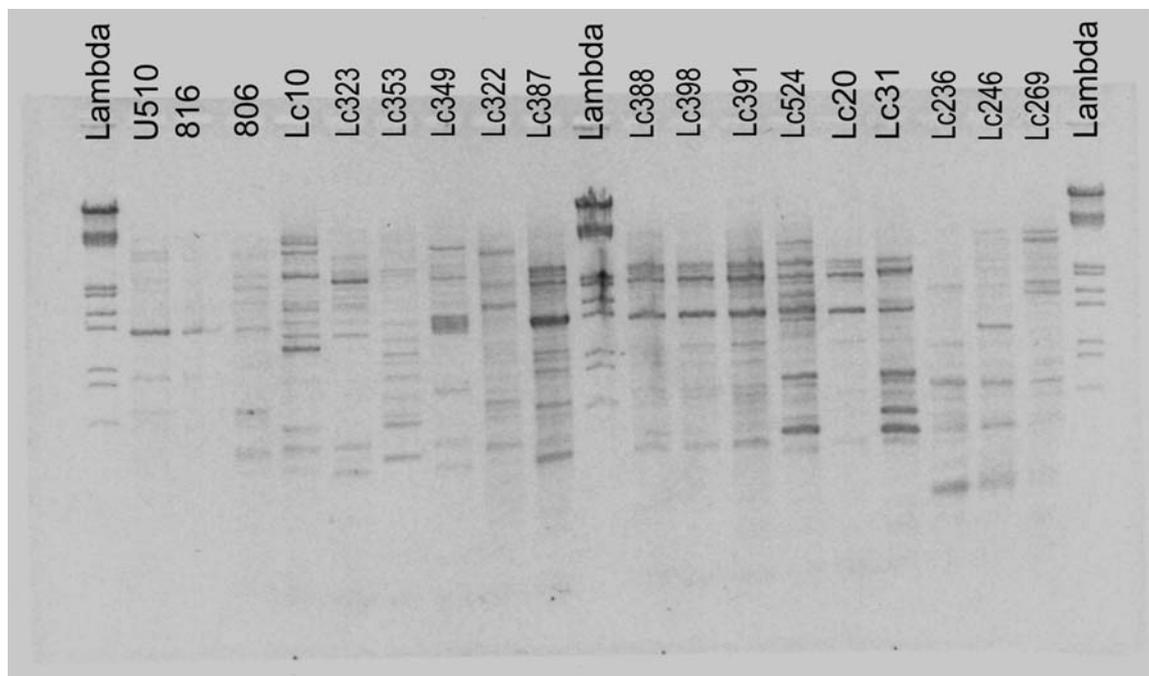


FIGURA 5. Perfil de bandas obtidas com amplificação do DNA genômico de rizóbios, para *L. corniculatus*, com os oligonucleotídeos iniciadores ERIC1-R e ERIC-2. Lambda = marcador de peso molecular Lambda ECO RI + Hind III. A foto é apresentada em negativo para melhor visualização das bandas.

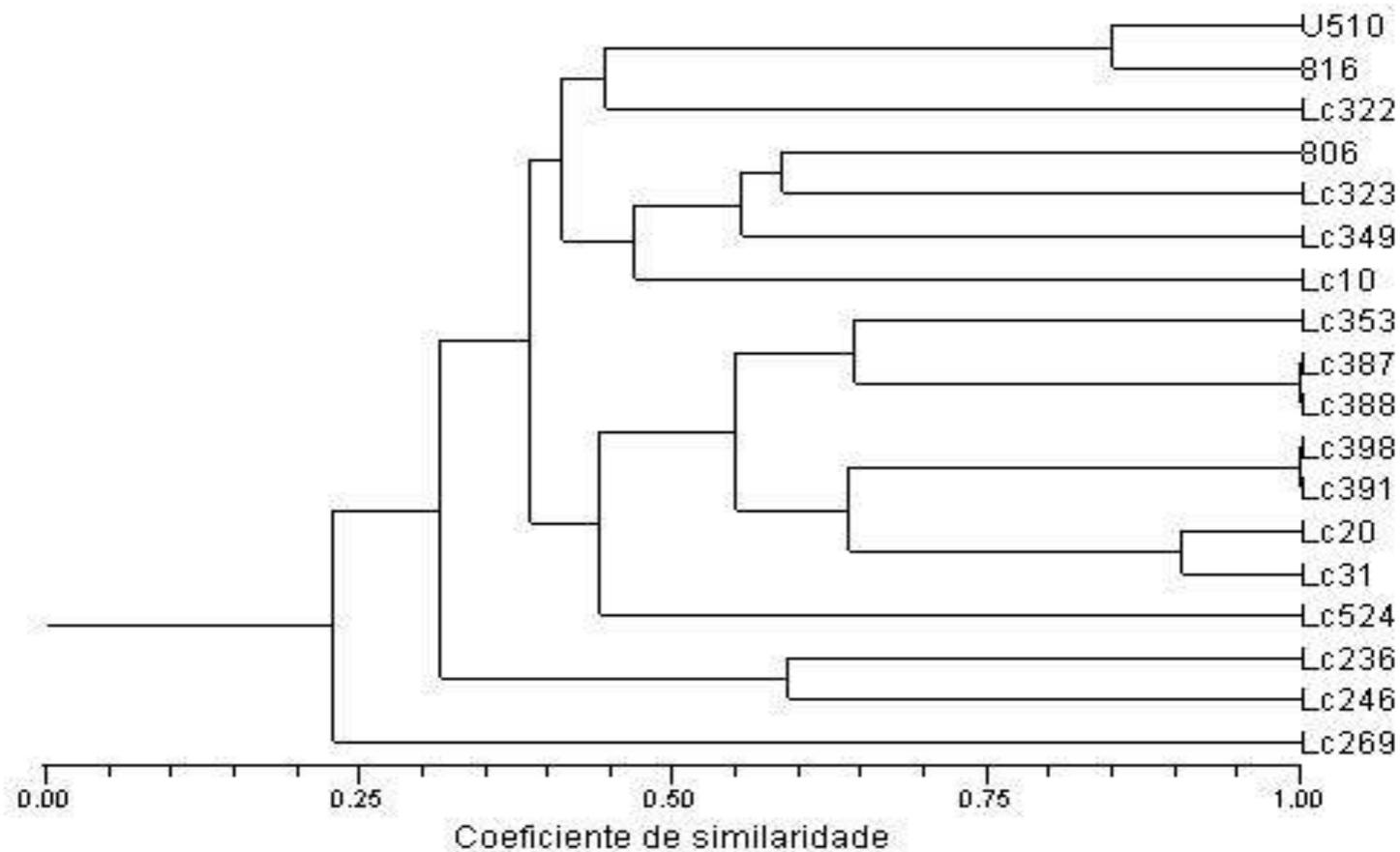


FIGURA 6. Dendrograma de genotipagem de estirpes e isolados de rizóbios para *Lotus corniculatus*. Agrupamento obtido por UPGMA, utilizando-se o coeficiente de Jaccard, para perfil de bandas obtido a partir da PCR com os oligonucleotídeos iniciadores BOX A 1-R + ERIC1-R e ERIC-2.

4.4.2 Caracterização genotípica dos isolados e estirpes para *Lotus uliginosus*.

Na Figura 7 é apresentado o perfil eletroforético dos produtos de amplificação com o oligonucleotídeo iniciador BOX A 1-R das estirpes SEMIA 839, SEMIA 822 e dos isolados UFRGS Lu 4, Lu 10, Lu 15, Lu 16, Lu 20, Lu 26, Lu 28, Lu 30, Lu 35, Lu 38, Lu 40, Lu 54, Lu 62 e Ls 54, avaliados quanto à eficiência da fixação de nitrogênio em plantas de *L. uliginosus*, e as estirpes EEL 3583 e EEL 8084, da coleção da Estação Experimental de Lages. Na Figura 8 é apresentado o perfil eletroforético dos produtos de amplificação do DNA genômico dos mesmos tratamentos com os oligonucleotídeos iniciadores ERIC1-R e ERIC-2.

O dendrograma de similaridade formado pelo agrupamento dos dois perfis eletroforéticos dos isolados de rizóbios e estirpes para *L. uliginosus* é mostrado na Figura 9. Observa-se que houve a formação de um grupo composto pelos isolados Lu 26, obtido da amostra de Mostardas, e Ls 54, isolado de *L. subbiflorus*, de solo de Porto Alegre, e a estirpe EEL 3583 com apenas 20% de similaridade com os demais rizóbios. Outros dois grupos foram formados com 30% de similaridade. Um deles contendo as estirpes SEMIA 822 e EEL 8084 e os isolados Lu 28, obtido de Mostardas, e Lu 62, de Hulha Negra. O outro foi formado contendo a estirpe SEMIA 839 e os demais isolados.

Na análise de agrupamento, com estes oligonucleotídeos iniciadores, observa-se que nenhum dos isolados estudados apresentou 100% de similaridade entre si e as estirpes estudadas, indicando que estes isolados são diferentes das estirpes e constituem um novo banco de rizóbios para a seleção de estirpes mais eficientes.

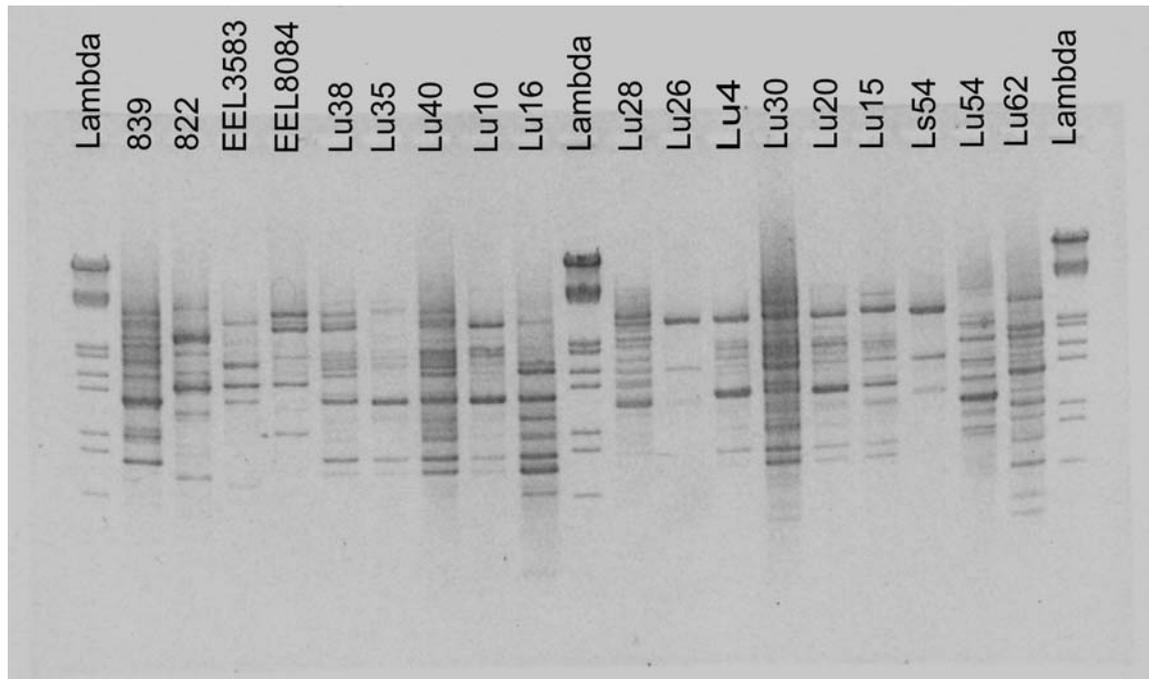


FIGURA 7. Perfil de bandas obtidas com amplificação do DNA genômico de rizóbios, para *L. uliginosus*, com o oligonucleotídeo iniciador BOX A 1-R. Lambda = marcador de peso molecular Lambda ECO RI + Hind III. A foto é apresentada em negativo para melhor visualização das bandas.

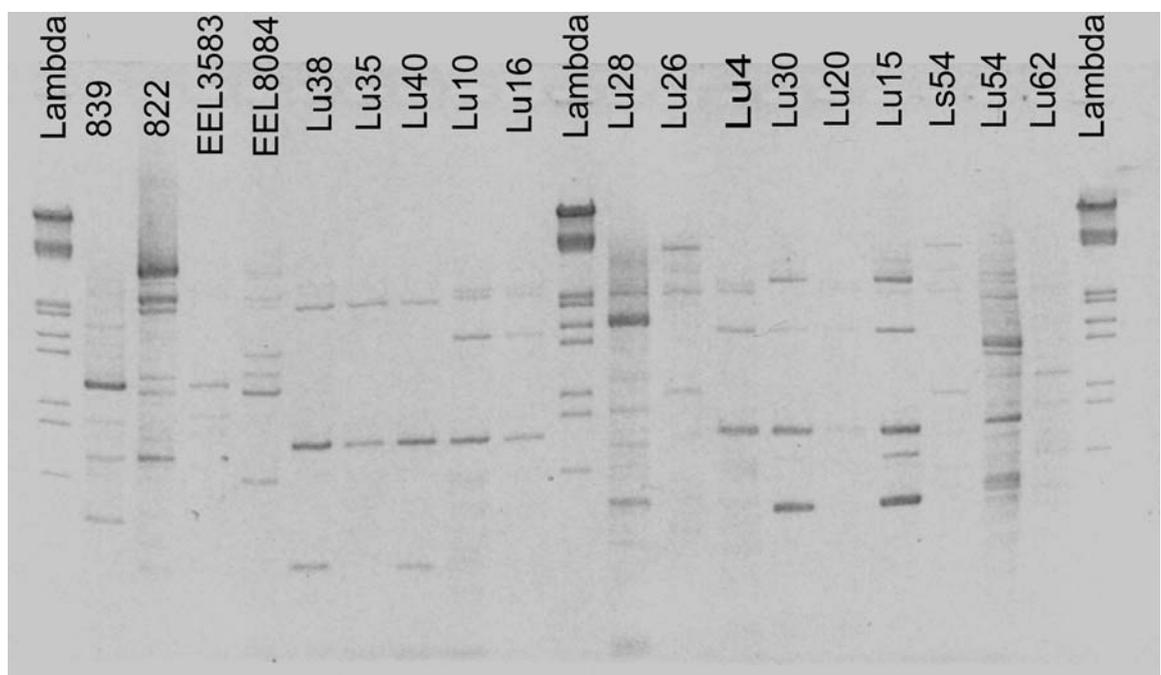


FIGURA 8. Perfil de bandas obtidas com amplificação do DNA genômico de rizóbios, para *L. uliginosus*, com os oligonucleotídeos iniciadores ERIC1-R e ERIC-2. Lambda = marcador de peso molecular Lambda ECO RI + Hind III. A foto é apresentada em negativo para melhor visualização das bandas.

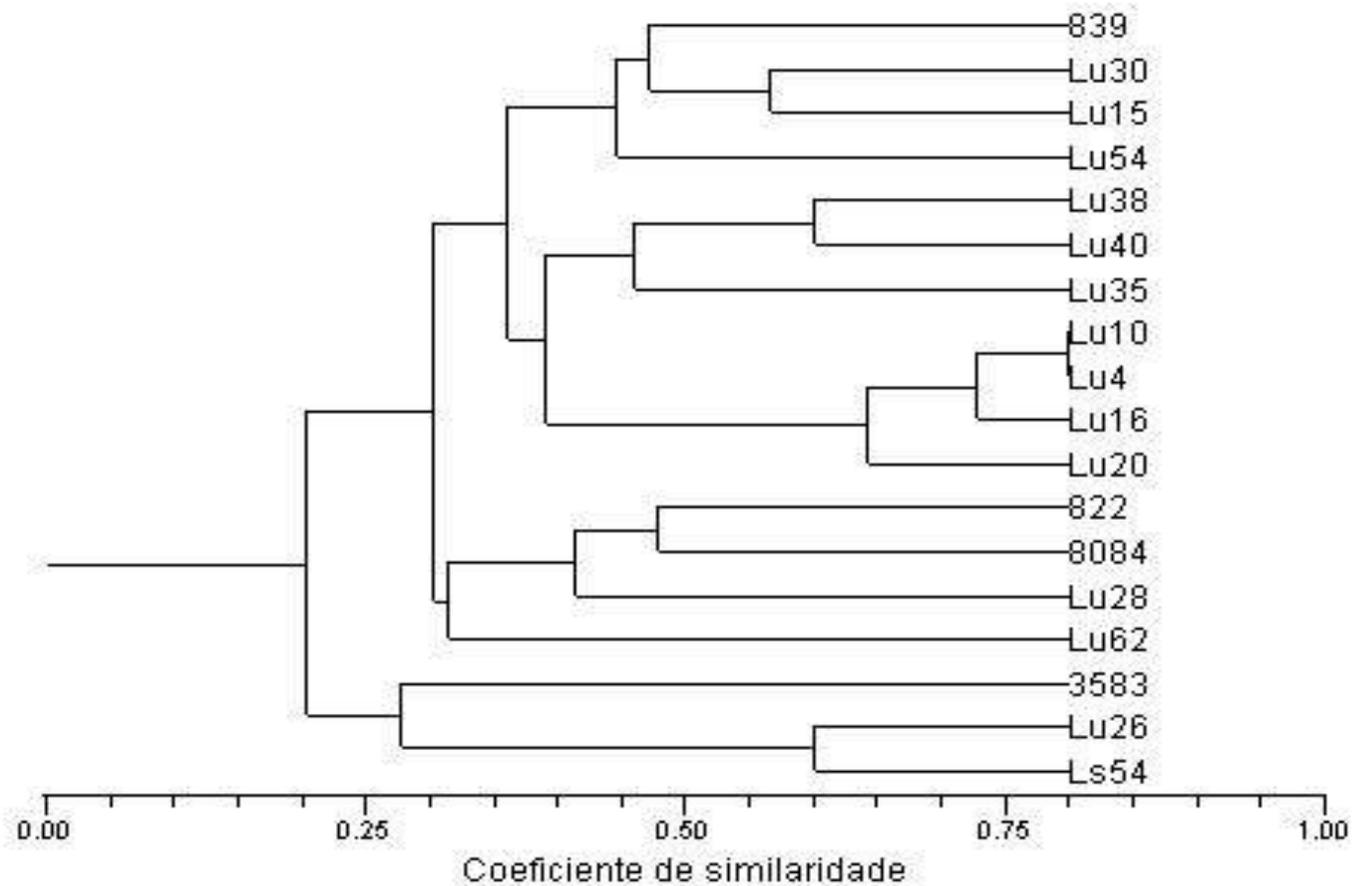


FIGURA 9. Dendrograma de genotipagem de estirpes e isolados de rizóbios para *Lotus uliginosus*. Agrupamento obtido por UPGMA, utilizando-se o coeficiente de Jaccard, para perfil de bandas obtido a partir da PCR com os oligonucleotídeos iniciadores BOX A 1-R + ERIC1-R e ERIC-2.

4.5 Índice de diversidade de Shannon

Para os rizóbios isolados em *L. corniculatus* avaliados quanto ao perfil eletroforético da PCR obtidos com os oligonucleotídeos BOXA1 e ERIC, o índice de Shannon-Weaver foi calculado como sendo de 2,56 e para os isolados em *L. uliginosus* de 2,79.

Estes dados demonstram maior índice de diversidade quando comparados com os obtidos com os rizóbios isolados de *L. glaber* e *L. subbiflorus* estudados por Fontoura (2007) e que apresentaram índices de 2,098 e 2,053, respectivamente. Índices de diversidades inferiores foram obtidos por Mostasso *et al* (2002) com rizóbios isolados de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) em três áreas do cerrado (com leguminosas, sem leguminosas e não cultivadas). Estes isolados apresentaram para o perfil de amplificação com o oligonucleotídeo ERIC uma diversidade de 1,120, 1,754 e 1,936, respectivamente. Para o oligonucleotídeo BOX, estes isolados apresentaram índices de 1,855, 2,231 e 3,090.

5 CONCLUSÕES

a) Nos solos do Rio Grande do Sul existem rizóbios nativos capazes de formar nódulos e fixar nitrogênio em *Lotus corniculatus* e *Lotus uliginosus*.

b) O isolado UFRGS Lc 269 destaca-se por ser tão eficiente quanto a estirpe U510 e superior às estirpes recomendadas SEMIA 816 e SEMIA 806.

c) Existem rizóbios nativos mais eficientes na fixação simbiótica de nitrogênio em *Lotus uliginosus* do que a estirpe recomendada SEMIA 839.

d) Os isolados UFRGS Lu 35, UFRGS Lu 38, UFRGS Lu 10 e UFRGS Lu 40 foram excepcionalmente superiores à estirpe SEMIA 839.

e) Os isolados de rizóbios para *Lotus corniculatus* estudados diferem das estirpes SEMIA 816 e SEMIA 806, apresentando menos de 55% de similaridade com estas estirpes recomendadas.

f) Os isolados de rizóbios para *Lotus uliginosus* estudados diferem da estirpe SEMIA 839, apresentando menos de 50% de similaridade.

g) A estirpe SEMIA 806 demonstra uma provável perda de eficiência, necessitando que seja retirada da Relação dos microrganismos autorizados para a produção de inoculantes no Brasil.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACUÑA, H. Comparación de variedades de tres especies del género *Lotus* (*L. corniculatus* L., *L. uliginosus* Cav. y *L. tenuis* Wald et Kit.) em suelos de aptitud arrocerá. **Agricultura Técnica**, (Chile), vol.58, p. 7-14, 1998.
- ALVES, J.B. et al. Solubilização e fosfato natural de Araxá por estirpes de rizóbio inoculadas em trevo branco. In FERTBIO 2004, Lages. **Resumos...** Lages: CAV-UDESC, 2004.
- ANDRADE, D.S.; MURPHY, P.J.; GILLER, K.E. The diversity of *Phaseolus*-nodulating rhizobial populations is altered by liming of acids soils planted with *Phaseolis vulgaris* L. in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, n.8, p. 4025-4034, 2002.
- ANTOUN, H. et al. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). **Plant and Soil**, Dordecht, v.204, p.57-67, 1998.
- BARAIBAR, A.; FRIONI, L.; GUEDES, M.E.; LJUNGGREN, H. Symbiotic effectiveness and ecological characterization of indigenous *Rhizobium loti* populations in Uruguay **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.34, n.6, p. 1011-1017, jun. 1999.
- BARRIENTOS, L.; HIGUERA, M.; ACUNA, H. 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), vol.62, n.2, p. 226-236, 2002.
- BROCK, J.C. Growth and nitrogen fixation of pure stands of three pasture legumes with high/low phosphate. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v.16, n.6, p.483-491, 1973.
- 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.
- BROSE, E. Avaliação de rizóbio em cornichão em solo ácido. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 27, n.9, p.1237-1242, 1992.(a)

- BROSE E. Seleção de rizóbio para *Lotus pedunculatus* em solo ácido
Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.27, n.3, p. 409-415, 1992.(b)
- CARSON, K.C.; DILWORTH, M.J.; GLENN, A.R. Siderophe production and iron transport in *Rhizobium leguminosarum*. **J. Plant Nutr.** 15:2203-2220, 1992.
- CARVALHO, F.G. **Caracterização fenotípica e genotípica de variantes espontâneos isolados de estirpes de *Bradyrhizobium* sp recomendadas para soja (*Glycine max*)** 2003. 104f. 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 , RS, Brasil, maio, 2003.
- CHABOT, R. et al. Effect of phosphorus on root colonization and growth promotion of maize by bioluminescent mutants of phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.30, n.12, p.1615-1618, 1998.
- CHAKRABARTI, S.K.; MISHRA, A.K.; CHAKRABARTTY, P.K. Metabolism of glucose and gluconate in fast and slow growing rhizobia. **Phytochemistry**, [S.I.], v.26, n.1, p.85-87, 1987.
- 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, p.1812-1817, 1988.
- CURLEY, R.L.; BURTON, J.C. Compatibility of *Rhizobium japonicum* with chemical seed protectants. **Agronomy Journal**, Madison, v. 67, p.807-808, 1975.
- DATE, R.A. Collection, isolation, characterization and conservation of *Rhizobium*. p. 95-109. In J.M. Vincent (ed.) Nitrogen Fixation in Legumes. Academic Press, Canberra, Australia, 1982.
- de BRUJIN, F.J. Use of repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p. 2180-2187, 1992.
- DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO n° 58. **Instrução Normativa n° 10**, 2006.
- DUHAM, J.S.; DUDEJA, S.S.; KHURANA, A.L. Siderophe production in relation to N₂ fixation and iron uptake in pigeonpea-*Rhizobium* symbiosis. **Folia Microbiologica**, v.43, p.421-426, 1998.
- FONTOURA, R.A. **Seleção de rizóbios nativos, de solos do Rio Grande do Sul, para *Lotus glaber* e *L. subbiflorus*** 2007. 83f. Dissertação

(mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Porto Alegre, 2007.

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

GARRITY, G.M.; HOLT, J.G. The road map to the *Manual*. In: BOONE, D.R.; CATENHOLZ, R.W., eds. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. New York, Springer-Verlag, 2001. v.1. p. 119-166.

GIONGO, A. **Diversidade de rizóbios nativos que nodulam feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em área de campo nativo, com adubação mineral e adubação orgânica**. 2003. 79f. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Porto Alegre, 2003.

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

GREENWOOD, R.M.; PANKHURST, C.E. The *Rhizobium* component of the nitrogen-fixing symbiosis. **Proceedings of the New Zealand Grassland Association**, v.38, n.1, p. 167-174, 1977.

HUNGRIA, M.; BODDEY, L.H.; SANTOS, M.A.VARGAS, M.A.T. Nitrogen fixation capacity and nodule occupancy by *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 27, p. 393-399, 1998.

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

IDRISSI, M.M.E. et al. Characterization of rhizobia isolated from Carob tree (*Ceratonia siliqua*). **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.80, p.165-173, 1996.

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

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

JARVIS, B.D.W.; van BERKUM, P.; CHEN, W.X.; NOUR, S.M.; FERNANDEZ, M.P.; CLEYET-MAREL, J.C.; GILLIS, M. Transfer of *Rhizobium loti*, *R. huakuii*, *R. ciceri*, *R. mediterraneum* e *R. tianshanense* to *Mesorhizobium*

- gen. Nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 47, p. 895-898, 1997.
- JORDAN, D.C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium japonicum* gen. Nov., a genus of slow growing root nodule bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 32, p. 378-380, 1982.
- KEYSER, H.H.; BOHLOOL, B.B.; HU, T.S.; WEBER, D.F. Fast-growing rhizobia isolated from root nodules of soybean. **Science**, v.215, p.1631-1632, 1982.
- KISHINEVSKY, B.D. et al. Phenotypic and genetic diversity among rhizobia isolated from three *Hedysarum* species: *H. spinosissimum*, *h. coronarium* and *h. flexuosum*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.251, p.143-153, 2003.
- KOLLING, J.; SCHOLLES, D.; SELBACH, P.A. Seleção de estirpes de *Rhizobium* para trevo branco subterrâneo, alfafa e cornichão. **Agronomia Sulriogradense**, Porto Alegre, v.19, n. 2, p. 103-111, 1983.
- LABANDERA, C. Colección Nacional de Cepas de *Rhizobium* spp. Ministerio de Ganadería, 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.
- LABANDERA, C. Metodologías aplicadas a la evaluación de Rhizobios para inoculantes para leguminosas forrajeras em Uruguay. Trabajos técnicos. Departamento de Microbiología de Suelos. Montevideo – Uruguay, 2004.
- LAMB, J.W.; HOMBRECHER, G.; JOHNSTON, A.W.B. Plasmid-determinant nodulatoins and nitrogen-fixation abilities in *rhizobium phaseoli*. **Molecular and General Genetics**, New York, v.186, p.449-452, 1982.
- LANGER, R.H.M. Pastures Plants. In: R.H.M. Langer (Ed.) Pastures: Their ecology and management. Oxford University Press, Auckland, Australia, 1990.
- LAGUERRE, G.; LOUVRIER, P.; ALLARD, M.R.; AMARGER, N. Compatibility of Rhizobial Genotypes within Natural Populations of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* for nodulation of host legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, n. 4, p. 2276-2283, abr.2003.
- LEGENDRE, L. & LEGENDRE, P. Numerical ecology. Elsevier, Amsterdam, 1983.
- LOPES, E.S.; GIARDINI, A.R.; KIEHL, R. Especificidade hospedeira e pré-seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* para variedades Santa Rosa, Viçosa e IAC-2 de soja *Glycine max* (L.) Merrill. **Bragantia**, Campinas, v.35, p.1-12, 1976.

- LÓPEZ, J.; PRESTES, P.J.Q.; MAGALHÃES, E.A. A curva de crescimento e a composição em carboidratos solúveis, estruturais, lignina e proteína e a digestibilidade em cornichão. *In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE PASTAGENS*, 9, 1965, São Paulo. Anais... São Paulo: Alarico, 1966. p. 851-887.
- MARTINEZ-DE-DRETZ, G.; ARIAS, A.; CUTINELLA, M.R. de. Fast and slow growing rhizobia: differences in sucrose utilization and invertase activity. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.20, p.605-609, 1974.
- MARSUDI, N.D.S.; GLENN, A.R.; DILWORTH, M.J. Identification and characterization of fast and slow growing root nodule bacteria from South-Western Australian soils able to nodulate *Acacia saligna*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.31, p.1229-1238, 1999.
- MOSTASSO, L. et al. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains of the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 73, p.121-132, 2002.
- MUELLER, J.G.; SKIPPER, H.D.; SHIPE, E.R.; GRIMES, L.W.; WAGNER, S.C. Intrinsic antibiotic resistance in *Bradyrhizobium japonicum*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 20, p. 879-882, 1998.
- MUNNS, D.N.; KEYSER, H.H. Responses of Rhizobium strains to acid and aluminium stress. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.13, p. 115-118, 1981.
- NEILANDS, J.B. Iron absorption and transport in microorganisms. **Annual Review of Nutrition**, v.1, p.27-46, 1981.
- NEILANDS, J.B. Perspectives in biochemistry and biophysics: siderophores. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.302, p.1-3, 1993.
- OLIVEIRA, L.A.; MAGALHÃES, H.P. Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 30, p. 203-208, 1999.
- PAIM, N.R. Research on *Lotus* spp. *In: Rio Grande do Sul, Southern Brazil. Lotus Newsletter*, v. 19, p. 37-43, 1988.
- PAIM, N.R.; RIBOLDI, J. Comparação entre espécies e cultivares do gênero *Lotus* **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, 26(10): 1699-1704, out. 1991.
- DEL PAPA, M.F. et al. Isolation and characterization of alfalfa-nodulating rhizobia present in acidic soils of central Argentina and Uruguay. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, p.1420-1427, 1999.
- PEIX, A. et al. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber

- conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.33, p.103-110, 2001.
- PERES, J.R.R.; MENDES, I.C.; SUHET, A.R.; VARGAS, M.A.T. Eficiência e competitividade de estirpes de rizóbio para soja em solos de cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.17, p.357-363, 1993.
- POLI, J.L.E.H.; CARMONA, P.S. Sinopse do ensaios da Estação Experimental de Forrageiras de São Gabriel de 1941 a 1965. **Boletim Técnico**, 5. Secretaria da Agricultura, Estado do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 1966. 212 p.
- 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.
- RISSO, D.; CARAMBULA, M. *Lotus* El Rincón. Producción y utilización de los mejoramientos. **Boletín de Divulgación n°65**, INIA, 1998. 32 p.
- RODRIGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, v.17, p.319-339, 1999.
- RODRIGUEZ-NAVARRO, D.N. et al. Characterization of *Rhizobium* spp. Bean isolates from South West Spain. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.32, p.1601-1613, 2000.
- ROHLF, F.J. & SLICE, D.E. NTSYS – Numerical Taxonomy and Multivariate Analyses System. New York, Exater Software, 1992. 115 p.
- RUPELA, O.P.; SUDARSHANA, M.R. Displacement of native rhizobia nodulating chick pea (*Cicer arietinum* L.) by an inoculant strain through soil solarization. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.10, p.207-212, 1990.
- SÁ, E.L.S. de **Diversidade fenotípica e genética de rizóbios isolados de feijoeiro (*Phaseolis vulgaris*) em solos ácidos de Cunha – SP**. 2001. 109f. Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.
- SALERNO, A.R.; TCACENCO, F.A. Características e técnicas de cultivo de forrageiras de estação fria no Vale do Itajaí e Litoral de Santa Catarina. **Boletim Técnico**, 38. EMPASC, Florianópolis, 1986. 56 p.
- SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas. **Summa Phitopathologica**, Piracicaba, v.1, n.3, p.231-234, 1975.
- SCHEFFER-BASSO, S.M.; VOSS, M.; JACQUES, A.V.A. Nodulação e Fixação Biológica de Nitrogênio de *Adesmia latifolia* e *Lotus corniculatus* em

- vasos de Leonard. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 3, p. 687-693, 2001.
- SCHEFFER-BASSO, S.M.; VENDRÚSCULO, M.C.; BARÉA, K.; BENINCÁ, R.C.; LUBENOW, R.; CECCHETTI, D. Comportamento de Leguminosas (*Adesmia*, *Lótus*, *Trifolium*) em mistura com Festuca. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 6, p. 2197-2203, 2002.
- SCHWYN, B.; NEILANDS, J.B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, v.160, p.47-56, 1987.
- SHANNON, C.E.; WEAVER, W. The Mathematical Theory of Communication. **Bell Sys. Tech. J.**, Illinois, v. 27, p. 379-423, 1948.
- SOMASEGARAN, P.; HOBEN, J.H. Handbook for rhizobia: methods in legume-Rhizobium technology. New York: Springer-Verlag, 1994. 450p.
- SOSTER, M.T.B.; SCHEFFER-BASSO, S.M.; DALL'AGNOL, M. Caracterização morfofisiológica de genótipos de cornichão (*Lotus corniculatus* L.) **R. Bras. Zootec.**, v.33, n.6, p. 1654-1661, 2004 (Supl. 1).
- SOSTER, M.T.B.; SCHEFFER-BASSO, S.M.; DALL'AGNOL, M.; BRUSTOLIN, R.; FONTANELI, R.S. Caracterização agrônômica de genótipos de cornichão (*Lotus corniculatus* L.) **R. Bras. Zootec.**, v. 33, n.6, p. 1662-1671, 2004 (Supl. 1).
- TEDESCO, M.J. et al. **Análise de solo, planta e outros materiais**. 2° ed., Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS. 1995. 174 p.
- VANCE, C.P.; GRAHAM, P.H. Nitrogen fixation in agriculture: application and perspectives. In: TIKHONOVICH, I.A.; PROVOROV, N.A.; ROMANOV, V.I.; NEWTON, W.E. (Eds.). **Nitrogen fixation: Fundamentals and applications**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995. p.77-86.
- VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 19, p. 6823-6831, 1991.
- VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUJIN, F.J.; LUPSKI, J.R. 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.
- WOOD, M.; COOPER, J.E. Screening clover and Lotus rhizobia for tolerance of acidity and aluminium. **Soil Biology and Biochemistry**, v.17, p.493-497, 1985.

7 - APÊNDICES

APÊNDICE 1. – 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.

APÊNDICE 2. – 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.

APÊNDICE 3. - 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.

APÊNDICE 4. Características de isolados de rizóbios obtidos em *Lotus corniculatus* L.

Isolado	Origem	Detecção de nodulação (dias)	Morfologia colonial			
			Tamanho (mm)	Borda	Superfície	Densidade ótica
UFRGS Lc1	Hulha Negra		<2	irregular		translúcida
UFRGS Lc2	Hulha Negra		3			translúcida
UFRGS Lc3	Hulha Negra		3			translúcida
UFRGS Lc4	Hulha Negra		<1		granulosa	translúcida
UFRGS Lc5	Hulha Negra		<1		granulosa	translúcida
UFRGS Lc6	Hulha Negra		<2		granulosa	opaca
UFRGS Lc7	Hulha Negra		<2			
UFRGS Lc8	Hulha Negra	13	<2		granulosa	opaca
UFRGS Lc9	Hulha Negra	25	<2		granulosa	translúcida
UFRGS Lc10	Hulha Negra	13	<3	irregular		opaca
UFRGS Lc11	Hulha Negra	20	<1			translúcida
UFRGS Lc12	Hulha Negra	25	<2			opaca
UFRGS Lc322	Hulha Negra	10	10			
UFRGS Lc323	Hulha Negra	10	5			
UFRGS Lc324	Hulha Negra	10	4	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc325	Hulha Negra	10	>10	lisa	lisa	
UFRGS Lc326	Hulha Negra	10				
UFRGS Lc327	Hulha Negra	13	4	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lc328	Hulha Negra	13	4	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lc329	Hulha Negra	13	5			
UFRGS Lc330	Hulha Negra	13	10			
UFRGS Lc331	Hulha Negra	13	5	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lc332	Hulha Negra	13	>10	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc333	Hulha Negra	13	3	lisa	lisa	
UFRGS Lc334	Hulha Negra	18	5	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc335	Hulha Negra	18	5	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lc336	Hulha Negra	18	4			opaca
UFRGS Lc337	Hulha Negra	18	10			
UFRGS Lc338	Hulha Negra	18	3			
UFRGS Lc339	Hulha Negra	15	5	lisa		translúcida
UFRGS Lc340	Hulha Negra	15	5			translúcida
UFRGS Lc341	Hulha Negra	15	6	lisa	granulosa	
UFRGS Lc342	Hulha Negra	20	>6			
UFRGS Lc343	Hulha Negra	20	10			
UFRGS Lc344	Hulha Negra	20	5	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc345	Hulha Negra	25	3	lisa	granulosa	
UFRGS Lc346	Hulha Negra	25	5	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lc347	Hulha Negra	25	5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc348	Hulha Negra	11	5	lisa	lisa	
UFRGS Lc349	Hulha Negra	47	10	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lc350	Hulha Negra		6	lisa	granulosa	
UFRGS Lc351	Hulha Negra		6	lisa	granulosa	
UFRGS Lc352	Hulha Negra		>5	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc353	Hulha Negra		<2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc354	Hulha Negra		4	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc355	Hulha Negra		5	irregular	granulosa	opaca
UFRGS Lc356	Hulha Negra		>5			opaca
UFRGS Lc357	Hulha Negra		5			opaca
UFRGS Lc358	Hulha Negra		>5	lisa	lisa	translúcida

APÊNDICE 4. Continuação...

Isolado	Origem	Detecção de nodulação (dias)	Morfologia colonial			
			Tamanho (mm)	Borda	Superfície	Densidade ótica
UFRGS Lc361	Hulha Negra		3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc362	Hulha Negra		1		granulosa	translúcida
UFRGS Lc365	Hulha Negra		3			opaca
UFRGS Lc366	Hulha Negra		4			opaca
UFRGS Lc367	Hulha Negra		6			opaca
UFRGS Lc368	Hulha Negra		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc369	Hulha Negra		5			opaca
UFRGS Lc370	Hulha Negra		4			opaca
UFRGS Lc371	Hulha Negra		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc372	Hulha Negra		7		granulosa	translúcida
UFRGS Lc373	Hulha Negra		5			opaca
UFRGS Lc374	Hulha Negra		6			opaca
UFRGS Lc375	Hulha Negra		4			opaca
UFRGS Lc376	Hulha Negra		6			opaca
UFRGS Lc377	Hulha Negra		<3			opaca
UFRGS Lc378	Hulha Negra		3			opaca
UFRGS Lc379	Hulha Negra		5			opaca
UFRGS Lc380	Hulha Negra		3			opaca
UFRGS Lc381	Hulha Negra		4		granulosa	opaca
UFRGS Lc382	Hulha Negra		>7		granulosa	translúcida
UFRGS Lc383	Hulha Negra		5			opaca
UFRGS Lc384	Hulha Negra		4			translúcida
UFRGS Lc385	Hulha Negra		4			translúcida
UFRGS Lc13	Eldorado do Sul	11	3		granulosa	opaca
UFRGS Lc14	Eldorado do Sul	11	5		granulosa	translúcida
UFRGS Lc15	Eldorado do Sul	11	4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc16	Eldorado do Sul	11	7			opaca
UFRGS Lc17	Eldorado do Sul	11	6		granulosa	translúcida
UFRGS Lc18	Eldorado do Sul	11	3		granulosa	opaca
UFRGS Lc19	Eldorado do Sul	11	>5		granulosa	translúcida
UFRGS Lc20	Eldorado do Sul	11	>5		granulosa	translúcida
UFRGS Lc21	Eldorado do Sul	11	3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc22	Eldorado do Sul	11	5		granulosa	translúcida
UFRGS Lc23	Eldorado do Sul	11	5			opaca
UFRGS Lc24	Eldorado do Sul	12	5		granulosa	translúcida
UFRGS Lc25	Eldorado do Sul	14	6		granulosa	opaca
UFRGS Lc26	Eldorado do Sul	14	3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc27	Eldorado do Sul	14	3			translúcida
UFRGS Lc28	Eldorado do Sul	14	2	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lc29	Eldorado do Sul	14	5		granulosa	translúcida
UFRGS Lc30	Eldorado do Sul	14	>5		granulosa	translúcida
UFRGS Lc31	Eldorado do Sul	14	5			opaca
UFRGS Lc32	Eldorado do Sul	14	4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc33	Eldorado do Sul	14	4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc34	Eldorado do Sul	14	3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc35	Eldorado do Sul	14	4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc36	Eldorado do Sul	14	7			opaca
UFRGS Lc37	Eldorado do Sul	20	6		granulosa	translúcida
UFRGS Lc38	Eldorado do Sul	20	4		granulosa	translúcida

APÊNDICE 4. Continuação...

Isolado	Origem	Detecção de nodulação (dias)	Morfologia colonial		
			Tamanho (mm)	Borda	Superfície e Densidade ótica
UFRGS Lc41	Eldorado do Sul	20	5		granulosa translúcida
UFRGS Lc42	Eldorado do Sul	20	5		granulosa translúcida
UFRGS Lc43	Eldorado do Sul	20	6		granulosa translúcida
UFRGS Lc44	Eldorado do Sul	20			
UFRGS Lc47	Eldorado do Sul	20	>5		granulosa translúcida
UFRGS Lc48	Eldorado do Sul	20	7		opaca
UFRGS Lc49	Eldorado do Sul	20	6		granulosa translúcida
UFRGS Lc50	Eldorado do Sul	20	3		granulosa translúcida
UFRGS Lc51	Eldorado do Sul	25	>5		granulosa translúcida
UFRGS Lc52	Eldorado do Sul	25	3		granulosa translúcida
UFRGS Lc53	Eldorado do Sul	25	>5		granulosa translúcida
UFRGS Lc54	Eldorado do Sul	25	3		granulosa translúcida
UFRGS Lc55	Eldorado do Sul	25	>5		granulosa translúcida
UFRGS Lc56	Eldorado do Sul	29	3		granulosa translúcida
UFRGS Lc57	Eldorado do Sul	34	5		granulosa translúcida
UFRGS Lc58	Eldorado do Sul	34	5		granulosa translúcida
UFRGS Lc59	Eldorado do Sul	34	3		granulosa translúcida
UFRGS Lc60	Eldorado do Sul		3	lisa	lisa translúcida
UFRGS Lc61	Eldorado do Sul		3	lisa	lisa translúcida
UFRGS Lc62	Eldorado do Sul		4	lisa	lisa translúcida
UFRGS Lc63	Eldorado do Sul		4	lisa	granulosa translúcida
UFRGS Lc64	Eldorado do Sul		5	lisa	granulosa translúcida
UFRGS Lc65	Eldorado do Sul		4	lisa	granulosa
UFRGS Lc66	Eldorado do Sul		4	lisa	granulosa
UFRGS Lc67	Eldorado do Sul		3	lisa	granulosa
UFRGS Lc68	Eldorado do Sul		3	lisa	granulosa
UFRGS Lc69	Eldorado do Sul		3	lisa	granulosa
UFRGS Lc70	Eldorado do Sul		3	lisa	granulosa
UFRGS Lc71	Eldorado do Sul		3	lisa	granulosa
UFRGS Lc72	Eldorado do Sul		5	lisa	granulosa
UFRGS Lc73	Eldorado do Sul		7	lisa	lisa translúcida
UFRGS Lc74	Eldorado do Sul		2	lisa	granulosa translúcida
UFRGS Lc75	Eldorado do Sul		3	lisa	granulosa
UFRGS Lc76	Eldorado do Sul		4	lisa	granulosa
UFRGS Lc77	Eldorado do Sul		5	lisa	granulosa translúcida
UFRGS Lc78	Eldorado do Sul		6	lisa	granulosa translúcida
UFRGS Lc79	Eldorado do Sul		6	lisa	granulosa translúcida
UFRGS Lc80	Eldorado do Sul		6	lisa	granulosa translúcida
UFRGS Lc81	Eldorado do Sul		5	lisa	lisa translúcida
UFRGS Lc82	Eldorado do Sul		5	lisa	granulosa translúcida
UFRGS Lc83	Eldorado do Sul		7	lisa	lisa translúcida
UFRGS Lc84	Eldorado do Sul		3	lisa	granulosa translúcida
UFRGS Lc85	Eldorado do Sul		4	lisa	granulosa
UFRGS Lc86	Eldorado do Sul		4	lisa	granulosa
UFRGS Lc87	Eldorado do Sul		5	lisa	granulosa translúcida
UFRGS Lc88	Eldorado do Sul		3	lisa	granulosa
UFRGS Lc89	Eldorado do Sul		4	lisa	granulosa
UFRGS Lc90	Eldorado do Sul		4	lisa	granulosa
UFRGS Lc91	Eldorado do Sul		5	lisa	lisa opaca

APÊNDICE 4. Continuação...

Isolado	Origem	Detecção de nodulação (dias)	Morfologia colonial			
			Tamanho (mm)	Borda	Superfície	Densidade ótica
UFRGS Lc94	Eldorado do Sul		4	lisa	granulosa	
UFRGS Lc95	Eldorado do Sul		5	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lc96	Eldorado do Sul		5	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lc97	Eldorado do Sul		5	lisa	granulosa	
UFRGS Lc98	Eldorado do Sul		5	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lc99	Eldorado do Sul		4	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc102	Eldorado do Sul		5	lisa	granulosa	
UFRGS Lc103	Eldorado do Sul		5	lisa	granulosa	
UFRGS Lc104	Eldorado do Sul		2	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lc105	Eldorado do Sul		2	lisa	granulosa	
UFRGS Lc106	Eldorado do Sul		4	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lc107	Eldorado do Sul		4	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lc108	Eldorado do Sul		2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc109	Eldorado do Sul		2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc110	Eldorado do Sul		2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc111	Eldorado do Sul		2	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lc112	Eldorado do Sul		1	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc113	Eldorado do Sul		3	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc114	Eldorado do Sul		2	lisa	granulosa	
UFRGS Lc115	Eldorado do Sul		1	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc116	Eldorado do Sul		1	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc117	Eldorado do Sul		1	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc118	Eldorado do Sul		1	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc119	Eldorado do Sul		1	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc120	Eldorado do Sul		1	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc121	Eldorado do Sul		1	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc122	Eldorado do Sul		1	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc123	Eldorado do Sul		1,5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc124	Eldorado do Sul		2	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc125	Eldorado do Sul		2	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc126	Eldorado do Sul		2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc127	Eldorado do Sul		2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc128	Eldorado do Sul		2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc129	Eldorado do Sul		2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc130	Eldorado do Sul		2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc131	Eldorado do Sul		3	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc132	Eldorado do Sul		1	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc133	Eldorado do Sul		1	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc134	Eldorado do Sul		2	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc135	Eldorado do Sul		2	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc136	Eldorado do Sul		2	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc137	Eldorado do Sul		2	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc138	Eldorado do Sul		3	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc139	Eldorado do Sul		1	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc140	Eldorado do Sul		<3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc141	Eldorado do Sul		<3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc142	Eldorado do Sul		4			opaca
UFRGS Lc143	Eldorado do Sul		<3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc144	Eldorado do Sul		<3		granulosa	translúcida

APÊNDICE 4. Continuação...

Isolado	Origem	Detecção de nodulação (dias)	Morfologia colonial			
			Tamanho (mm)	Borda	Superfície	Densidade ótica
UFRGS Lc147	Eldorado do Sul		<3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc148	Eldorado do Sul		<3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc149	Eldorado do Sul		<3			
UFRGS Lc150	Eldorado do Sul		<3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc151	Eldorado do Sul		<3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc152	Eldorado do Sul		<3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc153	Eldorado do Sul		<3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc154	Eldorado do Sul		<3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc157	Eldorado do Sul		<3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc158	Eldorado do Sul		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc159	Eldorado do Sul		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc160	Eldorado do Sul		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc161	Eldorado do Sul		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc162	Eldorado do Sul		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc163	Eldorado do Sul		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc164	Eldorado do Sul		<3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc165	Eldorado do Sul		<3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc166	Eldorado do Sul		<3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc167	Eldorado do Sul		<3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc168	Eldorado do Sul		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc169	Eldorado do Sul		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc170	Eldorado do Sul		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc171	Eldorado do Sul		3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc172	Eldorado do Sul		3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc173	Eldorado do Sul		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc174	Eldorado do Sul		4			opaca
UFRGS Lc175	Eldorado do Sul		4			opaca
UFRGS Lc176	Eldorado do Sul		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc177	Eldorado do Sul		4			opaca
UFRGS Lc178	Eldorado do Sul		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc179	Eldorado do Sul		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc180	Eldorado do Sul		<4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc181	Eldorado do Sul		<4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc182	Eldorado do Sul		<4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc183	Eldorado do Sul		1			opaca
UFRGS Lc184	Eldorado do Sul		6			
UFRGS Lc185	Eldorado do Sul		<3			opaca
UFRGS Lc186	Eldorado do Sul		6		granulosa	translúcida
UFRGS Lc187	Eldorado do Sul		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc188	Eldorado do Sul		6		granulosa	translúcida
UFRGS Lc189	Eldorado do Sul		5		granulosa	translúcida
UFRGS Lc190	Eldorado do Sul		2		granulosa	translúcida
UFRGS Lc191	Eldorado do Sul		6			opaca
UFRGS Lc192	Eldorado do Sul		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc193	Eldorado do Sul		3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc194	Eldorado do Sul		3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc195	Eldorado do Sul		5		granulosa	translúcida
UFRGS Lc196	Eldorado do Sul		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc197	Eldorado do Sul		6			

APÊNDICE 4. Continuação...

Isolado	Origem	Detecção de nodulação (dias)	Morfologia colonial			
			Tamanho (mm)	Borda	Superfície	Densidade ótica
UFRGS Lc200	Eldorado do Sul		3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc201	Eldorado do Sul		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc202	Eldorado do Sul		5			
UFRGS Lc203	Eldorado do Sul		2		granulosa	translúcida
UFRGS Lc204	Eldorado do Sul		<3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc205	Eldorado do Sul		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc206	Eldorado do Sul		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc207	Eldorado do Sul		1		granulosa	translúcida
UFRGS Lc208	Eldorado do Sul		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc209	Eldorado do Sul		2		granulosa	translúcida
UFRGS Lc212	Eldorado do Sul		2		granulosa	translúcida
UFRGS Lc213	Eldorado do Sul		5		granulosa	translúcida
UFRGS Lc214	Eldorado do Sul		<2		granulosa	translúcida
UFRGS Lc215	Eldorado do Sul		6			
UFRGS Lc216	Eldorado do Sul		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc217	Eldorado do Sul		2		granulosa	translúcida
UFRGS Lc218	Eldorado do Sul		5			
UFRGS Lc219	Eldorado do Sul		3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc220	Eldorado do Sul		8			
UFRGS Lc221	Eldorado do Sul		3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc222	Eldorado do Sul		3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc223	Eldorado do Sul		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc224	Eldorado do Sul		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc225	Eldorado do Sul		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc226	Eldorado do Sul		5		granulosa	translúcida
UFRGS Lc227	Eldorado do Sul		5		granulosa	translúcida
UFRGS Lc228	Eldorado do Sul		3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc229	Eldorado do Sul		3		granulosa	opaca
UFRGS Lc230	Eldorado do Sul		5			opaca
UFRGS Lc231	Eldorado do Sul		3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc232	Eldorado do Sul		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc233	Eldorado do Sul		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc234	Porto Alegre	10	1			opaca
UFRGS Lc235	Porto Alegre	18	4	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc236	Porto Alegre	18	4			opaca
UFRGS Lc237	Porto Alegre	18				
UFRGS Lc238	Porto Alegre	15	<2			opaca
UFRGS Lc239	Porto Alegre	15	3			translúcida
UFRGS Lc240	Porto Alegre	25	4			opaca
UFRGS Lc241	Porto Alegre	25	4	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc242	Porto Alegre	11	7			opaca
UFRGS Lc243	Porto Alegre	11	6			opaca
UFRGS Lc244	Porto Alegre	11	6			opaca
UFRGS Lc245	Porto Alegre	11	6			opaca
UFRGS Lc246	Porto Alegre	11	<2			translúcida
UFRGS Lc247	Porto Alegre	11	5			opaca
UFRGS Lc248	Porto Alegre	11	>6			opaca
UFRGS Lc249	Porto Alegre	13	4			translúcida
UFRGS Lc250	Porto Alegre	18	5			opaca

APÊNDICE 4.Continuação...

Isolado	Origem	Detecção de nodulação (dias)	Morfologia colonial			
			Tamanho (mm)	Borda	Superfície	Densidade ótica
UFRGS Lc253	Porto Alegre	18	4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc254	Porto Alegre	18	>6		granulosa	translúcida
UFRGS Lc255	Porto Alegre	18	5			opaca
UFRGS Lc256	Porto Alegre	21	7			opaca
UFRGS Lc257	Porto Alegre	21	<2			opaca
UFRGS Lc258	Porto Alegre	27	>7		granulosa	translúcida
UFRGS Lc259	Porto Alegre	44	4			opaca
UFRGS Lc260	Porto Alegre	11	6			translúcida
UFRGS Lc261	Porto Alegre	11	>6			opaca
UFRGS Lc262	Porto Alegre	14	5			opaca
UFRGS Lc263	Porto Alegre	14	1			opaca
UFRGS Lc264	Porto Alegre	14	4			opaca
UFRGS Lc267	Porto Alegre	18	7			opaca
UFRGS Lc268	Porto Alegre	18	4			opaca
UFRGS Lc269	Porto Alegre	18	>7			opaca
UFRGS Lc270	Porto Alegre	18	6			opaca
UFRGS Lc271	Porto Alegre	20	4			translúcida
UFRGS Lc272	Porto Alegre	20	5			opaca
UFRGS Lc273	Porto Alegre	27	>7			opaca
UFRGS Lc274	Porto Alegre	27	<1			opaca
UFRGS Lc275	Porto Alegre		4	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc276	Porto Alegre		4	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc277	Porto Alegre		4	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lc278	Porto Alegre		4	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc279	Porto Alegre		4	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lc280	Porto Alegre		4	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc281	Porto Alegre		5	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lc282	Porto Alegre		5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc283	Porto Alegre		5	lisa	granulosa	
UFRGS Lc284	Porto Alegre		5	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc285	Porto Alegre		5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc286	Porto Alegre		5	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lc287	Porto Alegre		4	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc288	Porto Alegre		4	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lc289	Porto Alegre		4	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc290	Porto Alegre		3	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc291	Porto Alegre		3	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc292	Porto Alegre		5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc293	Porto Alegre		6	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lc294	Porto Alegre		6	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc295	Porto Alegre		10	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc296	Porto Alegre		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc297	Porto Alegre		5	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc298	Porto Alegre		4	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc299	Porto Alegre		5	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lc300	Porto Alegre		4	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc301	Porto Alegre		5	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lc302	Porto Alegre		6	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc303	Porto Alegre		>7			opaca

APÊNDICE 4. Continuação...

Isolado	Origem	Detecção de nodulação (dias)	Morfologia colonial			
			Tamanho (mm)	Borda	Superfície	Densidade ótica
UFRGS Lc306	Porto Alegre		6			opaca
UFRGS Lc307	Porto Alegre		6			opaca
UFRGS Lc308	Porto Alegre		>3			translúcida
UFRGS Lc309	Porto Alegre		>2			translúcida
UFRGS Lc310	Porto Alegre		5			opaca
UFRGS Lc311	Porto Alegre		5			opaca
UFRGS Lc312	Porto Alegre		<1			opaca
UFRGS Lc313	Porto Alegre		1			opaca
UFRGS Lc314	Porto Alegre		4			translúcida
UFRGS Lc315	Porto Alegre		2			opaca
UFRGS Lc316	Porto Alegre		<3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc317	Porto Alegre		2			opaca
UFRGS Lc318	Porto Alegre		2			opaca
UFRGS Lc319	Porto Alegre		2			opaca
UFRGS Lc386	Arroio dos Ratos	11	4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc387	Arroio dos Ratos	11	4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc388	Arroio dos Ratos	11	4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc389	Arroio dos Ratos	11	4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc390	Arroio dos Ratos	14	6			
UFRGS Lc391	Arroio dos Ratos	14	5		granulosa	translúcida
UFRGS Lc392	Arroio dos Ratos	14	5		granulosa	translúcida
UFRGS Lc393	Arroio dos Ratos	14	3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc394	Arroio dos Ratos	14	1			opaca
UFRGS Lc395	Arroio dos Ratos	18	5		granulosa	translúcida
UFRGS Lc396	Arroio dos Ratos	18	4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc397	Arroio dos Ratos	18	4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc398	Arroio dos Ratos	18	5		granulosa	translúcida
UFRGS Lc399	Arroio dos Ratos	18	6		granulosa	translúcida
UFRGS Lc400	Arroio dos Ratos	18	3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc401	Arroio dos Ratos	18	7		granulosa	translúcida
UFRGS Lc402	Arroio dos Ratos	20	<1			opaca
UFRGS Lc403	Arroio dos Ratos	20	6		granulosa	translúcida
UFRGS Lc404	Arroio dos Ratos	29	<2			opaca
UFRGS Lc405	Arroio dos Ratos	32	1			opaca
UFRGS Lc406	Arroio dos Ratos	32	4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc407	Arroio dos Ratos	36	<2			opaca
UFRGS Lc408	Arroio dos Ratos	36	<2			opaca
UFRGS Lc409	Arroio dos Ratos	39	1			opaca
UFRGS Lc410	Arroio dos Ratos	41	1			opaca
UFRGS Lc411	Arroio dos Ratos	41	1			opaca
UFRGS Lc412	Arroio dos Ratos	65				
UFRGS Lc413	Arroio dos Ratos		4	lisa	granulosa	
UFRGS Lc414	Arroio dos Ratos		5	lisa	granulosa	
UFRGS Lc415	Arroio dos Ratos		6	lisa	granulosa	
UFRGS Lc416	Arroio dos Ratos		6	lisa	granulosa	
UFRGS Lc417	Arroio dos Ratos		6	lisa	granulosa	
UFRGS Lc418	Arroio dos Ratos		6	lisa	granulosa	
UFRGS Lc419	Arroio dos Ratos		6	lisa	granulosa	
UFRGS Lc420	Arroio dos Ratos		6	lisa	granulosa	

APÊNDICE 4. Continuação...

Isolado	Origem	Detecção de nodulação (dias)	Morfologia colonial			
			Tamanho (mm)	Borda	Superfície	Densidade ótica
UFRGS Lc423	Arroio dos Ratos		5	lisa	granulosa	
UFRGS Lc424	Arroio dos Ratos		5	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc425	Arroio dos Ratos		6	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc426	Arroio dos Ratos		7	lisa	granulosa	
UFRGS Lc427	Arroio dos Ratos		5	lisa	granulosa	
UFRGS Lc428	Arroio dos Ratos		3	lisa	lisa	opaca
UFRGS Lc429	Arroio dos Ratos		2	lisa	granulosa	
UFRGS Lc430	Arroio dos Ratos		<2			opaca
UFRGS Lc431	Arroio dos Ratos		7		granulosa	translúcida
UFRGS Lc432	Arroio dos Ratos		5		granulosa	translúcida
UFRGS Lc433	Arroio dos Ratos		6		granulosa	translúcida
UFRGS Lc434	Arroio dos Ratos		<2			opaca
UFRGS Lc435	Arroio dos Ratos		6			
UFRGS Lc436	Arroio dos Ratos		>6		granulosa	translúcida
UFRGS Lc437	Arroio dos Ratos		5		granulosa	translúcida
UFRGS Lc438	Arroio dos Ratos		5		granulosa	translúcida
UFRGS Lc441	Arroio dos Ratos		7		granulosa	translúcida
UFRGS Lc442	Arroio dos Ratos		5		granulosa	translúcida
UFRGS Lc443	Arroio dos Ratos		<2			opaca
UFRGS Lc444	Arroio dos Ratos		<2			opaca
UFRGS Lc445	Arroio dos Ratos		1			opaca
UFRGS Lc446	Arroio dos Ratos		<1			opaca
UFRGS Lc447	Arroio dos Ratos		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc448	Arroio dos Ratos		1			opaca
UFRGS Lc449	Arroio dos Ratos		6			opaca
UFRGS Lc450	Arroio dos Ratos		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc451	Arroio dos Ratos		7			
UFRGS Lc452	Arroio dos Ratos		2			opaca
UFRGS Lc453	Rio Pardo		4	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lc454	Rio Pardo		4	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lc455	Rio Pardo		4	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lc456	Rio Pardo			lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc457	Rio Pardo		4	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lc458	Rio Pardo		4	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lc459	Rio Pardo		4	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lc460	Rio Pardo		5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc461	Rio Pardo		3	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc462	Rio Pardo		6	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc463	Rio Pardo		6	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc464	Rio Pardo		4	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lc465	Rio Pardo		6	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc466	Rio Pardo		6	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc467	Rio Pardo		5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc468	Rio Pardo		3	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lc469	Rio Pardo		5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc470	Rio Pardo		3	lisa	granulosa	translúcida
UFRGS Lc471	Rio Pardo		5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc472	Rio Pardo		5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc473	Rio Pardo		1			opaca

APÊNDICE 4. Continuação...

Isolado	Origem	Detecção de nodulação (dias)	Morfologia colonial			
			Tamanho (mm)	Borda	Superfície	Densidade ótica
UFRGS Lc476	Rio Pardo		2			translúcida
UFRGS Lc477	Rio Pardo		2			translúcida
UFRGS Lc478	Rio Pardo		3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc479	Rio Pardo		4			translúcida
UFRGS Lc480	Rio Pardo		3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc481	Rio Pardo		3			translúcida
UFRGS Lc482	Rio Pardo		3			translúcida
UFRGS Lc483	Rio Pardo		4			translúcida
UFRGS Lc484	Rio Pardo		3			opaca
UFRGS Lc485	Rio Pardo		3		granulosa	opaca
UFRGS Lc486	Rio Pardo		2			opaca
UFRGS Lc487	Rio Pardo		2	irregular	granulosa	translúcida
UFRGS Lc488	Rio Pardo		2		granulosa	translúcida
UFRGS Lc489	Rio Pardo		3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc490	Rio Pardo		3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc491	Rio Pardo		3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc492	Rio Pardo		3			translúcida
UFRGS Lc493	Rio Pardo		3			translúcida
UFRGS Lc496	Rio Pardo		2		granulosa	translúcida
UFRGS Lc497	Rio Pardo		3		granulosa	opaca
UFRGS Lc498	Rio Pardo		2		granulosa	opaca
UFRGS Lc499	Rio Pardo		2		granulosa	opaca
UFRGS Lc500	Rio Pardo		1		granulosa	opaca
UFRGS Lc501	Rio Pardo		>7	irregular	granulosa	translúcida
UFRGS Lc502	Rio Pardo		>7	irregular	granulosa	translúcida
UFRGS Lc503	Passo Fundo		2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc504	Passo Fundo		5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc505	Passo Fundo		5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc506	Passo Fundo		5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc507	Passo Fundo		5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc508	Passo Fundo		5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc509	Passo Fundo		4			translúcida
UFRGS Lc510	Passo Fundo		4			translúcida
UFRGS Lc511	Passo Fundo		5			translúcida
UFRGS Lc512	Passo Fundo		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc513	Passo Fundo		3		granulosa	translúcida
UFRGS Lc514	Passo Fundo		4		granulosa	translúcida
UFRGS Lc515	Passo Fundo		5		granulosa	opaca
UFRGS Lc516	Bagé		2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc517	Bagé		2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc518	Bagé		2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc519	Bagé		5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc520	Bagé		3	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc521	Bagé		3	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lc522	Bagé		3			translúcida
UFRGS Lc523	Bagé		3			opaca
UFRGS Lc524	Bagé		3		granulosa	opaca
UFRGS Lc525	Bagé		4		granulosa	

APÊNDICE 5. Características de isolados de rizóbios obtidos em *Lotus uliginosus* Schkuhr.

Isolado	Origem	Detecção de nodulação (dias)	Morfologia colonial			
			Tamanho (mm)	Borda	Superfície	Densidade ótica
UFRGS Lu2	Rio Pardo	15	4	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu3	Rio Pardo		4	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu4	Mostardas	15	1	lisa	lisa	
UFRGS Lu5	Mostardas	22	1	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu6	Mostardas	15	1	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu7	Mostardas	15	1	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu8	Mostardas	13	1	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu9	Mostardas	9	1	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu10	Mostardas	15	1	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu11	Mostardas	15	1	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu12	Mostardas	13	1	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu13	Mostardas	13	1	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu14	Mostardas		1	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu15	Mostardas	9	1	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu16	Mostardas	13	1	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu17	Mostardas	15	1	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu18	Mostardas	13	1	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu19	Mostardas	13	1	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu20	Mostardas	9	1	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu21	Mostardas	13	1	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu22	Mostardas	22	1	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu23	Mostardas		1	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu24	Mostardas	13	1	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu25	Mostardas	15	1	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu26	Mostardas	13	1	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu27	Mostardas	15	<1			opaca
UFRGS Lu28	Mostardas	15	<1			opaca
UFRGS Lu29	Mostardas		<1			opaca
UFRGS Lu30	Mostardas	22	<1			opaca
UFRGS Lu31	Mostardas	9	2			translúcida
UFRGS Lu32	Eldorado do Sul	13	2,5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu33	Eldorado do Sul	9	2,5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu34	Eldorado do Sul	15	2,5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu35	Eldorado do Sul	13	2,5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu36	Eldorado do Sul		2,5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu37	Eldorado do Sul		1,5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu38	Eldorado do Sul	9	1,5	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu39	Eldorado do Sul	22	3	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu40	Eldorado do Sul	15	3	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu41	Eldorado do Sul		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu42	Eldorado do Sul		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu43	Eldorado do Sul		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu44	Eldorado do Sul		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu45	Eldorado do Sul		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu46	Eldorado do Sul		8	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu47	Eldorado do Sul	13	2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu48	Eldorado do Sul	22	2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu49	Eldorado do Sul		10			translúcida
UFRGS Lu50	Eldorado do Sul		10			translúcida

APÊNDICE 5. Continuação...

Isolado	Origem	Detecção de nodulação (dias)	Morfologia colonial			
			Tamanho (mm)	Borda	Superfície	Densidade ótica
UFRGS Lu53	Hulha Negra		2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu54	Hulha Negra		2	lisa	lisa	translúcida
UFRGS Lu57	Hulha Negra		2			opaca
UFRGS Lu58	Hulha Negra		3		granulosa	translúcida
UFRGS Lu59	Hulha Negra		4			translúcida
UFRGS Lu60	Hulha Negra		<2		granulosa	translúcida
UFRGS Lu61	Hulha Negra		3		granulosa	opaca
UFRGS Lu62	Hulha Negra		3			translúcida
UFRGS Lu63	Hulha Negra		1	irregular		translúcida
UFRGS Lu64	Hulha Negra		2		granulosa	opaca
UFRGS Lu65	Hulha Negra		3		granulosa	opaca

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)