

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIA DO SOLO**

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIA FIXADORA DE
NITROGÊNIO EM *LUPINUS ALBESCENS***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Marcos Roberto Dobler Stroschein

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIA FIXADORA DE
NITROGÊNIO EM *Lupinus albescens***

por

Marcos Roberto Dobler Stroschein

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Área de Concentração em Biodinâmica e Manejo do Solo, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciência do Solo

Orientador: Prof. PhD Flávio Luiz Foletto Eltz

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIA FIXADORA DE
NITROGÊNIO EM *Lupinus albescens***

elaborada por
Marcos Roberto Dobler Stroschein

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciência do Solo

COMISSÃO EXAMINADORA:

Flávio Luiz Foletto Eitz, PhD
(Presidente/Orientador)

Zaida Inês Antonioli, Dr. (UFSM)

Luciano Kayser Vargas, Dr. (Fepagro)

Santa Maria, 22 de fevereiro de 2007.

À minha família

EU DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, pelo conhecimento e formação.

Aos professores Flávio Luiz Foletto Eltz e Zaida Inês Antonioli, pela atenção dispensada e pelo conhecimento compartilhado durante a realização deste trabalho.

Aos bolsistas Manoeli Lupatini, Matheus Pontelli e Marta R. da Rocha, pelo auxílio responsável nos trabalhos de laboratório,

Aos colegas de laboratório de Biologia e Microbiologia do Solo e do Ambiente, pela convivência e amizade.

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

Aos funcionários Antônio Bassaco, Flávio Vieira da Silva, Gladis Uberti e Tarcísio Uberti, pelo auxílio sempre prestado.

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

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

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

“Se tiveres de empreender uma luta, cuida-te para que, vencendo a ti mesmo, não haja vencidos em tua caminhada. Luta sem fazer inimigos e persevera na lição que a vida te concede, pois lutar não significa guerrear.”

Alex Zarthú, psicografado por Robson Pinheiro

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIA FIXADORA DE NITROGÊNIO EM *Lupinus albescens*

AUTOR: Marcos Roberto Dobler Stroschein

ORIENTADOR: Flávio Luiz Foletto Eltz

Data e Local de Defesa: Santa Maria, 22 de fevereiro de 2007.

O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar populações promissoras de rizóbio de *L. albescens* na fixação biológica de nitrogênio. Duzentos e quatro isolados foram obtidos a partir de três espécies de trevoço (*L. albescens*, *L. lanatus* e *Lupinus* sp.). Trinta e oito isolados escolhidos após a purificação foram caracterizados fenotipicamente e submetidos a um teste de autenticação, realizado em casa de vegetação. Estes testes objetivaram selecionar estirpes simbiotes formadoras de leghemoglobina. Os isolados promissores foram identificados com base nas características fenotípicas através da comparação com vinte e duas estirpes de rizóbio. Determinou-se as características fisiológicas dos isolados promissores, sendo avaliado a capacidade de crescer em: diferentes temperaturas, concentrações de NaCl e pH, e a uma caracterização molecular com base em reação de polimerase em cadeia (PCR) utilizando o oligonucleotídeo BOX A1-R. Foi realizada a determinação da eficiência simbiótica com base no teor de nitrogênio total da parte aérea, a massa seca da parte aérea e das raízes, e número de nódulos. A caracterização fenotípica dos trinta e oito isolados possibilitou a formação de 11 grupos com características distintas. O isolado UFSM L1.3 formou nódulos e leghemoglobina quando associado a *L. albescens*, tendo sido identificado no gênero *Bradyrhizobium*. A estirpe UFSM L1.3 apresentou crescimento em temperatura de 28 e 32°C, na concentração de NaCl de 0,1% e na faixa de pH 4,0 a 8,0. O padrão de polimorfismo gerado pelo primer BOX-PCR permitiu diferenciar o isolado UFSM L1.3 dos demais estudados. A eficiência simbiótica do isolado de rizóbio UFSM L1.3 foi de 94,2% em comparação com a testemunha nitrogenada.

Palavras-chave: trevoço, rizóbio, *Bradyrhizobium*

ABSTRACT

Master Dissertation in Soil Science
Graduate Programme in Soil Science
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

CHARACTERIZATION OF BACTERIUM THAT FIXES NITROGEN IN *Lupinus albescens*

Author: Marcos Roberto Dobler Stroschein

Advisor: Flávio Luiz Foletto Eltz

Date and Place of Defense: Santa Maria, February 22th, 2007.

The objective of this work was to characterize promising isolated rhizobium of *L. albescens* in the nitrogen biological fixation. Two hundred and four isolates were obtained from three species of lupine (*L. albescens*, *L. lanatos e Lupinus* sp.). Thirty-eight isolates chosen randomly were characterized through their phenotype and submitted to an authenticity test done in the greenhouse. In order to select symbiotic strains that synthesizes leghaemoglobin. The promising isolates were identified by their phenotypic characteristics by comparing twenty-one strains of rhizobium. The physiological characteristics of the promising isolated were determined and evaluated about the growing capacity in different temperatures, NaCl concentrations and pH, and a molecular characterization by polymerase chain reaction (PCR) using the *primer* BOX. An experiment, in the greenhouse, was made to determine the symbiosis efficiency by the total nitrogen, and the dried mass in the aerial part and in the roots, and the number of nodules. The phenotypic characterization of the thirty-eight isolated enabled the development of 11 groups with distinct characteristics. The UFSM L1.3 strain developed nodules and leghaemoglobin when associated to *L. Albescens* and was identified in the genus *Bradyrhizobium*. The UFSM L1.3 strain presented growing in the temperature from 28 to 32°C, in a NaCl concentration of 0,1% and in a pH from 4,0 to 8,0. The standard of polymorphism generated by the primer BOX-PCR enabled to distinguish the UFSM L1.3 isolated from the others. The symbiosis efficiency of the UFSM L1.3 isolated was of 94,2% when compared to the without nitrogen.

Key-words: lupine, rhizobium, *Bradyrhizobium*.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Ocorrência de areais no sudoeste do Rio Grande do Sul (SUERTEGARAY et al., 2001). | 19 |
| Figura 2 – Espécie de <i>Lupinus albescens</i> em área de arenização. Santa Maria, 2007. | 20 |
| Figura 3 – Etapas da execução do trabalho com rizóbio em <i>Lupinus</i> . Santa Maria, 2007. | 35 |
| Figura 4 – Isolamento de bactérias a partir de nódulos de <i>Lupinus albescens</i> : a) amostragem de material do interior do nódulo; b) inoculação em meio LMA..... | 37 |
| Figura 5 – Meio de cultura LMA com vermelho congo (a) e azul de bromotimol (b), utilizados na caracterização cultural dos isolados. Santa Maria, 2007. | 40 |
| Figura 6 – Padrões utilizados na caracterização fisiológica dos rizóbio. a) UFSM L1.3; b) SEMIA 938; c) Sem inoculação. Santa Maria, 2007. | 44 |
| Figura 7 – Dendograma de similaridade baseado nas características culturais de 38 isolados de <i>Lupinus</i> (UFSM L1.1, UFSM L1.2, UFSM L1.3, UFSM L1.4, UFSM L1.5, UFSM L1.6, UFSM L1.7, UFSM L1.8, UFSM L 1.9, UFSM L1.10, UFSM L1.11, UFSM L1.12, UFSM L1.13, UFSM L1.14, UFSM L2.1, UFSM L2.2, UFSM L2.3, UFSM L2.4, UFSM L2.5, UFSM L2.6, UFSM L2.7, UFSM L2.8, UFSM L2.9, UFSM L2.10, UFSM L2.11, UFSM L2.12, UFSM L3.1, UFSM L3.2, UFSM L3.3, UFSM L3.4, UFSM L3.5, UFSM L3.6, UFSM L3.8, UFSM L4.1, UFSM L4.2, UFSM L4.3, UFSM L4.4) e estirpe recomendada para <i>Lupinus</i> (SEMIA 938). Santa Maria, 2007. | 51 |
| Figura 8 – Nódulo em <i>Lupinus albescens</i> (isolado UFSM L1.3) aos 60 dias. a) Nodulação positiva; b) Produção de leghemoglobina. | 55 |

| | |
|--|----|
| Figura 9 – Dendograma de similaridade baseado em características culturais entre um isolado de <i>Lupinus albescens</i> (UFSM L1.3), uma estirpe recomendada para Lupinus (SEMIA 938) e 21 estirpes-tipo de rizóbio (Tabela 6)..... | 57 |
| Figura 10 – Padrão de polimorfismo gerado por BOX-PCR. 1. <i>Bradyrhizobium</i> sp. (SEMIA 938). 2. <i>Bradyrhizobium</i> sp. (SEMIA 928). 3. UFSM L1. 3. 4. 1p. 5. 2p. 6. <i>Rhizobium</i> sp. 7. Sem DNA. M. Marcador: DNA de Lambda clivado com EcoRI + HindIII. | 62 |
| Figura 11 – Dendograma genético de três isolados de <i>Lupinus albescens</i> comparados a duas estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> sp recomendadas para tremoço e uma estirpe de <i>Rhizobium</i> sp., após análise de agrupamento dos fragmentos obtidos pela amplificação do DNA por PCR com o oligonucleotídeo específico BOX-A1R. Análise realizada com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Pearson. Santa Maria, 2007..... | 63 |
| Figura 12 – Eficiência simbiótica relativa de isolado de rizóbio de <i>Lupinus albescens</i> (UFSM L1.3) e de estirpe comercial recomendada para Lupinus (SEMIA 938). Santa Maria, 2007..... | 65 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Diferentes famílias e gêneros de rizóbio fixadores de nitrogênio descritos..... | 26 |
| Tabela 2 – Locais de coleta de três espécies de tremoço nos municípios de Alegrete, Maçambará e São Francisco de Assis. Santa Maria, 2007..... | 36 |
| Tabela 3 – Valores relativos às características culturais dos isolados utilizados na construção do dendograma. Santa Maria, 2007..... | 42 |
| Tabela 4 – Espécies e estirpes tipo de rizóbio utilizadas na comparação dos isolados de <i>Lupinus</i> | 46 |
| Tabela 5 – Relação do número de isolados nos quatro locais e nas três espécies de <i>Lupinus</i> estudadas. Santa Maria, 2007..... | 50 |
| Tabela 6 – Características culturais fenotípicas dos isolados bacterianos pertencentes aos grupos formados a partir de cinco características básicas. Santa Maria, 2007..... | 53 |
| Tabela 7 – Características culturais de um isolado de <i>Lupinus albescens</i> e de 22 estirpes de rizóbio, Santa Maria, 2007..... | 58 |
| Tabela 8 – Crescimento de duas estirpes de rizóbio em diferentes pH, concentrações de NaCl e temperatura em meio líquido LMA. Santa Maria, 2007..... | 60 |
| Tabela 9 – Massa seca da parte aérea (MSPA), nitrogênio na parte aérea (NPA), eficiência simbiótica (Efra), massa seca das raízes (MSR) e número de nódulos (NN) do isolado UFSM L1.3 e da estirpe SEMIA 938. Santa Maria, 2007..... | 65 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|---------------------|----------------------------|
| g | grama (s) |
| °C | grau (s) Celsius |
| h | hora (s) |
| kg | quilograma (s) |
| Kg ha ⁻¹ | quilograma (s) por hectare |
| L | litro (s) |
| M | Molar |
| m | metro (s) |
| mg | miligrama (s) |
| mL | mililitro (s) |
| mg L ⁻¹ | miligrama (s) por litro |
| mm | milímetro (s) |
| min | minuto (s) |
| µL | microlitro |
| % | percentagem |
| seg | segundo (s) |
| rcf | força centrífuga relativa |
| V | volts |

LISTA DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| ANEXO A – Meios de cultura e soluções utilizados para o estudo da população bacteriana oriunda de <i>Lupinus albescens</i> | 82 |
|--|----|

SUMÁRIO

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 18 |
| 2.1 | Áreas arenizadas | 18 |
| 2.2 | Gênero Lupinus: ocorrência e simbiose com rizóbio | 20 |
| 2.3 | Fixação biológica de nitrogênio (FBN) | 23 |
| 2.4 | Grupo rizóbio | 24 |
| 2.5 | Taxonomia de rizóbio | 27 |
| 2.5.1 | Caracterização fenotípica de rizóbio | 28 |
| 2.5.1.1 | Métodos fenotípicos tradicionais | 28 |
| 2.5.1.2 | Métodos quimiotaxonômicos | 30 |
| 2.5.2 | Caracterização genética de rizóbio | 31 |
| 2.5.2.1 | Hibridização do DNA | 32 |
| 2.5.2.2 | Polimorfismo dos tamanhos dos fragmentos de restrição (RFLP) | 32 |
| 2.5.2.3 | Análises baseadas na reação em cadeia de polimerase..... | 33 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS | 35 |
| 3.1 | Coleta das raízes das plantas de Lupinus | 36 |
| 3.2 | Isolamento de rizóbio | 37 |
| 3.3 | Autenticação dos isolados | 38 |
| 3.4 | Caracterização fenotípica | 39 |
| 3.4.1 | Características culturais | 39 |
| 3.4.1.1 | Coloração de Gram | 39 |
| 3.4.1.2 | Tempo de crescimento para a visualização das colônias..... | 39 |
| 3.4.1.3 | Diâmetro das colônias | 40 |
| 3.4.1.4 | Produção de goma | 41 |
| 3.4.1.5 | Coloração das colônias | 41 |

| | |
|--|-----------|
| 3.4.1.6 Alteração do pH do meio..... | 41 |
| 3.4.1.7 Agrupamento dos isolados..... | 42 |
| 3.4.2 Caracterização fisiológica..... | 43 |
| 3.4.2.1 Crescimento em diferentes temperaturas..... | 43 |
| 3.4.2.2 Crescimento em diferentes pH..... | 44 |
| 3.4.2.3 Crescimento em diferentes concentrações de NaCl..... | 45 |
| 3.5 Identificação dos isolados..... | 45 |
| 3.6 Caracterização molecular..... | 46 |
| 3.7 Teste de eficiência na Fixação Biológica de Nitrogênio..... | 48 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 50 |
| 4.1 Isolamento e caracterização..... | 50 |
| 4.2 Autenticação dos isolados bacterianos nativos..... | 54 |
| 4.3 Caracterização do gênero de uma estirpe de rizóbio isolada de <i>Lupinus</i> albescens..... | 55 |
| 4.4 Caracterização fisiológica..... | 59 |
| 4.5 Caracterização molecular..... | 61 |
| 4.6 Avaliação da eficiência simbiótica relativa..... | 63 |
| 5 CONCLUSÕES..... | 66 |
| 6 SUGESTÕES PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVAS PESQUISAS..... | 67 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 68 |

1 INTRODUÇÃO

A região sudoeste do Rio Grande do Sul apresenta 0,26 % de sua área sujeitos ao processo de arenização (SUERTEGARAY *et al.*, 2001). Nesta região, a formação de pradarias mistas sobre o substrato arenítico constitui um dos ambientes mais frágeis da América do Sul (AB'SABER, 1995). O processo de degradação desses solos pode estar associado à sua formação geológica e ao uso intensivo destas áreas com cultivo agrícola e pecuária (SUERTEGARAY, 1998).

Em função do aumento da degradação do solo no sudoeste do Rio Grande do Sul proporcionado pela intensificação da agricultura, a partir da década de 70, vários sistemas conservacionistas foram propostos, no entanto não atingiam os principais fatores do processo de arenização: a chuva e o vento. Desta maneira o uso de plantas de coberturas apresenta-se como uma alternativa para a recuperação de áreas degradadas, por diminuir os efeitos do impacto da gota da chuva e da erosão eólica.

A recuperação das áreas em processo de arenização vem sendo estudada, e uma das alternativas pode ser a utilização de alguma leguminosa nativa como planta de cobertura. *Lupinus albus* está sendo pesquisada devido à sua alta rusticidade, adaptabilidade a solos arenosos, capacidade de redução do processo de erosão eólica, potencial produtivo de matéria seca, cobertura do solo e fixação biológica de nitrogênio. No entanto poucos estudos vêm dando atenção a identificação e seleção de estirpes de rizóbio em associação com *L. albus*.

O estudo de plantas nativas de *Lupinus albus* pode proporcionar o isolamento de novas estirpes de rizóbio que apresentam características importantes de adaptação ecológica e maior eficiência na fixação biológica de nitrogênio. Isto é essencial para a compreensão da diversidade de espécies e aproveitamento deste recurso biológico. O conhecimento das características fenotípicas e genéticas vem sendo utilizados na distinção de estirpes de rizóbio e no processo de identificação dos isolados de espécies nativas de leguminosas.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar isolados promissores de rizóbio de *L. albus* na fixação biológica de nitrogênio. Os objetivos específicos do estudo

foram: a) caracterizar por métodos fenotípicos estirpes bacterianas isoladas a partir de nódulos de *L. albescens*; b) avaliar a capacidade de formação de nódulos e produção de leghemoglobina; c) identificar o gênero dos rizóbios promissores por métodos fenotípicos; d) analisar as características genéticas, fisiológicas e eficiência simbiótica dos rizóbios promissores na fixação biológica de nitrogênio.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Áreas arenizadas

No estado do Rio Grande do Sul as áreas arenizadas ocorrem entre as latitudes 29°00' S e 31°00' S e longitudes 54°30' W Gr e 58°45' W Gr, sendo caracterizadas por apresentar regiões arenosas desprovidas de vegetação (SUERTEGARAY, 1998). Estes areais podem ser encontrados nos municípios de Alegrete, Cacequi, Itaqui, Maçambará, Manuel Viana, Quaraí, Rosário do Sul, São Borja, São Francisco de Assis e Unistalda, ocupando 0,26% da região sudoeste do estado (Figura 1) (SUERTEGARAY, 1998; SUERTEGARAY, 2001).

O termo arenização foi proposto por Suertegaray (1987), para diferenciar o fenômeno de degradação e perda da produtividade que ocorre no sudoeste gaúcho, definindo-o como o processo de retrabalhamento de depósitos areníticos não consolidados, conferindo mobilidade aos sedimentos não protegidos pela vegetação, e distinguindo-o do fenômeno de desertificação. Embora o termo desertificação seja ainda utilizado de forma abrangente, há uma tendência mundial de restringir este conceito aos processos de degradação do solo relacionados às condições climáticas de regiões áridas e semi-áridas.

A ocorrência destes areais tem como base a Formação Botucatu (datada do período Mesozóico) sob o qual se assentaram depósitos arenosos hídricos e eólicos durante o período Pleistoceno e Holoceno (SUERTEGARAY, 1998), originando solos extremamente arenosos e de baixa agregação e alta friabilidade. Aliam-se a isso chuvas que podem chegar a 1.400 mm por ano ¹, que fornecem energia necessária para formação de sulcos que resultam em ravinas e, ao longo do tempo, essas ravinas se expandirão pela ação do escoamento superficial concentrado, formando voçorocas. Os sedimentos transportados durante as chuvas torrenciais são depositados à jusante das ravinas e voçorocas, dando origem à formação de

¹ O clima desta região é classificado por Köppen como Cfa, subtropical úmido, sem estação seca, com uma precipitação média anual de 1400 mm (SOUTO, 1984).

depósitos arenosos e que, com o tempo e a ação da erosão eólica, irão formar os areais (SUERTEGARAY, 1998).

Segundo Ab'Saber (1995) a ação dos ventos é mais intensa nesta região porque se alternam ventos gerais sul-norte, muito fortes no inverno, com ações de turbilhonamento, ocorrendo associação entre erosão hídrica e eólica. Desta maneira, o material movimentado altera a vegetação ao redor do núcleo de degradação através do efeito abrasivo e do soterramento, quando da deposição das partículas. Como o ecossistema nativo desta região apresenta-se extremamente frágil, devido à própria natureza dos solos sobre os quais se desenvolveu, reduzindo a capacidade de resiliência destes solos, com a continuidade do processo de transporte, deposição, morte e soterramento da vegetação, há a intensificação do processo de degradação do solo, com a expansão da área alterada (ROVEDDER *et al.*, 2003).

Desta maneira a arenização é considerado um processo natural, no entanto, a degradação destas áreas é acelerada pela atividade antrópica. Ou seja, podem ser resultado do pisoteio do gado, revolvimento do solo e do uso de maquinaria pesada na atividade agrícola, originando sulcos e desencadeando condições de escoamento concentrado.

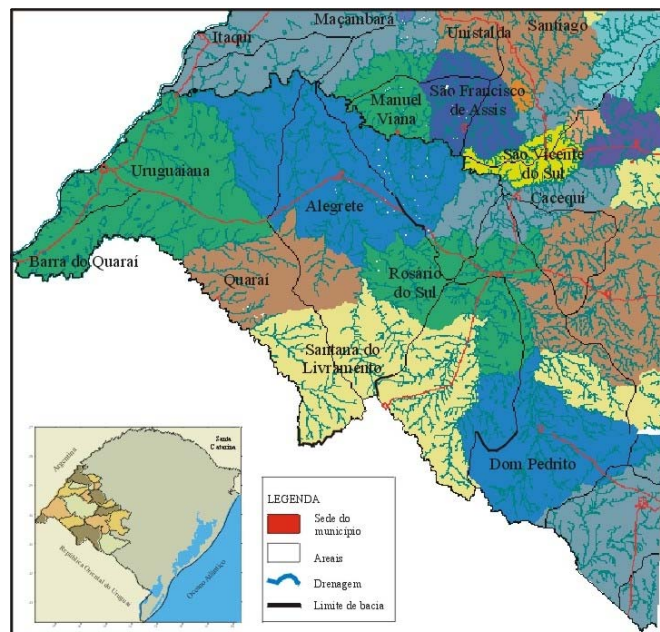


Figura 1 – Ocorrência de areais no sudoeste do Rio Grande do Sul (SUERTEGARAY *et al.*, 2001).

2.2 Gênero *Lupinus*: ocorrência e simbiose com rizóbio

O gênero *Lupinus* pertence à subfamília Papilionoideae da família Leguminosae, apresentando entre 300 a 500 espécies e estando estas espécies distribuídas no Continente Americano e algumas regiões da África e Mediterrâneo (CONTERATO, 2004). Nos trabalhos publicados por Santos (2000) e Pinheiro & Miotto (2001), estes autores relatam a existência de 13 espécies de *Lupinus*, ocupando diferentes regiões fisiográficas do Rio Grande do Sul. O uso de algumas espécies de *Lupinus* como adubação verde vem sendo preconizada em várias regiões do mundo, principalmente na melhoria dos solos devido à sua habilidade de crescer em solos pobres e sob condições adversas (WOLKO & WEEDEN, 1990).

A espécie *Lupinus albescens* H. et Arn. (Figura 2) foi descrita ocorrendo no noroeste da Argentina, Uruguai, Paraguai e Brasil (PLANCHUELO & DUNN, 1984). No sudoeste do Rio Grande do Sul esta espécie ocorre naturalmente, tendo evoluído paralelamente aos processos pedogenéticos e climáticos que formaram a paisagem atual da Campanha Gaúcha (ROVEDDER *et al.*, 2005).



Figura 2 – Espécie de *Lupinus albescens* em área de arenização. Santa Maria, 2007.

O *L. albescens* é uma planta herbácea, de crescimento ereto, com hábito anual. As folhas apresentam forma digitada, inflorescências racemosas com flores arroxeadas ou lilases terminais e frutos na forma de vagens, com até seis ou sete sementes. A semente desta espécie pode levar de 10 a 20 dias para germinar, contudo, a germinação é abundante, formando banco de plântulas com alta densidade. Em teste de germinação realizado no Laboratório de Sementes da UFSM, com um tratamento prévio de escarificação em cilindro rotativo, a espécie apresentou 100 % de germinação (ROVEDDER *et al.*, 2004).

A espécie apresenta folíolos e ramos muito pilosos, além de apresentar substâncias resiníferas, o que pode ser um mecanismo de adaptação às condições edafoclimáticas da região, comprovando a sua evolução paralela a um paleoambiente xeromórfico. Estas características, além de atribuírem alta rusticidade à espécie, possuem efeitos benéficos quando do uso da espécie em estratégias de recuperação e a tornam inadequada ao consumo animal. Esta elevada pilosidade atua diminuindo a transpiração, fator importante em solos de baixa retenção hídrica (ROVEDDER *et al.*, 2004).

Outra característica adaptativa desta espécie, relacionada às condições hídricas do solo, é a formação de um vigoroso sistema radicular pivotante, com presença de raízes em até 1,50 m de profundidade, proporcionando uma capacidade de buscar água e nutrientes a elevadas profundidades. Além disto, a espécie apresenta associação simbiótica com bactérias fixadoras de nitrogênio, com nódulos ativos no colo da raiz e próximo à coifa (ROVEDDER *et al.*, 2004).

A capacidade de redução do processo de transporte e deposição de areia foi estudado em *L. albescens* em consórcio com aveia preta, evidenciando uma redução de 93 % de areia movimentada pela erosão eólica em núcleo de arenização quando comparada com uma área não revegetada (ROVEDDER *et al.*, 2003).

Hickmann *et al.* (2005) compararam o *L. albescens* com *Secale cereale* L. (centeio) na eficiência como planta de cobertura do solo, constatando uma maior produção de massa seca e de ciclagem de nutrientes para o tremoço. Isto pode ser pelo fato desta espécie ser nativa da região sudoeste e, portanto, tenha desenvolvido mecanismos genéticos de adaptação, como capacidade de absorção de nutrientes em baixas concentrações e resistência a déficit hídrico.

Segundo Rovedder *et al.* (2005), esta espécie de tremoço apresentou um acúmulo de massa seca de 6,42 Mg ha⁻¹ e de nitrogênio na parte aérea de até 158,3

Kg ha⁻¹ quando cultivado em área degradada. Estes resultados são superiores aos 3,2 Mg ha⁻¹ de massa seca e 81,38 Kg ha⁻¹ de nitrogênio encontrados para tremoço branco (*Lupinus albus*) (GOLVEIA & ALMEIDA, 1997), 3,0 Mg ha⁻¹ de massa seca e 88 Kg ha⁻¹ de nitrogênio para nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L.) (WIETHÖLTER, 2003) e aos 5,3 Mg ha⁻¹ de massa seca e 65,4 Kg ha⁻¹ de nitrogênio para aveia preta (*Avena strigosa* Schieb.) (ROSSATO, 2004). Estes dados indicam que *Lupinus albescens* apresenta-se como uma espécie promissora ao uso como adubo verde, tendo elevado potencial para cobertura.

Rovedder *et al.* (2005) também relacionou os acúmulos de nitrogênio encontrados na parte aérea das plantas de *L. albescens* à eficiência dos microsimbiontes fixadores de nitrogênio. No entanto ainda não se conhece o gênero de rizóbio associado a esta espécie de tremoço.

Uma das primeiras descrições feitas de uma bactéria isolada a partir de nódulos de uma espécie de *Lupinus* foi realizada por Eckhardt *et al.* (1930). Estes autores relatam a presença de bactérias de crescimento lento que não se enquadravam em outros grupos de nodulação cruzada, classificando-os com *Rhizobium lupini*. Após a publicação de Jordan (1982), esta espécie foi alocada dentro de *Bradyrhizobium japonicum* por apresentar características culturais semelhantes. No entanto, estudos mais detalhados mostraram que as bactérias isoladas de *Lupinus* mostravam-se diferentes de *B. japonicum*, sendo então alocadas em um novo taxa, *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*) (WANG *et al.*, 2006).

Para o cultivo de tremoço no Brasil, existem duas estirpes de *Bradyrhizobium* sp. recomendadas, SEMIA 928 e 938, as quais podem ser obtidas na coleção de cultura da Fepagro (Brasil, 2006). Menna *et al.* (2006) avaliaram a filogenia das principais estirpes utilizadas em inoculantes comerciais e demonstraram que SEMIA 938 apresenta alta relação filogenética com *Bradyrhizobium elkanii*. Outra espécie descrita simbiote a *Lupinus albus* foi caracterizada por Trujillo *et al.* (2005). Os isolados apresentavam características culturais que se distinguem de *Bradyrhizobium* sp., e relação filogenética com *Ochrobactrum*, sugerindo uma nova espécie: *Ochrobactrum lupini*. No entanto ainda não se sabe da capacidade de nodulação e fixação biológica de nitrogênio das estirpes de *Bradyrhizobium* sp. recomendadas para tremoços em associação com *L. albescens*.

2.3 Fixação biológica de nitrogênio (FBN)

A fixação biológica de nitrogênio é caracterizada pela utilização do nitrogênio gasoso da atmosfera (N_2) como fonte de nitrogênio para o metabolismo de um grupo seleto de seres vivos, que inclui algumas espécies de microrganismos procarióticos. Estes microrganismos possuem o complexo enzimático chamado nitrogenase, necessário para transformar o N_2 em amônia, subseqüentemente assimilada em aminoácidos e proteínas (NEVES & RUMJANEK, 1998).

A capacidade diazotrófica está restrita a Bacteria e Archaea, incluindo cianobactérias e bactérias Gram positivas e Gram negativas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). A observação de uma árvore filogenética contendo espécies procarióticas mostra que os microrganismos diazotróficos ocorrem em um grande número de *taxa* e sua distribuição não obedece nenhum padrão lógico. Esta característica pode ser explicada por três hipóteses. A primeira é que a capacidade diazotrófica teve origens múltiplas. A segunda é que este caráter diazotrófico estava presente num ancestral comum a todas as espécies, mas foi perdido durante o processo evolutivo que deu origem a diferentes ramos filogenéticos. A terceira é que o potencial diazotrófico teve uma única origem, mas se estendeu à outros ramos filogenéticos por transferência lateral de plasmídeos (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

As bactérias denominadas rizóbio são consideradas o principal grupo de diazotróficos, por sua importância agrônômica e pela fixação de nitrogênio. O segundo grupo economicamente mais importante é composto pelas cianobactérias, que têm sido encontradas como fixadoras de vida-livre e em associações com várias plantas, dentre estas, a planta aquática *Azolla*. O manejo desta espécie vegetal vem sendo estimulado junto ao sistema de arroz irrigado na China e Vietnam. Cianobactérias podem formar ainda associações com vários outros organismos, como fungos e algas (formando líquens) e angiospermas do gênero *Gunnera*. O terceiro grupo de organismos fixadores de N é representado pela associação simbiótica entre actinomicetos (*Frankia*, *Nostoc*) e plantas de várias famílias, principalmente plantas arbóreas pertencentes aos gêneros *Alnus* e *Casuarina* (SPRENT & SPRENT, 1990).

Outro grupo de diazotróficos apresenta uma associação menos profunda com plantas, não caracterizando uma interação simbiótica. Este grupo inclui bactérias que colonizam o interior de plantas superiores. O quinto grupo de bactérias que contribui para o balanço de N nos ecossistemas é constituído por bactérias de vida-livre. Organismos como *Klebsiella* sp. e *Azotobacter* sp. vivem no solo e fixam nitrogênio quando outras formas de N não estão disponíveis. Esta grande diversidade de espécies de procariotos que apresentam a capacidade de fixação biológica de nitrogênio demonstram a necessidade de estudos de novos microrganismos.

Nos últimos 10 anos, técnicas de análise molecular do DNA têm sido aplicadas para detectar e analisar bactérias sem a necessidade de nenhum procedimento de cultivo ou isolamento. Estas técnicas confirmam, através da variabilidade genética obtida de amostras ambientais, a existência de um grande número de microrganismos do solo nunca antes detectado pelas técnicas de cultivo (HUGENHOLTZ *et al.*, 1998). Dessa forma, muitas espécies de organismos diazotróficos podem estar contribuindo no processo de fixação de N sem ainda terem sido isolados.

2.4 Grupo rizóbio

As plantas da família Leguminosae, composta por aproximadamente 750 gêneros, destes 250 cultiváveis (FREIRE, 1992), possuem uma interação simbiótica com bactérias da ordem Rhizobiales, que se caracterizam pela formação de estruturas hipertróficas, nas raízes e, excepcionalmente, no caule, denominadas nódulos. A capacidade de fixação biológica de nitrogênio destes microrganismos ocorre devido ao complexo enzimático nitrogenase, que converte o N₂ em amônia e assim disponibiliza nitrogênio para as plantas (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

Estes microrganismos são bactérias Gram negativas, aeróbicas não esporulantes, pertencentes ao filo alpha-Proteobacteria, os quais são genericamente identificados como rizóbio (ZAKHIA & LAUJUDIE, 2001). A classificação destes

microrganismos, nos últimos vinte anos, esteve em constante alteração, sendo descobertos novos gêneros, alterando a taxonomia (WANG *et al.*, 2006).

No estudo taxonômico inicial de rizóbio, todas as bactérias formadoras de nódulos em leguminosas eram classificadas no gênero *Rhizobium* (FRANK, 1889 apud WANG *et al.*, 2006), apresentando seis espécies: *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. lupini* e *R. japonicum*. Nesta classificação, o círculo de hospedeiros era o fator mais importante na definição destas espécies, embora tenham sido descritas também características morfológicas e fisiológicas (FRED *et al.*, 1932). Com o prosseguimento das pesquisas, o uso da especificidade do hospedeiro como principal critério de classificação de rizóbio foi abandonado por apresentar um grande número de exceções dentro destes grupos (Wilson, 1944).

Em seu trabalho, Jordan (1982) modificou a taxonomia de rizóbio, dividindo-os em dois gêneros: *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*. O primeiro gênero correspondia às cepas de crescimento lento, de reação básica em meio de cultura LMA (Levedura Manitol Ágar) (VINCENT, 1970), com diâmetro menor ou igual a 1 mm e crescimento em 5 a 7 dias, designando somente uma espécie *Bradyrhizobium japonicum*, que incluiu também a espécie *R. lupini* por apresentar características semelhantes. No gênero *Rhizobium* alocaram-se três espécies: *R. leguminosarum*, *R. meliloti* e *R. loti*. Na primeira espécie foram considerados três biovares: *R. leguminosarum* bv. *viciae*, bv. *trifolii* e bv. *phaseoli*. Os três biovares constituíram o mesmo grupo na taxonomia numérica e na hibridização DNA-DNA, mas corresponderam a diferentes grupos de nodulação cruzada (WANG *et al.*, 2006).

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

Atualmente, a taxonomia do grupo rizóbio vem sendo modificada. A principal alteração ocorreu no gênero *Rhizobium*, ao qual foram incluídas todas as espécies de *Agrobacterium* (CONN, 1942) e *Allorhizobium undicola* (de LAJUDIE, 1998a), combinando as novas espécies: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* e *R. vitis* (YOUNG *et al.*, 2001). Outra mudança aconteceu ao gênero

Sinorhizobium, de acordo com Young (2003), os gêneros *Sinorhizobium* e *Ensifer* são similares e segundo o “*Bacteriological Code*” o gênero *Sinorhizobium* deve ser transferido para *Ensifer* por ter sido descrito posteriormente. Assim, hoje são consideradas quatro famílias (Rhizobiaceae, Bradyrhizobiaceae, Phylobacteraceae e Xanthobacteraceae), cinco gêneros (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium/ Ensifer*² e *Azorhizobium*) e 46 espécies validadas pelo *IJSEM*³ (Tabela 1).

Tabela 1 – Diferentes famílias e gêneros de rizóbio fixadores de nitrogênio descritos.

| Família | Gênero | Número de Espécies | Autor(es) e ano |
|-------------------|-------------------------------|--------------------|---|
| Rhizobiaceae | <i>Rhizobium</i> | 16 | Frank (1889) |
| | <i>Sinorhizobium/ Ensifer</i> | 13 | Chen <i>et al.</i> (1988); de Lajudie <i>et al.</i> (1994) |
| Bradyrhizobiaceae | <i>Bradyrhizobium</i> | 5 | Jordan (1984) |
| Phylobacteraceae | <i>Mesorhizobium</i> | 10 | Jarvis <i>et al.</i> (1997) |
| Xanthobacteraceae | <i>Azorhizobium</i> | 2 | Dreyfus <i>et al.</i> (1988) |

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

² Neste trabalho, o autor convencionou em utilizar somente *Sinorhizobium* para designação do gênero.

³ *IJSEM*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. A validação de um novo *taxon* deve vir acompanhada de uma publicação neste periódico ou que passe a integrar a lista de publicações validas, aprovadas pelo *ICSP* (*International Committee on Systematics of Prokaryotes*).

No Filo β -Proteobacteria foi isolado o gênero *Ralstonia* (*R. taiwanensis*) a partir de nódulos de *Mimosa* spp. por Chen *et al.* (2001), enquanto Vandamme *et al.* (2002) reportaram o gênero *Burkholderia*, abrangendo quatro espécies (*B. tuberum*, *B. phymatum*, *B. caribensis*, *B. cepacia*) isoladas de cinco leguminosas tropicais. Essas descobertas indicam que a diversidade de procariotos capazes de estabelecer simbiose com leguminosas pode ser muito mais ampla que o previsto e certamente conduzirão a avanços significativos no conhecimento da origem e evolução da fixação biológica de nitrogênio, assim como sua manipulação pelo homem.

2.5 Taxonomia de rizóbio

A sistemática bacteriana é definida com sendo o processo de caracterização e arranjo da diversidade em uma maneira ordenada, reconhecendo grupos de organismos similares em uma hierarquia, cuja entidade básica é a espécie (DELLAGLIO *et al.*, 2004). De acordo com Cowan (1968), a sistemática inclui a taxonomia e aspectos da ecologia, bioquímica, genética, patologia, biologia molecular e microscopia. No entanto, o termo sistemática é comumente utilizado como sinônimo de taxonomia.

Segundo Vandamme *et al.* (1996), a taxonomia bacteriana é tradicionalmente dividida em: a) classificação, isto é, o arranjo ordenado dos organismos em grupos taxonômicos com base em sua similaridade; b) nomenclatura, ou seja, identificação das unidades definidas na classificação; c) identificação de organismos desconhecidos, que é o processo de definir se um determinado organismo pertence a uma das unidades definidas na nomenclatura.

De acordo com Holt *et al.* (1994, p. 03) “*Esquemas de identificação não são esquemas de classificação, apesar de poder existir certa similaridade*”. O processo de identificação envolve um numero reduzido de caracteres, facilmente determinado, que permitam uma alocação correta à espécie, enquanto que na classificação busca-se uma ampla coleção de dados, envolvendo vários aspectos fenotípicos e do genótipo, permitindo descrever as propriedades do microrganismo.

A identificação de uma bactéria se inicia na caracterização fenotípica e genética dos isolados e posterior alocação deste isolado caracterizado a uma espécie conhecida, após a verificação de certo grau de similaridade.

2.5.1 Caracterização fenotípica de rizóbio

Estão incluídos nos métodos fenotípicos todos aqueles não direcionados às moléculas de DNA ou RNA, conseqüentemente incluem as técnicas quimiotaxonômicas⁴ (VANDAMME *et al.*, 1996). Desta maneira os principais métodos fenotípicos são denominados de tradicionais e quimiotaxonômicos.

2.5.1.1 Métodos fenotípicos tradicionais

Os métodos fenotípicos tradicionais são usados nos protocolos de identificação da maioria dos Laboratórios de Microbiologia, compreendem dados morfológicos, fisiológicos e bioquímicos que permitem a distinção de diferentes *taxa*.

Os gêneros de rizóbio descritos até o momento podem ser diferenciados com base em características culturais e morfológicas em meio LMA (VINCENT, 1970). Segundo Martins *et al.* (1997), os principais parâmetros utilizados são: tempo de crescimento em meio de cultura LMA, reação ácida ou básica em meio de cultura, diâmetro de colônia, produção de polissacarídeos extracelulares (goma) e coloração da colônia. Com relação ao tempo de crescimento podem, ser formados cinco grupos: muito rápido, para aquelas colônias que podem ser visualizadas após 1 dia de incubação; rápido, para aquelas que são visualizadas de 2 a 3 dias de incubação, intermediárias; com 4 a 5 dias; lentas, com 6 a 10 dias e muito lentas, são visualizadas após 10 dias de incubação (MELLONI *et al.*, 2006)

⁴ O termo quimiotaxonomia refere-se à aplicação de métodos analíticos para a coleta de informações sobre os vários constituintes da célula visando à classificação bacteriana (Vandamme *et al.*, 1996)

A alteração do pH do meio de cultura pode ser usada para dividir os isolados em três classes: estirpes que apresentam reação ácida, reação básica ou reação neutra em meio de cultura. Placas com meio LMA recém preparadas com azul de bromotimol, possuem pH próximo a 6,8 e cor verde. Rizóbios de crescimento lento tendem a alcalinizar, modificando a cor para azul, enquanto os rizóbios de crescimento rápido tendem a acidificar o meio, alterando a cor para amarelo (MARTINS *et al.*, 1997). Tan & Broughton (1981) sugerem que as mudanças de pH promovidas pelo rizóbio no meio de cultura são devido à utilização preferencial de açúcares pelas estirpes de crescimento rápido, seguida da excreção de ácidos orgânicos, e de compostos nitrogenados pelas estirpes de crescimento lento e conseqüente liberação de cátions.

O diâmetro das colônias dos isolados que nodulam leguminosas é um parâmetro que apresenta correlação com outras características culturais. Colônias com diâmetro menor que 1 mm possuem superfície seca ou pouca produção de polissacarídeos, e colônias maiores tendem a produzir mais goma (Martins *et al.*, 1997).

A produção de polissacarídeos extracelulares, também denominada de muco ou goma, é outra característica utilizada na caracterização de rizóbio. As estirpes podem ser agrupadas em secas, quando não produzem goma, e quando ocorre formação de goma são classificadas quanto à quantidade produzida em: alta, média e baixa. Estirpes de crescimento rápido tendem a produzir mais goma, ao contrário de rizóbios de crescimento lento que formam colônias secas ou com baixa produção de muco (MARTINS *et al.*, 1997).

A coloração da colônia varia dentro das diferentes estirpes de rizóbio, sendo uma importante característica no agrupamento de *taxa*. A coloração pode variar de incolor, branco a creme, sendo mais incomum a cor amarela (ARAÚJO, 1994).

A avaliação das características culturais e morfológicas é o primeiro passo para a identificação de grupos taxonômicos de microrganismos, podendo prever uma boa aproximação em nível de gênero. Estes descritores podem indicar diferenças fisiológicas importantes entre microrganismos, que podem ser detectadas posteriormente mediante estudos mais refinados (PELCZAR *et al.*, 1997). Um exemplo é o gênero *Mesorhizobium*, no qual foram incluídos isolados que apresentavam algumas características fenotípicas diferenciadas do gênero

Rhizobium, inclusive algumas estirpes que apresentam crescimento intermediário, sugerindo a existência de diferenças metabólicas importantes (MOREIRA *et al.*, 1993; JARVIS *et al.*, 1997; de LAJUDIE *et al.*, 1998b).

Alguns descritores fenotípicos tradicionais avaliados têm como objetivo não somente a caracterização, mas verificar a provável adaptabilidade ecológica dos diferentes isolados às condições ambientais predominantes no ecossistema para o qual se procede a seleção do rizóbio. A capacidade de crescimento em diferentes pH, concentrações de sais, temperatura e antibiótico são utilizados na caracterização “*in vitro*” como também na correlação com condições ambientais (SWELLIM *et al.*, 1997; SÁ *et al.*, 1993; XAVIER *et al.*, 1998).

A habilidade em utilizar diferentes fontes de carboidratos pode ser usada também na diferenciação das espécies de rizóbio (GRAHAM *et al.*, 1991). Esta caracterização pode ser feita através do uso de *kits* para estudo de descritores bioquímicos, como o sistema API, Staph-Ident, Rapid E, Enterotubos, Oxi-ferm, Micro ID System e Biolog Nutritional System (HÜBNER *et al.*, 2004).

2.5.1.2 Métodos quimiotaxonômicos

As técnicas quimiotaxonômicas visam avaliar a composição química de alguns constituintes da célula procariótica, sendo os principais métodos SDS PAGE, análise de isoenzima, sorologia e pirólise (avaliação do conteúdo de ácidos graxos) (VANDAMME *et al.*, 1996).

A análise de proteínas totais por eletroforese em gel de dodecil sulfato de sódio (SDS PAGE – sodium dodecyl sulfato polyacrylamide gel electrophoresis) é utilizada na caracterização bacteriana por apresentar uma alta confiabilidade na distinção de estirpes muito proximamente relacionadas (VANDAMME *et al.*, 1996). Este método foi empregado por Lima *et al.* (2005) no estudo da diversidade de estirpes de *Bradyrhizobium* spp. isoladas de diferentes solos da Amazônia. Este método foi também utilizado na determinação das relações filogenéticas entre *Mesorhizobium tianshanense* e outros rizóbios (TAN *et al.*, 1997), e na caracterização da espécie *Methylobacterium nodulans* (JOURAND *et al.*, 2004).

Outra técnica que utiliza eletroforese é a análise de isoenzima, que se baseia no diagnóstico das múltiplas formas moleculares da mesma enzima que ocorre em uma determinada espécie, como resultado da presença de um ou mais genes codificando para cada uma destas formas (VANDAMME *et al.*, 1996). Este método foi utilizado por Barrera *et al.* (1997) na caracterização de uma população do gênero *Bradyrhizobium*.

Os métodos sorológicos vêm sendo empregados a mais de 70 anos na taxonomia de rizóbio. O princípio desta técnica está baseada na presença de variabilidade nos constituintes antigênicos das células bacterianas (NISCHI, 1994), sendo o método de ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*) considerado a principal prática. No entanto, o seu uso no processo de identificação bacteriana é limitado, uma vez que estirpes de rizóbio que possuem propriedades antigênicas similares podem ser bastante diversas com respeito a outras características fenotípicas e genotípicas.

A análise do teor de ácidos graxos celulares constitui-se em um método rápido e reproduzível, quando realizada em condições controladas (JARVIS & TIGHE, 1994). Este método foi utilizado para a discriminação entre estirpes de *Bradyrhizobium* e *R. meliloti* isoladas de diferentes solos da Itália (KAY *et al.*, 1994).

2.5.2 Caracterização genética de rizóbio

Os métodos genotípicos de taxonomia, direcionados para moléculas de DNA ou RNA, são uma consequência do progresso tecnológico experimentado pela biologia molecular nas décadas recentes e atualmente dominam os estudos taxonômicos modernos (VANDAMME *et al.*, 1996). A caracterização genética de procariotos pode ser baseada na quantidade total do DNA, pelas técnicas de hibridização de DNA e RFLP (*Restrictions Fragment Length Polymorphism*), e por amplificação de seqüências do DNA e RNA, pelas diferentes metodologias de PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

2.5.2.1 Hibridização do DNA

A definição de uma espécie bacteriana é feita pela hibridização DNA-DNA (VANDAMME *et al.*, 1996). Este método é baseado na capacidade do DNA se desnaturar a altas temperaturas e recombinar-se em baixas temperaturas. Quando o percentual de recombinação DNA-DNA é igual ou superior a 70% sugere ser a mesma espécie. Estirpes que possuem uma hibridização variando entre 25 e 60% são consideradas espécies diferentes pertencentes ao mesmo gênero e percentuais inferiores a 10% compreendem gêneros diferentes (WANG *et al.*, 2006).

A maior parte das espécies de rizóbio hoje definidas obedece este critério. No entanto Martinez-Romero (1994) relata alguns casos de muito baixa homologia de DNA dentro das espécies *Sinorhizobium fredii*, *Rhizobium tropici*, *Mesorhizobium plurifarum*. Nestes casos métodos fenotípicos podem auxiliar na correta distinção das estirpes.

2.5.2.2 Polimorfismo dos tamanhos dos fragmentos de restrição (RFLP)

A determinação do polimorfismo dos tamanhos de fragmentos de restrição (RFLP – *Restrictions Fragment Length Polymorphism*) é um método empregado em taxonomia de procariontes e nos estudos de diversidade para comparação de estirpes (WANG *et al.*, 2006).

A distinção dos grupos bacterianos é feita através do polimorfismo gerado no DNA total pela ação de enzimas de restrição. Esta análise inclui a digestão do DNA total com o uso de enzimas específicas, sua separação por eletroforese e a hibridização com fragmentos de seqüência homologa de DNA marcadas com radioatividade ou compostos que desencadeiam uma reação de luminescência (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995). Outra metodologia pode ser realizada pela clivagem do produto oriundo da reação de PCR com enzimas de restrição e visualizada em gel de agarose, na técnica denominada PCR-RFLP.

As análises de RFLP e PCR-RFLP vêm sendo muito utilizadas na caracterização da diversidade entre diferentes populações de rizóbio, principalmente avaliando as regiões 16S do RNAr e da região intergênica 16S e 23S RNAr (FERNANDES *et al.*, 2003; TAN *et al.*, 2001; CHUEIRE *et al.*, 2000a; DOIGNON-BOURCIER *et al.*, 2000).

2.5.2.3 Análises baseadas na reação em cadeia de polimerase

As técnicas de PCR permitem a amplificação de seqüências definidas da molécula de DNA, diferenciando e identificando as estirpes de bactérias. Esta prática contribuiu para os recentes avanços obtidos na taxonomia de rizóbio.

O uso de oligonucleotídeos específicos que amplificam seqüências repetidas do DNA, pela técnica de PCR, proporcionando a formação de perfis eletroforéticos que promovem a chamada impressão digital do organismo (*fingerprinting*). Os oligonucleotídeos mais comumente utilizados são BOX, ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) e REP (*Repetitive Extragenic Palindromic Sequences*) que amplificam seqüências repetidas no genoma bacteriano (VERSALOVIC *et al.*, 1994). Estes métodos têm sido empregados no estudo da diversidade intra-específica de rizóbio, fazendo a distinção de estirpes muito proximamente relacionadas (FERNANDES *et al.*, 2003; CHUEIRE *et al.*, 2000b).

Para a distinção de estirpes recomendadas para o cultivo de diferentes espécies de leguminosas vêm sendo empregados os métodos que utilizam os oligonucleotídeos ERIC, REP e BOX (CHUEIRE *et al.*, 2000a; CHUEIRE *et al.*, 2000b; BANGEL, 2000). Segundo Selenska-Pobell *et al.* (1996), a técnica de BOX-PCR foi eficiente para distinguir diferentes espécies de *Rhizobium* e as informações geradas auxiliaram na caracterização realizada pela técnica de RFLP do DNA. O estudo da diversidade de 29 isolados bacterianos de três espécies arbóreas de regiões temperadas da China foi realizada pela técnica de BOX-PCR e permitiram alocar estas estirpes no gênero *Bradyrhizobium* (LIU *et al.*, 2005).

Outra ferramenta de uso crescente na prática de identificação de bactérias é a amplificação de regiões específicas do genoma e posterior seqüenciamento de bases. A identificação é determinada pela comparação das seqüências obtidas com a de outros organismos disponíveis no banco de dados da *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). As moléculas de RNA 16S e 23S presentes no ribossomo são comumente empregadas na taxonomia de procariotos por serem regiões conservadas e se enquadram nos conceitos que definem um marcador filogenético relatado por Piazza *et al.* (2006). A região 23S é bem maior do que a 16S, contendo mais informações genéticas úteis em estudos de filogenia (LUDWING *et al.* 1992), no entanto o número de seqüências presentes nos bancos de dados é pouco, limitando a comparação de novas seqüências⁵.

⁵ A comparação do número de seqüências de 16S e 23S, disponíveis para alinhamento, pode ser feita no banco de dados da NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para a execução do trabalho foram coletadas amostras de raízes em Alegrete, Maçambará e São Francisco de Assis (Tabela 1) e o material foi analisado nos Laboratórios de Biologia e Microbiologia do Solo e do Ambiente do Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria/RS e no Núcleo de Microbiologia Agrícola do Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul/RS (Figura 3).

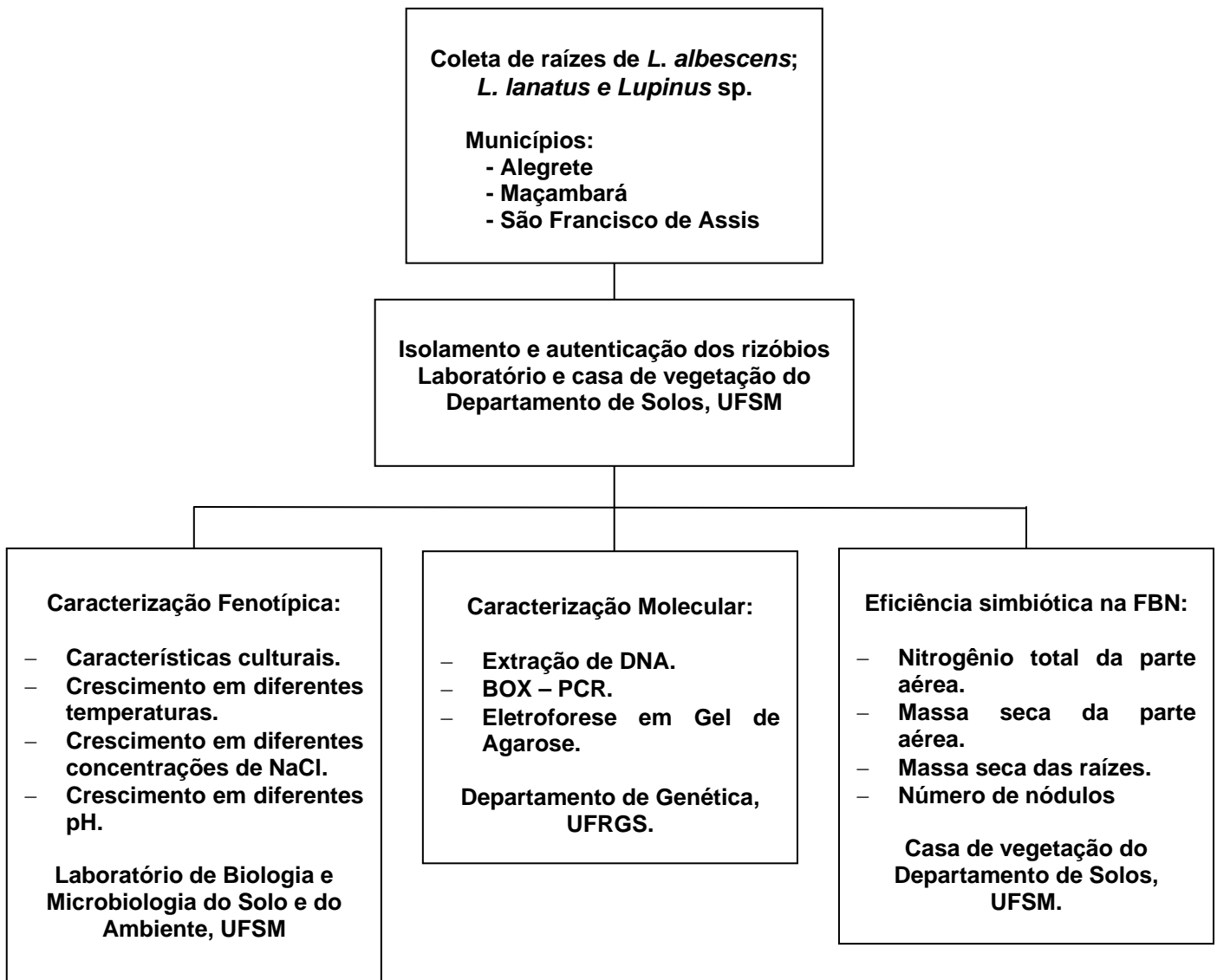


Figura 3 – Etapas da execução do trabalho com rizóbio em *Lupinus*. Santa Maria, 2007.

3.1 Coleta das raízes das plantas de *Lupinus*

Para escolha dos locais a serem coletadas as raízes de *Lupinus*, foram selecionadas duas áreas de ocorrência natural de *Lupinus albescens*, no local denominado “Ponte de Pedra” e na Fazenda Santa Zélia, localizados nos municípios de Alegrete e Maçambará. Foi escolhida também uma área de arenização onde as plantas de *L. albescens* estão sendo cultivadas aproximadamente a 5 anos, localizado na Fazenda Santo Antão no município de Alegrete. As raízes das espécies *L. lanatus* e *Lupinus* sp. foram coletadas em uma voçoroca no município de São Francisco de Assis (Tabela 2).

O procedimento de coleta foi realizado de acordo com metodologia modificada proposta por Hungria (1994). Em cada local foram amostradas plantas em plena floração, tendo sido escolhidas de forma aleatória. Cavou-se ao redor da raiz para a retirada intacta do sistema radicular. Removeu-se o excesso de solo e foi retirada a parte aérea com auxílio de uma tesoura de poda. As raízes foram colocadas em sacos plásticos e acondicionadas em uma caixa térmica.

Tabela 2 – Locais de coleta de três espécies de tremço nos municípios de Alegrete, Maçambará e São Francisco de Assis. Santa Maria, 2007.

| Local de Coleta | Número de Plantas | Espécie | Coordenadas Geográficas | Município |
|---------------------|-------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|
| “Ponte de Pedra” | 10 | <i>Lupinus albescens</i> | 29°39'58”S e 55°23'43”W | Alegrete |
| Fazenda Santo Antão | 10 | <i>Lupinus albescens</i> | 29°40'58”S e 55°19'40”W | Alegrete |
| Fazenda Santa Zélia | 10 | <i>Lupinus albescens</i> | 28°53'07”S e 56°17'01”W | Maçambará |
| Voçoroca | 10 | <i>Lupinus</i> sp. | 29°31'23”S e 55°14'40”W | São Francisco de Assis |
| | 2 | <i>Lupinus lanatus</i> | 29°31'23”S e 55°14'40”W | São Francisco de Assis |

3.2 Isolamento de rizóbio

O isolamento das bactérias foi realizado no Laboratório de Biologia e Microbiologia do Solo e do Ambiente da Universidade Federal de Santa Maria. As raízes coletadas foram lavadas com auxílio de uma peneira. As raízes com os nódulos foram secos em papel toalha e as raízes fragmentadas em pedaços menores com auxílio de uma tesoura de poda para facilitar a retirada do material do interior do nódulo. Para cada sistema radicular foram retirados de um a três nódulos. Após esta limpeza, os nódulos foram acondicionados em placas de Petri.

A desinfestação dos nódulos foi feita de acordo com metodologia proposta por Hungria (1994). Cada nódulo foi submerso em álcool 95% por dez segundos, posteriormente em solução de hipoclorito a 5% e seguido de oito lavagens em água destilada e esterilizada. Os nódulos foram cortados ao meio com auxílio de bisturi e pinça para raspagem do seu interior e posterior inoculação em meio de cultura LMA (Levedura Manitol Agar) (VINCENT, 1970). O material amostrado foi incubado no escuro a 28°C por 10 dias (Figura 4).

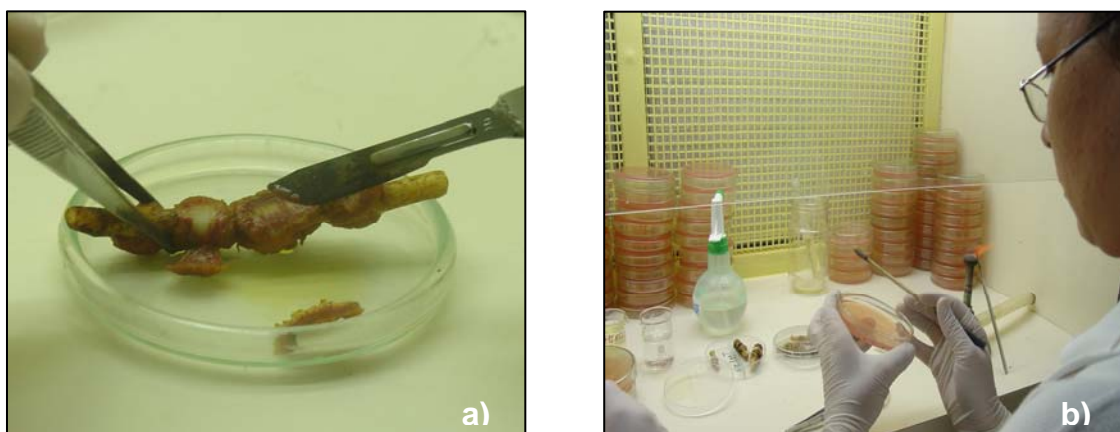


Figura 4 – Isolamento de bactérias a partir de nódulos de *Lupinus albus*: a) amostragem de material do interior do nódulo; b) inoculação em meio LMA.

Após a inoculação, as colônias isoladas que apresentavam crescimento entre 2 a 10 dias e não absorviam o vermelho congo, eram marcadas e inoculadas novamente em meio de cultura LMA para purificação. A pureza do isolado foi determinada mediante teste de Coloração de Gram. Os trinta e oito isolados bacterianos inicialmente purificados foram utilizados para a realização da autenticação e caracterização fenotípica.

3.3 Autenticação dos isolados

A capacidade de nodulação e formação de leghemoglobina foi verificada pela autenticação dos isolados. O experimento foi realizado em casa de vegetação do Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria durante 60 dias.

O experimento foi realizado em copos de plástico com capacidade de 500 mL, contendo uma mistura composta de vermiculita e areia na proporção 2:1, a qual foi acondicionada em sacos plásticos de polipropileno e esterilizada por uma hora em autoclave a 120°C por três dias consecutivos. Em cada recipiente foram colocados cinco sementes de *L. albescens* previamente escarificadas e desinfestadas em solução de hipoclorito 5 % por 5 min. O inóculo consistiu de caldo LM (VICENT, 1970), onde foram inoculados os tratamentos e incubado a 28°C por seis dias sob agitação de 120 rpm.

O experimento constou de 41 tratamentos com duas repetições, sendo 38 isolados, duas estirpes de *Bradyrhizobium* sp. recomendadas para *Lupinus* (SEMIA 928 e 938), um tratamento sem inoculação. A cada cinco dias era adicionado 10 mL de solução nutritiva (SOMASEGARAN & HOBEN, 1985). A avaliação da presença dos nódulos foi feita em lupa estereoscópica no Laboratório de Microbiologia e Biologia do Solo e do Ambiente.

3.4 Caracterização fenotípica

3.4.1 Características culturais

3.4.1.1 Coloração de Gram

As culturas foram crescidas a 28°C, por seis dias, em placas de Petri com meio de cultura LMA. Pequena amostra do crescimento foi então transferida e esparramada em uma gota de água em lâmina de microscopia. O esfregaço foi fixado na chama de lamparina e então submetido ao método de coloração de Gram de Hucker, de acordo com procedimento descrito por Murray *et al.* (1994) modificado pela substituição de etanol 95% por solução alcoólica de acetona a 5% como agente de descoloração.

As soluções de Gram estão descritas no Anexo A. A lâmina preparada foi analisada sob objetiva de 100 x sob óleo de imersão em microscópio óptico com aumento de 2.000 vezes. Culturas que apresentaram células de cor azul-violáceo foram assumidas como sendo Gram positivas e aquelas de coloração vermelho-róseo como Gram negativas.

3.4.1.2 Tempo de crescimento para a visualização das colônias

Os isolados foram crescidos em placas de Petri contendo meio LMA (VINCENT, 1970) modificado pela a adição de 5 mL L⁻¹ de solução de Vermelho Congo (Figura 5). Foi considerado crescimento muito rápido, para aquelas colônias que podem ser visualizadas após um dia de incubação; rápido, para aquelas que são visualizadas de dois a três dias de incubação, intermediárias; com quatro a

cinco dias; lentas, com seis a dez dias e muito lentas, são visualizadas após dez dias de incubação (MELLONI *et al.*, 2006).

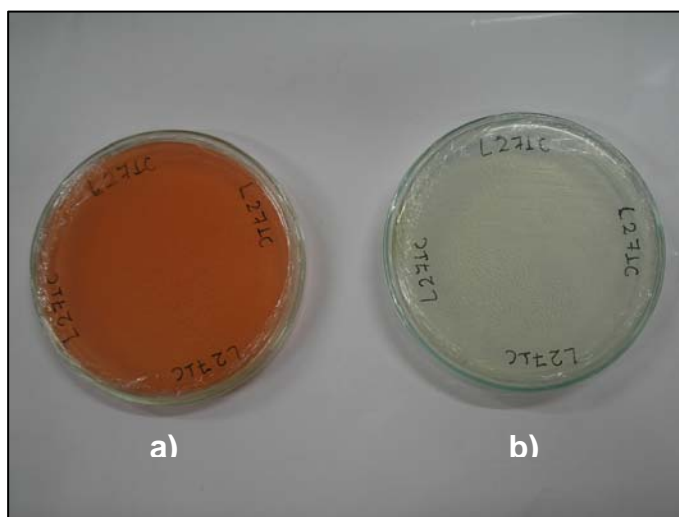


Figura 5 – Meio de cultura LMA com vermelho congo (a) e azul de bromotimol (b), utilizados na caracterização cultural dos isolados. Santa Maria, 2007.

3.4.1.3 Diâmetro das colônias

O diâmetro das colônias foi determinado juntamente com o tempo de crescimento. Após sete dias de incubação, o diâmetro das colônias foi medido com auxílio de um paquímetro, sendo o tamanho determinado em milímetro. Em cada uma das placas, foram medidas 10 colônias isoladas e os resultados obtidos foram submetidos à média aritmética e expressos em valores absolutos.

3.4.1.4 Produção de goma

A produção de goma (polissacarídeos) foi determinada juntamente com o diâmetro das colônias, após sete dias de incubação. Esta característica foi determinada visualmente em: sem produção de goma (s/goma), baixa, média e alta produção de goma (MELLONI *et al.*, 2006).

3.4.1.5 Coloração das colônias

A coloração das colônias foi determinada visualmente durante a determinação do diâmetro das colônias. Foram consideradas as cores: branca, creme, amarela e incolor (MELLONI *et al.*, 2006).

3.4.1.6 Alteração do pH do meio

Os isolados foram inoculados em meio LMA (VINCENT, 1970) modificado pela a adição 10 mL L⁻¹ de Azul de Bromotimol (Figura 5). A coloração azul do meio de cultura foi considerada alcalina, coloração amarela ácido e a não alteração da cor original do meio neutro. Os isolados foram comparados com placas sem inoculação e inoculada com a estirpe de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 938.

3.4.1.7 Agrupamento dos isolados

Após a caracterização cultural dos isolados, foi construído um dendograma de similaridade pelos métodos *Complete Linkage* e Distância Euclidiana (Everitt, 1993 apud Melloni *et al.*, 2006) por meio do programa STATISTICA 4.5 (1993). Os valores obtidos na caracterização foram estipulados de acordo com Melloni *et al.* (2006) (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores relativos às características culturais dos isolados utilizados na construção do dendograma. Santa Maria, 2007.

| Característica cultural | Intervalo de observação | Valor atribuído para a construção do dendogramas ⁽¹⁾ |
|--|----------------------------|---|
| A. Tempo, em dias para visualização das colônias | 1 dia (muito rápido) | 1 |
| | 2 a 3 dias (rápido) | 2 |
| | 4 a 5 dias (intermediário) | 3 |
| | 6 a 10 dias (lento) | 4 |
| | 10 dias (muito lento) | 5 |
| B. Diâmetro da colônia | < 1 mm | 1 |
| | 1 a 2 mm | 2 |
| | > 2 mm | 3 |
| C. Alteração do pH do meio | Acido | 1 |
| | Neutro | 2 |
| | Básico | 3 |
| D. Produção de goma | s/goma | 1 |
| | Baixa | 2 |
| | Média | 3 |
| | Alta | 4 |
| E. Coloração da colônia | Branca | 1 |
| | Creme | 2 |
| | Amarela | 3 |
| | Incolor | 4 |

⁽¹⁾ Os valores foram ponderados de acordo com a importância atribuída às características culturais na construção do dendograma, sendo 100, 75, 100, 25 e 75% para as características A, B, C, D e E (MELLONI *et al.*, 2006).

Os valores obtidos na caracterização fenotípica foram ponderados de acordo com a importância atribuída às características fenotípicas na construção do dendograma, sendo 100, 75, 100, 25 e 75% para as características tempo, em dias para visualização das colônias; diâmetro médio das colônias; modificação do pH do meio LMA com Azul de Bromotimol; produção de goma e coloração das colônias, respectivamente, de acordo com Melloni *et al.* (2006) e Moreira *et al.* (1993).

3.4.2 Caracterização fisiológica

Os isolados que apresentaram formação de nódulos e produção de leghemoglobina e a estirpe SEMIA 938, foram submetidos aos testes de crescimento em diferentes temperaturas, concentrações de NaCl e pH.

3.4.2.1 Crescimento em diferentes temperaturas

A capacidade de crescimento em diferentes temperaturas foi determinada pela inoculação em tubos de ensaio contendo meio LM (Levedura Manitol) (VINCENT, 1970), onde os isolados foram incubados a temperatura de 28; 32; 37 e 40°C. Tubos que apresentavam turbidez no caldo foram considerados como resultado positivo e não turvos foram considerados negativos. Foi utilizado na comparação um tratamento sem inoculação para confirmar a ausência de crescimento (Figura 6).

3.4.2.2 Crescimento em diferentes pH

Para avaliar a capacidade de crescimento em diferentes pH, tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo LM (VINCENT, 1970), tendo valores de pH de 4; 5; 6; 7; 8; 9 e 10, ajustados com NaOH e HCl 1M, foram incubados e crescidos a uma temperatura de 28°C sob agitação de 120 rpm. A análise de crescimento foi determinada sete dias após a incubação. Tubos que apresentavam turbidez no caldo foram considerados como resultado positivo e não turvos foram considerados negativos. Foram inoculadas duas testemunhas que cresceram em caldo LM (VINCENT, 1970) com pH 6,8 e temperatura de 28°C sob agitação de 120 rpm. Foi utilizado na comparação um tratamento sem inoculação para confirmar a ausência de crescimento (Figura 6).

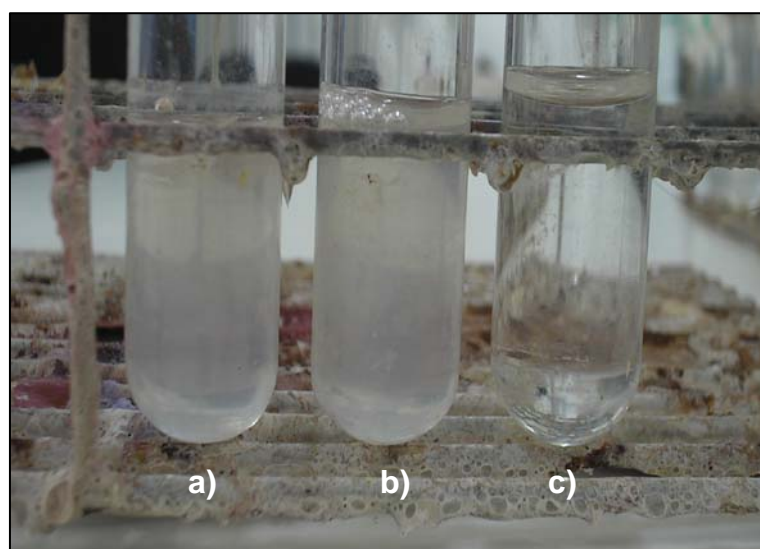


Figura 6 – Padrões utilizados na caracterização fisiológica dos rizóbio. a) UFSM L1.3; b) SEMIA 938; c) Sem inoculação. Santa Maria, 2007.

3.4.2.3 Crescimento em diferentes concentrações de NaCl

A habilidade de crescer em diferentes concentrações de NaCl foi determinada pela incubação dos isolados em tubos de ensaio contendo 5 mL de caldo LM (VINCENT, 1970) acrescidos com 0,1; 0,5; 1,0; 5,0 e 10,0 % (m/v) de NaCl, incubados a 28°C sob agitação de 120 rpm durante sete dias. Tubos com turbidez no caldo foram considerados com crescimento positivo e não turbos negativos. Duas testemunhas foram utilizadas na comparação, crescidas a pH 6.8 em temperatura de 28°C sob agitação de 120 rpm no mesmo período de tempo. Um tratamento sem inoculação foi utilizado na comparação dos resultados negativos (Figura 6).

Para o desenvolvimento dos testes de crescimento em diferentes pH e concentrações de NaCl, foram considerados duas repetições por tratamento, caso houvesse discordância de resultado em cada repetição, os tratamentos seriam inoculados novamente.

3.5 Identificação dos isolados

A partir das características culturais dos isolados, foi realizada a identificação do gênero, comparando os dados obtidos dos isolados que apresentaram resultado positivo para formação de nódulos e leghemoglobina pelo teste de autenticação, com dados obtidos da literatura de 21 estirpes tipo de rizóbio (Tabela 4). O agrupamento foi realizado mediante a construção de um dendograma de similaridade pelos métodos *Complete Linkage* e Distância Euclidiana (EVERITT, 1993) por meio do programa STATISTICA 4.5 (1993). Os valores obtidos na caracterização e da literatura para construção do dendograma foram ponderados de maneira semelhante ao item 3.4.1.7 (Tabela 3).

Tabela 4 – Espécies e estirpes tipo de rizóbio utilizadas na comparação dos isolados de *Lupinus*.

| Espécie | Estirpe-tipo | Referência |
|-------------------------------------|---------------------|----------------------------------|
| <i>Azorhizobium caulinodans</i> | ORS 571 | Dreyfus <i>et al.</i> (1988) |
| <i>Azorhizobium dobereineriae</i> | UFLA 1-100 | Moreira <i>et al.</i> (2006) |
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i> | ATCC10324 | Jordan <i>et al.</i> (1984) |
| <i>Bradyrhizobium liaoningense</i> | 2281 | Xu <i>et al.</i> (1995) |
| <i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> | CCBAU 10071 | Yao <i>et al.</i> (2002) |
| <i>Mesorhizobium amorphae</i> | ACCC 19665 | Wang <i>et al.</i> (1999) |
| <i>Mesorhizobium chacoense</i> | CECT 5336 | Velazquez <i>et al.</i> (2001) |
| <i>Mesorhizobium loti</i> | NZP2213 | Jarvis <i>et al.</i> (1997) |
| <i>Mesorhizobium plurifarum</i> | ORS 1032 | de Lajudie <i>et al.</i> (1998b) |
| <i>Mesorhizobium septentrionale</i> | SDW014 | Gao <i>et al.</i> (2004) |
| <i>Rhizobium huautlense</i> | SO2 | Wang <i>et al.</i> (1998) |
| <i>Rhizobium mongolense</i> | USDA 1844 | van Berkun <i>et al.</i> (1998) |
| <i>Rhizobium gallicum</i> | R602sp | Armager <i>et al.</i> (1997) |
| <i>Rhizobium giardinii</i> | H152 | Armager <i>et al.</i> (1997) |
| <i>Rhizobium hainanese</i> | I66 | Chen <i>et al.</i> (1997) |
| <i>Rhizobium lossense</i> | CCBAU7190B | Wei <i>et al.</i> (2003) |
| <i>Rhizobium undicula</i> | ORS 992 | de Lajudie <i>et al.</i> (1998a) |
| <i>Rhizobium yanglingense</i> | CCBAU71623 | Tan <i>et al.</i> (2001) |
| <i>Sinorhizobium arboris</i> | HAMBI 1552 | Nick <i>et al.</i> (1999) |
| <i>Sinorhizobium kummerowiae</i> | CCBAU71042 | Wei <i>et al.</i> (2002) |
| <i>Sinorhizobium morelense</i> | Lc57 | Wang <i>et al.</i> (2002) |

3.6 Caracterização molecular

A caracterização por BOX - PCR foi realizada no Núcleo de Microbiologia Agrícola, do Departamento de Genética da UFRGS. Foi utilizado na comparação o isolado de *Lupinus* L123B, SEMIA 938 e 928 e dois isolados de *Lupinus* descritos por Rovedder *et al.* (2005) de crescimento rápido e uma espécie de *Rhizobium* sp.

Para a extração de DNA foi seguido o protocolo modificado de Sambrook *et al.* (1998), onde as estirpes foram crescidas em meio líquido por sete dias. Uma alíquota de 1,5 mL de cultura foi transferidas para microtubos de 2 mL e centrifugados por 3 minutos a 16099 rcf por duas vezes. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 500 µL de TE1, homogeneizando em vortex até que todo pellet tenha sido ressuspendido. Foram adicionadas 25 µL de Lizoenzima e incubados a 37°C por 1 hora. Posteriormente, as amostras foram mantidas a temperatura ambiente por cinco minutos e adicionou-se 200 µL de acetato de amônia 7,5 M e mantidas em gelo por 15 min. Centrifugou-se por 10 min a 16099 rcf e o sobrenadante foi vertido para outro microtubo de 1,5 mL. A quantidade de 1 volume de fenol-clorofórmio foi adicionada e agitou-se por 10 minutos. O material foi centrifugado por 5 min a 2795 rcf após foi adicionado 8 µL de NaCl 5M e 0,6 volumes de isopropanol, e mantidas as amostras no gelo por 10 min. Centrifugou-se por 15 minutos a 12.000 rpm e o sobrenadante descartado. O pellet de DNA foi lavado com 500 µL de Etanol 70% e centrifugado por 2 minutos a 12.000 rpm. O pellet foi ressuspendido em 30 µL de TE.

O DNA das bactérias foi amplificado pela técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) com o oligonucleotídeo BOX A1-R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'), que amplifica regiões conservadas e repetitivas do DNA cromossômico. A amplificação foi realizada utilizando os seguintes ciclos: um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 6 min, 35 ciclos de desnaturação (30 seg a 90 °C), anelamento (1 min a 52°C) e extensão (8 min a 65°C), um ciclo de extensão final a 65°C por 16 min (MARTIN *et al.*, 1992). Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese a 80 V durante três horas em gel de agarose a 1,5% e corado com brometo de etídeo e fotografado.

O perfil de bandas no gel foi transformado em uma matriz binária bidimensional, onde 0 indicava a ausência de banda e 1 a presença e o agrupamento realizado pelo programa STATISTICA 4.5 (1993) usando o algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with arithmetic mean*) e o coeficiente de Pearson.

3.7 Teste de eficiência na Fixação Biológica de Nitrogênio

Neste experimento foram estudados os isolados que apresentaram resultado positivo para formação de nódulos e leghemoglobina pelo teste de autenticação e a estirpe SEMIA 938, recomendada para *Lupinus* sp., obtida da coleção de culturas da FEPAGRO (Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária).

O experimento foi realizado em vasos de plástico com capacidade de 500g de substrato, contendo uma mistura composta de vermiculita e areia na proporção 2:1, a qual foi acondicionada em sacos plásticos de polipropileno e esterilizada por uma hora em autoclave a 120°C por três dias consecutivos. Em cada vaso foram semeados quatro plantas de *Lupinus albescens* previamente escarificadas e desinfestadas em solução de hipoclorito 5 % (v/v) por 5 minutos. O inóculo consistiu de caldo LM (Vicent, 1970), onde foram inoculados os isolados e incubado a 28°C por seis dias sob agitação de 120 rpm. O número de células foi determinado em Câmara de Neubauer e expressos em células mL⁻¹.

A cada sete dias era adicionado 10 mL de solução nutritiva livre de nitrogênio (SOMASEGARAN & HOBEN, 1985). Os tratamentos consistiram do isolado UFSM L1.3, SEMIA 938, um tratamento sem adição de nitrogênio e outro com a adição de 400 mg de N, aplicados 50 mg na semeadura e por mais sete vezes via solução nutritiva. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições. O experimento foi conduzido por 45 dias, na casa de vegetação do Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria.

Na colheita, a parte aérea da planta foi separada do sistema radicular, sendo acondicionados em sacos de papel e secados em estufa a 65°C com ventilação forçada durante três dias. As avaliações realizadas foram: a produção de matéria seca da parte aérea, o acúmulo de nitrogênio na parte aérea, segundo metodologia descrita em Tedesco *et al.* (1995) número de nódulos e massa seca das raízes. Os dados foram submetidos ao teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade de erro, realizados pelo programa Sisvar 4.6 (FERREIRA, 2000).

A eficiência simbiônica (Efra) foi determinada segundo a equação (1) proposta por Brockwell *et al.* (1966), apud Sá (2001):

$$\text{Efra\%} = \frac{\text{N total fixado} - \text{N total S/N}}{\text{N total C/N} - \text{N total S/N}} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

N total fixado: nitrogênio total do tratamento;

N total S/N: nitrogênio total da testemunha sem nitrogênio;

N total C/N: nitrogênio total da testemunha com nitrogênio.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e caracterização

O isolamento proporcionou a obtenção de 204 isolados puros. Nas áreas “Ponte de Pedra” e Fazenda Santa Zélia foram isolados os maiores números de bactérias a partir de nódulos de *Lupinus albus* (76 e 50 isolados, respectivamente). Na área de arenização foram obtidos 39 isolados bacterianos a partir de nódulos de *Lupinus albus*. Estes resultados demonstram que os maiores números de isolados foram encontrados nas áreas de ocorrência natural de *L. albus*, em comparação a área em processo de arenização, onde foi introduzida esta espécie de trevo. Na voçoroca, a partir de duas plantas de *Lupinus luteus* obtiveram-se seis isolados e 32 isolados de *Lupinus* sp. (Tabela 5).

Tabela 5 – Relação do número de isolados nos quatro locais e nas três espécies de *Lupinus* estudadas. Santa Maria, 2007.

| Local de Coleta | Numero de Plantas | Espécie | Número de isolados |
|-----------------------|-------------------|-----------------------|--------------------|
| “Ponte de Pedra” | 10 | <i>Lupinus albus</i> | 76 |
| Fazenda Santo Antônio | 10 | <i>Lupinus albus</i> | 39 |
| Fazenda Santa Zélia | 10 | <i>Lupinus albus</i> | 50 |
| Voçoroca | 10 | <i>Lupinus</i> sp. | 32 |
| Voçoroca | 2 | <i>Lupinus luteus</i> | 6 |
| Total | | | 204 |

A caracterização fenotípica dos isolados bacterianos possibilitou a formação de dois grupos com características culturais distintas (I e II). O grupo I se diferenciou por apresentar o maior número de isolados bacterianos, com 81,5% do total de organismos caracterizados e o grupo II com 18,5% (Figura 7), sendo que todas as estirpes apresentaram reação de Gram negativa. O grupo rizóbio é encontrado nas α -Proteobactérias, tendo estes microrganismos reação de Gram negativa (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).

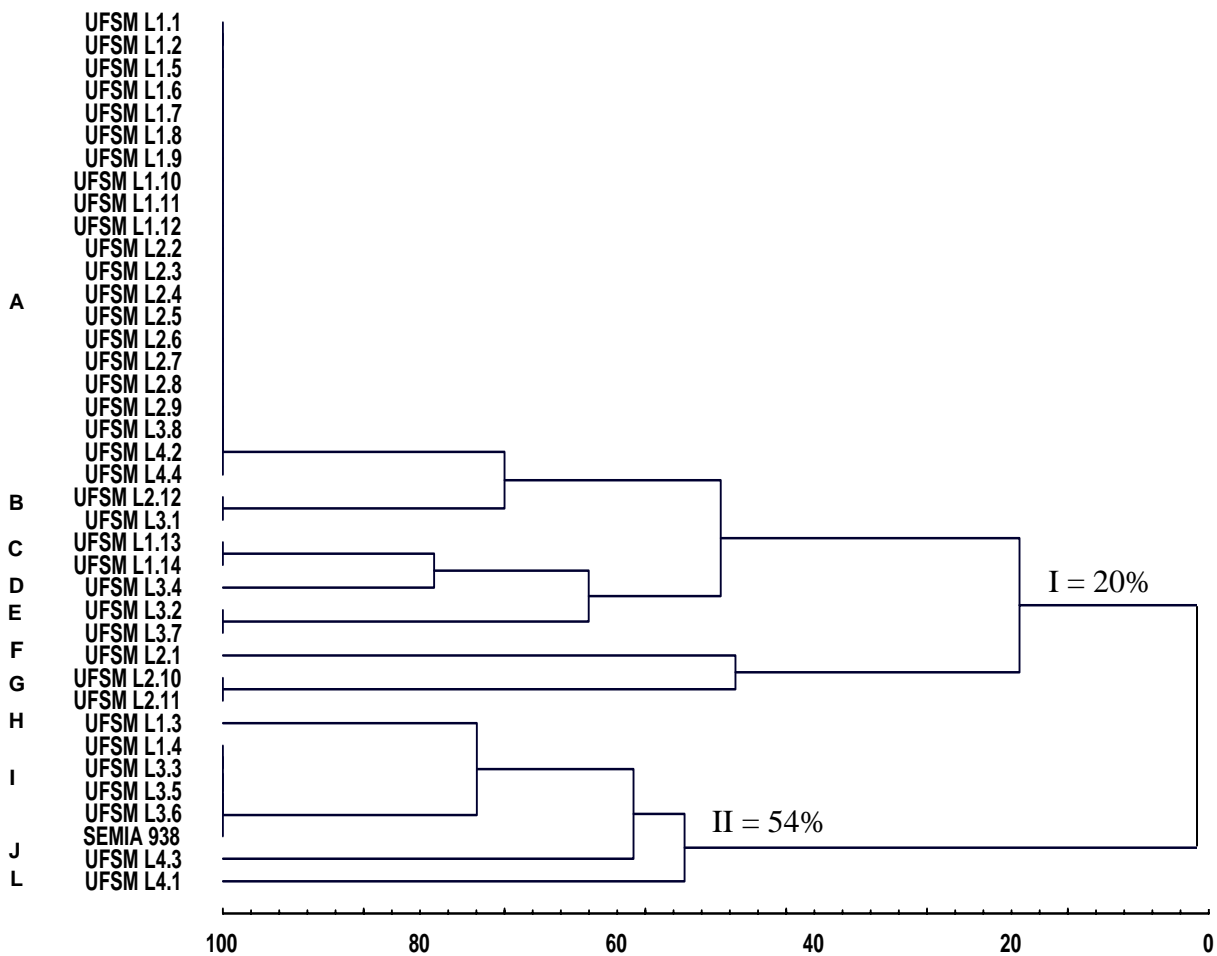


Figura 7 – Dendrograma de similaridade baseado nas características culturais de 38 isolados de *Lupinus* (UFSM L1.1, UFSM L1.2, UFSM L1.3, UFSM L1.4, UFSM L1.5, UFSM L1.6, UFSM L1.7, UFSM L1.8, UFSM L 1.9, UFSM L1.10, UFSM L1.11, UFSM L1.12, UFSM L1.13, UFSM L1.14, UFSM L2.1, UFSM L2.2, UFSM L2.3, UFSM L2.4, UFSM L2.5, UFSM L2.6, UFSM L2.7, UFSM L2.8, UFSM L2.9, UFSM L2.10, UFSM L2.11, UFSM L2.12, UFSM L3.1, UFSM L3.2, UFSM L3.3, UFSM L3.4, UFSM L3.5, UFSM L3.6, UFSM L3.8, UFSM L4.1, UFSM L4.2, UFSM L4.3, UFSM L4.4) e estirpe recomendada para *Lupinus* (SEMIA 938). Santa Maria, 2007.

Dos 38 isolados bacterianos avaliados, 28 apresentaram uma similaridade de aproximadamente 50%, os quais obtiveram crescimento rápido e intermediário (Grupos A, B, C, D e E) e reação ácida, com exceção do grupo C que teve reação neutra em meio de cultura (Tabela 5). Também dentro destes isolados bacterianos, o grupo E apresentou coloração de colônia branca, diferindo-se dos demais grupos que mostraram coloração incolor. Estes grupos variaram na intensidade de produção de goma, de baixa para o Grupo E, média para os grupos B, C e D e alta para o Grupo A (Tabela 6).

A alta produção de goma, pela maioria dos isolados de crescimento rápido, pode ter influenciado a variação no diâmetro de colônias encontradas no grupo A, possivelmente devido à alta concentração de nutrientes e de fontes de carbono do meio LMA. Por serem produtos extracelulares, os exopolissacarídeos se acumulam na superfície das células (CORONADO et al., 1996) e podem estar associados ao acúmulo de nutrientes, adesão superficial e proteção a estresses ambientais. O baixo pH e presença de alumínio são fatores de estresse ambiental evidenciado nas áreas em processo de arenização (ROVEDDER, 2003), o que torna a produção de exopolissacarídeos uma característica importante na seleção de bactérias fixadoras de nitrogênio em áreas arenizadas.

Com aproximadamente 55% de similaridade, sete isolados apresentaram crescimento lento (grupos H, I, L) e intermediário (grupo J), variando o diâmetro das colônias de 1 a 2 mm. Os grupos H e I apresentaram reação básica em meio de cultura, baixa produção de goma, variando na coloração da colônia, creme para o grupo H e branca para o grupo I. A estirpe SEMIA 938 apresentou 100% de similaridade com os isolados do grupo I e 74% com o isolado do grupo H (Figura 7 e Tabela 6).

Oito isolados bacterianos apresentaram crescimento lento e reação básica em meio de cultura. Estas características são comuns em isolados de *Lupinus* (BARRERA et al., 1997), entretanto, Miller & Pepper (1988) relatam o isolamento de bactérias de crescimento rápido em tremoço.

Tabela 6 – Características culturais fenotípicas dos isolados bacterianos pertencentes aos grupos formados a partir de cinco características básicas. Santa Maria, 2007.

| Grupo | Características | | | | | Número de Isolados |
|-------|-----------------|-----|--------|----------|---------|--------------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| A | 3 | 3-5 | Ácida | Alta | Incolor | 21 |
| B | 4 | 3 | Ácida | Média | Incolor | 2 |
| C | 3 | 2 | Neutra | Média | Incolor | 2 |
| D | 3 | 2 | Ácida | Média | Incolor | 1 |
| E | 3 | 2 | Ácida | Baixa | Branca | 2 |
| F | 1 | 1 | Ácida | Média | Branca | 1 |
| G | 3 | 1 | Ácida | Sem goma | Amarela | 2 |
| H | 6 | 1 | Básica | Baixa | Creme | 1 |
| I | 6 | 1 | Básica | Baixa | Branca | 5 |
| J | 5 | 1 | Neutra | Baixa | Incolor | 1 |
| L | 6 | 2 | Neutra | Média | Branca | 1 |

1: Tempo, em dias, para a visualização das colônias; 2: Diâmetro da colônia; 3: Alteração do pH do meio; 4: Produção de goma; 5: Coloração das colônias.

Os grupos F e G demonstraram ter características únicas, sendo F de crescimento muito rápido, com diâmetro de 1 mm, reação ácida em meio de cultura e coloração branca. Rovedder *et al.* (2005) relatam o isolamento de três isolados bacterianos com crescimento muito rápido e características culturais semelhantes a este grupo. Os dois isolados do grupo G tiveram as características mais divergentes, por apresentar colônias sem goma e amarelas, com diâmetro de 1 mm e apresentando tempo de crescimento rápido, diferenciando dos outros de crescimento rápido e lento.

4.2 Autenticação dos isolados bacterianos nativos

A capacidade de formação de nódulos e produção de leghemoglobina é pré-requisito para definir o grupo rizóbio. Desta maneira, em trabalhos de rizobiologia, este conhecimento é importante para reduzir o número de organismos a serem estudados e selecionar estirpes mais eficientes.

Dos trinta e oito isolados bacterianos submetidos à caracterização cultural, foram testadas a capacidade de formação de nódulos e produção de leghemoglobina. Trinta e sete isolados bacterianos não apresentaram formação de nódulos e somente com o isolado UFSM L1.3 foram observados nódulos vermelhos, tendo formado 5 nódulos grandes próximos ao colo das raízes, com tamanho variado entre 3 a 4 mm (Figura 6). A coloração vermelha no interior do nódulo formado por UFSM L1.3, em *L. albescens*, indica a produção de leghemoglobina (Figura 8). Esta substância é responsável pelo transporte de oxigênio no interior do nódulo, impedindo a inativação da nitrogenase (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). As estirpes SEMIA 938 e SEMIA 928 não foram simbiotes a *L. albescens*, demonstrando a necessidade de se isolar estirpes de rizóbios nativos que sejam eficientes para esta espécie vegetal.

Relatos encontrados na literatura correlacionam o tamanho do nódulo com a sua eficiência na fixação biológica de nitrogênio. Anyango *et al.* (1995), avaliaram a capacidade de formação de nódulos de isolados obtidos a partir de feijoeiro no Quênia. Estes autores constataram que os nódulos ineficientes eram brancos, pequenos, com aproximadamente 1mm de diâmetro e em grande quantidade, enquanto que os isolados eficientes eram os que formavam nódulos vermelhos, maiores, em torno de 3 mm e em menor número.

Em trabalho com a variedade de feijoeiro “Limburgse vroege”, em solos tropicais brasileiros, os nódulos grandes, esféricos e pigmentados apresentaram maior capacidade de fixação biológica de nitrogênio em comparação com nódulos brancos que variaram em tamanho e forma (Michiels *et al.* 1998).

Os isolados UFSM L3.3, UFSM L3.5 e UFSM L3.6 foram obtidos a partir de *Lupinus* sp. e sua inoculação em *Lupinus albescens* não proporcionou a formação

de nódulos. Este resultado pode indicar uma especificidade entre os isolados bacterianos e *Lupinus* sp. No entanto testes de inoculação são necessários para confirmar a simbiose entre os isolados UFSM L3.3, UFSM L3.5 e UFSM L3.6 e esta espécie de trevoço.

Os demais isolados que não foram simbiotes a *L. albescens* devem ser inoculados em outras espécies de leguminosas e estudos taxonômicos mais aprofundados.

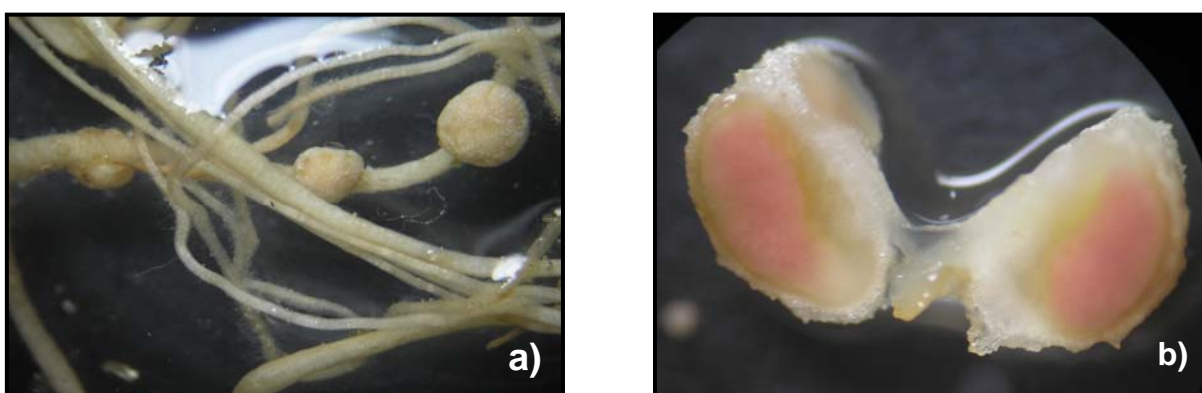


Figura 8 – Nódulo em *Lupinus albescens* (isolado UFSM L1.3) aos 60 dias. a) Nodulação positiva; b) Produção de leghemoglobina.

4.3 Caracterização do gênero de uma estirpe de rizóbio isolada de *Lupinus albescens*

A caracterização cultural apresenta informações relevantes para a alocação de uma estirpe em determinado gênero de rizóbio (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Para uma aproximação do gênero, as características culturais do isolado UFSM L1.3 e SEMIA 938 foram comparadas com 21 estirpes tipo de rizóbio através de análise de similaridade (Figura 9).

O isolado de rizóbio UFSM L1.3 apresentou aproximadamente 95% de similaridade com o grupo formado por estirpes de *Bradyrhizobium* (*Bradyrhizobium japonicum* ATCC10324, *Bradyrhizobium liaoningense* 2281, *Bradyrhizobium*

yuanmingense CCBAU 10071 e *Bradyrhizobium* sp. 938), tendo a coloração de colônia creme como sendo a característica que divergiu deste grupo (Tabela 7). As duas estirpes tipo de *Azorhizobium* (*Azorhizobium caulinodans* ORS 571 e *Azorhizobium dobereineriae* UFLA 1-100) apresentaram 78% de similaridade com o grupo formado por *Bradyrhizobium* e UFSM L1.3, tendo como diferença o tempo de crescimento rápido a intermediário (3 a 4 dias). As estirpes de *Rhizobium* e *Sinorhizobium* apresentaram agrupamento distintos com o grupo *Bradyrhizobium* e UFSM L1.3, tendo muito baixa similaridade.

O comportamento das estirpes de *Mesorhizobium* foi intermediária aos grupos de estirpes tipo *Bradyrhizobium* (considerando UFSM L1.3) e *Rhizobium*, onde *Mesorhizobium amorphae* ACCC 19665, *Mesorhizobium septentrionale* SDW 014, *Mesorhizobium loti* NZP 2213 e *Mesorhizobium chacoense* CECT 5336 foram mais similares aos grupos de *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium*, e *Mesorhizobium plurifarum* ORS 1032 apresentou maior similaridade com *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (Figura 8). O gênero *Mesorhizobium* foi proposto para agrupar bactérias que apresentavam características que eram comuns aos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* (YOUNG, 1996).

Todas as estirpes tipo do gênero *Rhizobium* apresentaram 95% de similaridade com *Sinorhizobium*, com exceção de *Rhizobium undicula* ORS 992. A distinção destes dois gêneros só é possível com testes de taxonomia polifásica, como os realizados por Chen *et al.* (1988) e por de Lajudie *et al.* (1994).

A coloração creme apresentada pelo isolado de rizóbio UFSM L1.3 não é característico do gênero *Bradyrhizobium*. Segundo o *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, o gênero *Bradyrhizobium* apresenta colônias opacas, eventualmente translúcidas ou brancas (HOLT *et al.*, 1994). No entanto, esta coloração já foi descrita para estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de Sitrato na Amazônia e de Acácia no Kenia (LIMA *et al.*, 2005; ODEE *et al.*, 1997).

O gênero *Bradyrhizobium* vem sendo relatado como sendo simbiote a *Lupinus*. Barrera *et al.* (1997), estudando a diversidade de 41 bactérias que nodulam quatro espécies de *Lupinus*, encontraram alta relação filogenética com *Bradyrhizobium elkani*. Vielma *et al.* (1999) caracterizaram fenotipicamente e a capacidade de nodulação e determinaram a produção de matéria seca de 5 estirpes nativas de *Bradyrhizobium* sp. (*Lupinus*), isoladas de *L. mutabilis* e *L. meridanus*.

Bottomley *et al.* (1994) estudaram a composição da população de rizóbio em pastagens nos Estados Unidos, avaliaram duas espécies de *Lupinus*. Estes autores encontraram três grupos que apresentaram relação filogenética com *B. japonicum* e *B. elkanii*. Desta maneira, a estirpe de rizóbio UFSM L1.3 pode ser alocada em *Bradyrhizobium*, por apresentar características culturais semelhantes a este gênero.

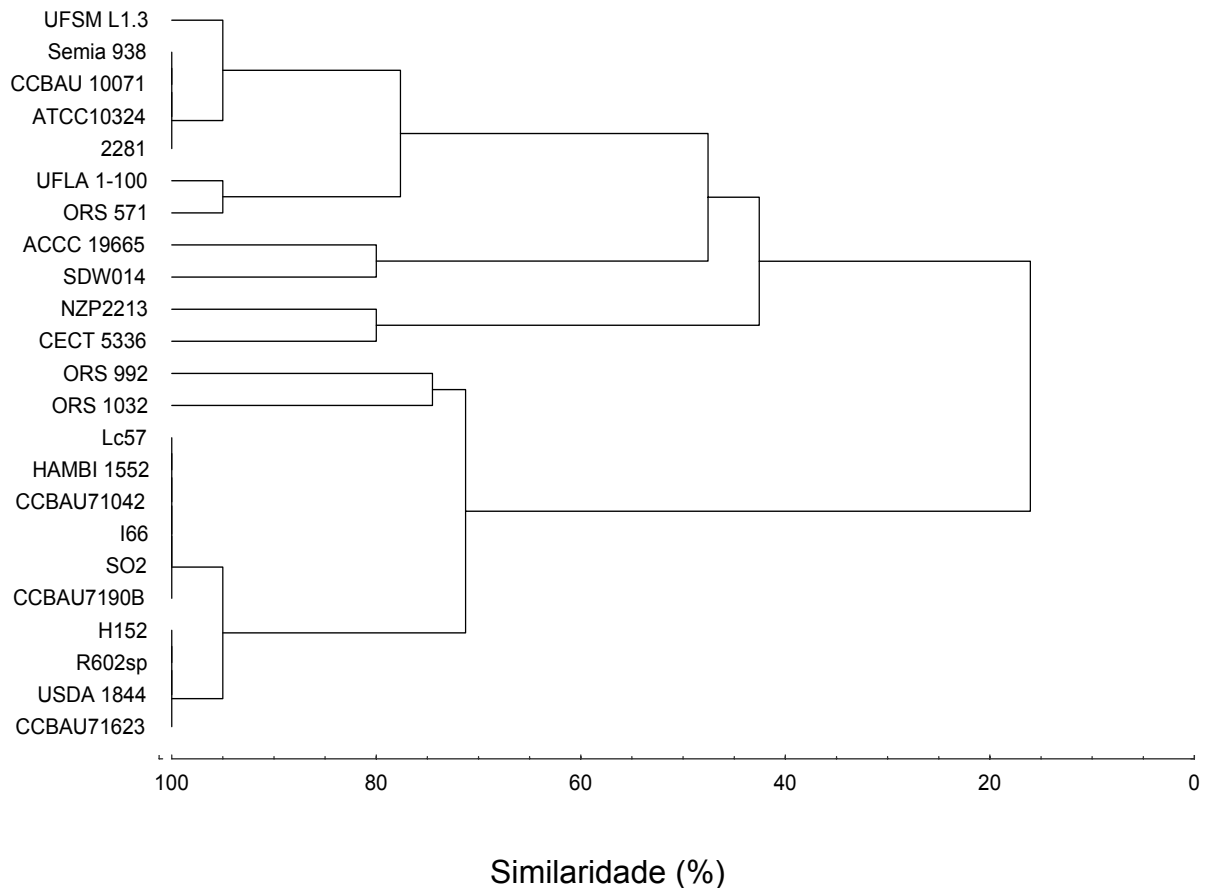


Figura 9 – Dendrograma de similaridade baseado em características culturais entre um isolado de *Lupinus albescens* (UFSM L1.3), uma estirpe recomendada para *Lupinus* (SEMIA 938) e 21 estirpes-tipo de rizóbio (Tabela 4).

Tabela 7 – Características culturais de um isolado de *Lupinus albus* e de 22 estirpes de rizóbio, Santa Maria, 2007.

| Espécie | Características Culturais | | | | |
|---------------------------------------|---------------------------|--------|---------|---------|------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| UFSM L1.3 | 6 | Básico | 1 | Creme | Baixa |
| <i>Bradyrhizobium</i> sp. (SEMIA 938) | 6 | Básico | 1 | Branca | Baixa |
| <i>Azorhizobium caulinodans</i> | 3 a 4 | Básico | 0,5 | Creme | Baixa |
| <i>Azorhizobium dobereineriae</i> | 3 a 4 | Básico | 1 | Incolor | Baixa |
| <i>Bradyrhizobium japonicum</i> | 7 | Básico | < 1,0 | Branca | Baixa/Seca |
| <i>Bradyrhizobium liaoningense</i> | 7 a 10 | Básico | < 1,0 | Branca | Baixa |
| <i>Bradyrhizobium yuanmingense</i> | 7 | Básico | < 1,0 | Branca | Baixa |
| <i>Mesorhizobium amorphae</i> | 7 | Ácido | 1 | Incolor | Média |
| <i>Mesorhizobium chacoense</i> | 7 | Ácido | 1 a 3 | Branca | Média |
| <i>Mesorhizobium loti</i> | 3 a 5 | Ácido | 2 a 4 | Branca | Média |
| <i>Mesorhizobium plurifarum</i> | 2 a 3 | Ácido | 0,5 a 2 | Branca | Média |
| <i>Mesorhizobium septentrionale</i> | 7 a 10 | Ácido | 1 | Incolor | Média |
| <i>Rhizobium huautlense</i> | 2 a 4 | Ácido | 3 | Creme | Alta |
| <i>Rhizobium gallicum</i> | 2 a 3 | Ácido | 3 | Branca | Alta |
| <i>Rhizobium giardinii</i> | 2 a 3 | Ácido | 3 | Branca | Alta |
| <i>Rhizobium hainanense</i> | 3 | Ácido | 2,5 | Creme | Alta |
| <i>Rhizobium lossense</i> | 3 | Ácido | 2,5 | Creme | Alta |
| <i>Rhizobium mongolense</i> | 3 | Ácido | 2,5 | Branca | Alta |
| <i>Rhizobium undicula</i> | 1 a 2 | Ácido | 0,5 - 3 | Creme | Alta |
| <i>Rhizobium yanglingense</i> | 3 | Ácido | 2,5 | Branca | Alta |
| <i>Sinorhizobium arboris</i> | 2 a 4 | Ácido | 3 | Creme | Alta |
| <i>Sinorhizobium kostiense</i> | 2 a 4 | Ácido | 3 | Creme | Alta |
| <i>Sinorhizobium kummerowiae</i> | 2 | Ácido | 2,5 | Creme | Alta |
| <i>Sinorhizobium morelense</i> | 3 | Ácido | 2 | Creme | Alta |

1: Tempo, em dias, para a visualização das colônias; 2: Alteração do pH do meio; 3: Diâmetro da colônia (mm); 4: Coloração das colônias; 5: Produção de goma. ORS 571: *Azorhizobium caulinodans* (DREYFUS et al.; 1988); UFLA 1-100: *Azorhizobium dobereineriae* (MOREIRA et al.; 2006); ATCC10324: *Bradyrhizobium japonicum* (JORDAN et al.; 1984); 2281: *Bradyrhizobium liaoningense* (XU et al.; 1995); CCBAU 10071: *Bradyrhizobium yuanmingense* (YAO et al.; 2002); ACCC 19665: *Mesorhizobium amorphae* (WANG et al.; 1999); CECT 5336: *Mesorhizobium chacoense* (VELAZQUEZ et al.; 2001); NZP2213: *Mesorhizobium loti* (JARVIS et al.; 1997); ORS 1032: *Mesorhizobium plurifarum* (de LAJUDIE et al.; 1998b); SDW014: *Mesorhizobium septentrionale* (GAO et al.; 2004); R602sp: *Rhizobium gallicum* (ARMAGER et al.; 1997); H152: *Rhizobium giardinii* (ARMAGER et al.; 1997); I66: *Rhizobium hainanense* (CHEN et al.; 1997); CCBAU7190B: *Rhizobium lossense* (WEI et al.; 2003); CCBAU71623: *Rhizobium yanglingense* (TAN et al.; 2001); SO2: *Rhizobium huautlense* (WANG et al.; 1998); USDA 1844: *Rhizobium mongolense* (van BERKUN et al.; 1998); ORS 992: *Rhizobium undicula* (de LAJUDIE et al.; 1998); HAMB1 1552: *Sinorhizobium arboris* (NICK et al.; 1999); CCBAU71042: *Sinorhizobium kummerowiae* (WEI et al.; 2002); LC57: *Sinorhizobium morelense* (WANG et al.; 2002).

4.4 Caracterização fisiológica

A capacidade de crescer em diferentes pH, concentrações de NaCl e temperatura permitiu a diferenciação das estirpe de rizóbio UFSM L1.3 e SEMIA 938 (Tabela 8).

As duas estirpes avaliadas apresentaram crescimento em meio líquido entre os pH 4,0 a 8,0, no entanto, uma menor turbidez no meio de cultura foi observado para UFSM L1.3 quando inoculado em meio mais ácido (pH 4,0) e mais alcalino (pH 8,0), não ocorrendo crescimento em pH 9,0 e 10,0. Segundo Moreira *et al.* (1994), estirpes isoladas de solos ácidos mostram-se mais adaptadas a condições de pH mais baixo em meio de cultura do que isolados de solos mais básicos. No entanto, alguns autores vêm relatando que a concentração de Alumínio nos solos pode ser um fator mais significativo na sobrevivência dos rizóbios em solos ácidos (HARA & OLIVEIRA, 2004). Os solos em processo de arenização apresentam pH próximo a 5,0 tendo teores de alumínio de até $0,5 \text{ cmol}_c \text{ L}^{-1}$ e com uma saturação por Al de 70% (ROVEDDER, 2003). Desta maneira, é indicado que as estirpes de rizóbio selecionadas sejam adaptadas a esta condição de meio.

As duas estirpes diferiram na capacidade de crescer em diferentes concentrações de NaCl, onde UFSM L1.3 apresentou resultado positivo somente na concentração de 0,1%. A capacidade de crescer em concentrações mais altas de NaCl é observada geralmente para estirpes de crescimento rápido, devido a maior produção de polissacarídeos extracelulares que envolvem as células bacterianas, diminuindo o contato com o meio e proporcionando maior resistência da célula ao efeito osmótico (El SHEIKH, 1988; ODEE *et al.*, 1997). O efeito de salinidade não é relatado nos núcleos de arenização, sendo esta provavelmente uma característica não limitante para o uso de UFSM L1.3 na inoculação de *L. albescens*.

Tabela 8 – Crescimento de duas estirpes de rizóbio em diferentes pH, concentrações de NaCl e temperatura em meio líquido LMA. Santa Maria, 2007.

| Característica Fisiológica | UFSM L1.3 | SEMIA 938 |
|----------------------------|-----------|-----------|
| pH | | |
| 4 | +/- | + |
| 5 | + | + |
| 6 | + | + |
| 7 | + | + |
| 8 | +/- | +/- |
| 9 | - | - |
| 10 | - | - |
| NaCl (%) | | |
| 0,1 | + | + |
| 0,5 | - | + |
| 1,0 | - | - |
| 5,0 | - | - |
| 10,0 | - | - |
| Temperatura (C°) | | |
| 28 | + | + |
| 32 | + | + |
| 37 | - | - |
| 40 | - | - |

+: crescimento positivo; -: crescimento negativo; +/-: pouca turbidez

Rovedder (2003), avaliou a temperatura do solo em diferentes profundidades em áreas com ocorrência de areal, registrando temperaturas de 22°C de 0 a 3 cm de profundidade no mês de maio de 2002. A temperatura pode afetar estádios importantes da infecção, formação e função dos nódulos, no entanto, estes efeitos podem variar de acordo com a espécie hospedeira e microsimbionte (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Desta maneira, a estirpe de rizóbio UFSM L1.3, que apresentou crescimento entre 28 e 32°C, pode ser inoculada em sementes de *Lupinus albus*. Para um melhor entendimento deste mecanismo nesta espécie vegetal, são necessários mais estudos relacionados com a estirpe isolada e as condições de campo.

4.5 Caracterização molecular

Diversos estudos de determinação das relações genéticas entre estirpes de rizóbio têm empregado a amplificação do DNA pela técnica de PCR com oligonucleotídeos específicos, como as seqüências REP, ERIC e BOX, que codificam as regiões altamente conservadas, normalmente no espaço intergênico (LAGUERRE *et al.*, 1997; HUNGRIA *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 1999; MostaSso *et al.*, 2002). A principal vantagem no uso destes oligonucleotídeos específicos, é de que em uma única reação, pode se obter um número elevado de bandas, permitindo a detecção de polimorfismo para a caracterização molecular dos isolados (CHUEIRE *et al.*, 2000b).

Pela análise de BOX-PCR, constatou-se que os isolados apresentaram perfis únicos de bandas, ocorrendo a maior semelhança para as estirpes SEMIA 938 e 928 recomendadas para o cultivo de tremoço (Figura 10 e 11). As estirpes recomendadas para o cultivo de tremoço, pelo baixo grau de polimorfismo constatado, podem representar a mesma estirpe, conforme relatado quanto a estirpes de soja pertencentes a sorogrupos norte-americanos (JUDD *et al.*, 1993), a estirpes de rizóbios isoladas do cerrado brasileiro (HUNGRIA *et al.*, 1998; SANTOS *et al.*, 1999) e estirpes de rizóbio nativo dos tabuleiros costeiros de Sergipe (FERNANDES *et al.*, 2003).

O BOX-PCR realizado com os seis isolados bacterianos de *Lupinus spp.*, permitiu uma diferenciação no padrão do polimorfismo gerado em gel de agarose (Figura 10). A região do espaço intergênico do isolado bacteriano UFSM L1.3 apresenta três bandas distintas com tamanho aproximado de 3000, 1455 e 600 pares de bases. Este padrão não foi verificado em nenhum dos outros isolados bacterianos estudados. O isolado bacteriano UFSM 1p apresenta duas bandas características com 3000 e 600 pares de base (Figura 10), e UFSM 2p gerou várias bandas com tamanhos variando de 4200 a 564 pares de base. A estirpe de *Rhizobium sp* apresenta um padrão de quatro bandas bem características com o tamanho aproximado de 4200, 1900, 1455 e 1264 pares de base. O polimorfismo

gerado pela técnica de BOX-PCR permite a caracterização molecular entre os isolados.

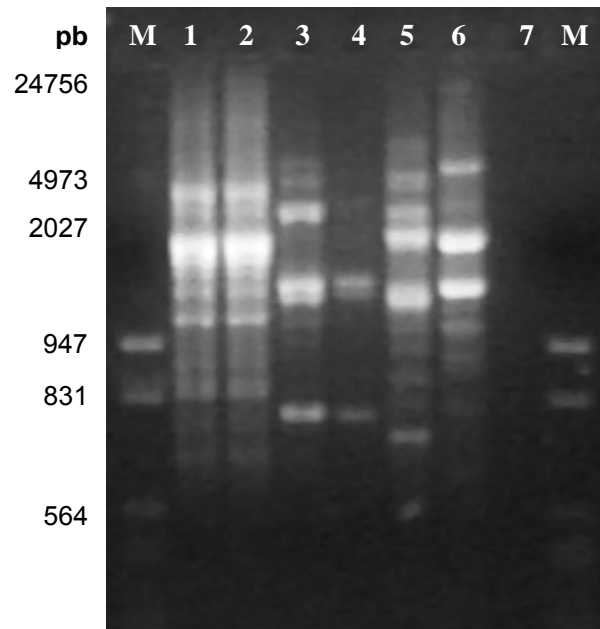


Figura 10 – Padrão de polimorfismo gerado por BOX-PCR. 1. *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA 938). 2. *Bradyrhizobium* sp. (SEMIA 928). 3. UFSM L1. 3. 4. 1p. 5. 2p. 6. *Rhizobium* sp. 7. Sem DNA. M. Marcador: DNA de Lambda clivado com EcoRI + HindIII.

Por meio da análise que utilizou o agrupamento de UPGMA, dois grandes grupos foram formados com baixa similaridade genética, mas não houve relação entre os agrupamentos obtidos e as espécies de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* (Figura 11). Os resultados deste estudo demonstram que a análise de BOX-PCR foi eficiente para discriminá-las, embora nem sempre sejam adequadas nas avaliações filogenéticas (LAGUERRE *et al.*, 1997; BANGEL, 2000; FERNANDES *et al.*, 2003; CHUEIRE *et al.*, 2000b).

Para uma melhor caracterização e identificação do isolado UFSM L1.3, está sendo realizada a etapa de seqüenciamento da região 16S do DNA ribossômico.

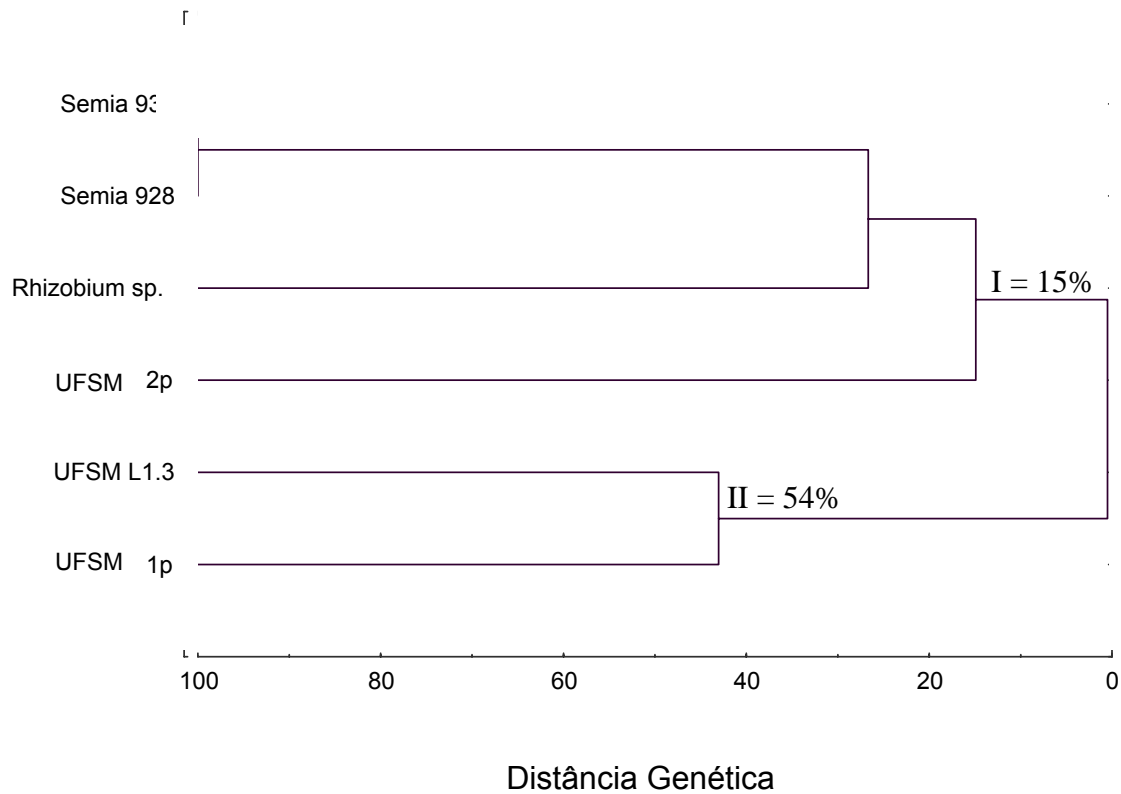


Figura 11 – Dendrograma genético de três isolados de *Lupinus albescens* comparados a duas estirpes de *Bradyrhizobium* sp recomendadas para tremoço e uma estirpe de *Rhizobium* sp., após análise de agrupamento dos fragmentos obtidos pela amplificação do DNA por PCR com o oligonucleotídeo específico BOX-A1R. Análise realizada com o algoritmo UPGMA e o coeficiente de Pearson. Santa Maria, 2007.

4.6 Avaliação da eficiência simbiótica relativa

O estudo da eficiência na fixação biológica de nitrogênio vem sendo realizado em diversos trabalhos, para selecionar estirpes potenciais para o desenvolvimento de inoculantes (CARVALHO *et al.*, 2005; ZILLI *et al.*, 2006; MELLONI *et al.*, 2006). A relação das médias obtidas de massa seca da parte aérea, nitrogênio na parte

aérea, eficiência simbiótica, massa seca das raízes e número de nódulos permitiu caracterizar as estirpes bacterianas UFSM L1.3 e SEMIA 938 (Tabela 9 e Figura 11)

A massa seca da parte aérea foi maior para o isolado UFSM L1.3, não diferindo estatisticamente do tratamento nitrogenado, apresentando aproximadamente 40% a mais de massa seca em comparação com SEMIA 938 (Tabela 9). A estirpe recomendada para *Lupinus* (SEMIA 938) não diferiu do tratamento sem nitrogênio (Tabela 8).

A avaliação do teor de nitrogênio total na parte aérea de *L. albescens* demonstrou que o isolado UFSM L1.3 foi semelhante ao tratamento com nitrogênio, tendo uma concentração de 3,19 %, apresentando uma eficiência simbiótica relativa de 94,2%. No entanto, SEMIA 938 apresentou médias semelhantes ao tratamento sem nitrogênio, com uma concentração de 2,42%, representando que esta estirpe não é capaz de fixar nitrogênio quando em simbiose com *Lupinus albescens* (Figura 11). Concentrações de nitrogênio superiores a 3,0% na parte aérea vem sendo relatada para estirpes eficientes de *Bradyrhizobium*. Segundo Lima *et al.* (2005), isolados de *Bradyrhizobium* de diferentes solos da Amazônia que apresentaram uma eficiência simbiótica próxima a 100%, obtiveram uma concentração de nitrogênio superior a 3,0%.

A estirpe isolada de *L. albescens* apresentou a maior produção de matéria seca nas raízes, sendo que SEMIA 938 foi semelhante ao tratamento sem adição de nitrogênio. Este resultado pode ser explicado pela formação dos nódulos, somente encontrados em UFSM L1.3 e o maior desenvolvimento das raízes de *L. albescens* (Tabela 9).

Segundo Rovedder *et al.* (2005), a espécie de tremoço evoluiu paralelamente aos processos pedogenéticos e climáticos que formaram a paisagem atual da Campanha Gaúcha. As etapas para formação dos nódulos dependem e variam em função dos genótipos da planta e das estirpes envolvidas, assim como fatores ambientais (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006). Desta maneira, as condições edafoclimáticas encontradas na Campanha Gaúcha, poderiam ter contribuído para a seleção de estirpes de rizóbio simbiotes a espécie *L. albescens*. A não formação de nódulos e conseqüentemente a baixa eficiência na fixação biológica de nitrogênio de SEMIA 938 em *L. albescens* pode estar relacionada a sua origem, sendo que esta estirpe foi isolada de *L. albus* nos Estados Unidos (MENNA *et al.*, 2006).

Tabela 9 – Massa seca da parte aérea (MSPA), nitrogênio na parte aérea (NPA), eficiência simbiótica (Efra), massa seca das raízes (MSR) e número de nódulos (NN) do isolado UFSM L1.3 e da estirpe SEMIA 938. Santa Maria, 2007.

| Tratamento | MSPA -- mg planta ⁻¹ -- | NPA -- % -- | MSR -- mg planta ⁻¹ -- | NN |
|------------|---------------------------------------|----------------|--------------------------------------|----|
| UFSM L1.3 | 135 a ¹ | 3,19 a | 70 a | 4 |
| SEMIA 938 | 80 b | 2,42 b | 33 c | 0 |
| C/N | 118 a | 3,24 a | 44 b | 0 |
| S/N | 95 b | 2,38 b | 37 c | 0 |
| C.V. (%) | 12,45 | 11,19 | 8,71 | |

¹ Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro. C/N – com nitrogênio. S/N – sem nitrogênio.

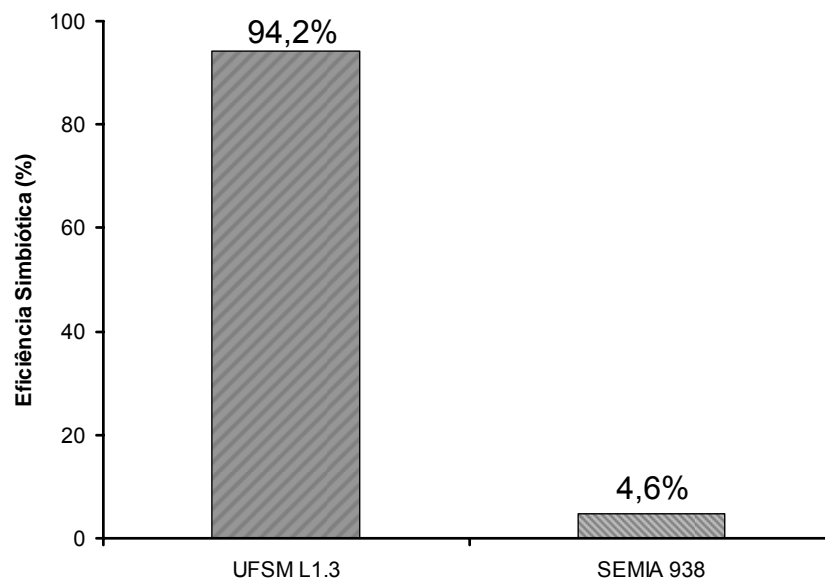


Figura 12 – Eficiência simbiótica relativa de isolado de rizóbio de *Lupinus albuscens* (UFSM L1.3) e de estirpe comercial recomendada para *Lupinus* (SEMIA 938). Santa Maria, 2007.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nesse trabalho permitem concluir que:

- a) Onze grupos com características fenotípicas semelhantes foram encontrados de 38 isolados bacterianos da região sudoeste do Estado do Rio Grande do Sul.
- b) O isolado UFSM L1.3 produziu nódulos e leghemoglobina em *Lupinus albus*, apresentou a capacidade de crescer em temperatura de 28 e 32°C, na concentração de NaCl de 0,1% e na faixa de pH 4,0 a 8,0.
- c) O padrão de polimorfismo gerado pelo oligonucleotídeo BOX-PCR permitiu diferenciar o isolado UFSM L1.3 dos demais estudados.
- d) *Lupinus albus* não formou associação simbiótica com a estirpe comercial SEMIA 938.
- e) A estirpe UFSM L1.3 apresentou uma eficiência simbiótica relativa de 94,2% na fixação biológica de nitrogênio.

6 SUGESTÕES PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVAS PESQUISAS

Os resultados alcançados nesta pesquisa, em conformidade com o estado atual do conhecimento, permitem fazer as seguintes sugestões à continuidade do trabalho:

- a) Identificar os isolados de três espécies de *Lupinus* ainda não caracterizados a fim de selecionar estirpes promissoras para produção de inoculante a nível comercial.
- b) Seqüenciar a região 16S do RNAr do isolado de rizóbio UFSM L1.3 para estudos de filogenia.
- c) Seqüenciar as regiões *nif* e *nod* do isolado UFSM L1.3 para possibilidade de entendimento das relações entre bactéria e planta.
- d) Obter maior número de isolamentos a fim de aumentar o banco de rizóbio associado a *Lupinus albescens*, *Lupinus lanatus* e *Lupinus* sp.
- e) Caracterizar a variabilidade ecológica de rizóbio encontrados em solo e plantas de *Lupinus albescens*, *Lupinus lanatus* e *Lupinus* sp. em áreas degradadas da região sudoeste do Estado do Rio Grande do Sul.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AB'SABER, A. N. A revanche dos ventos. Derruição de solos areníticos e formação de areais na Campanha Gaúcha. **Ciência e Ambiente**, v. 11, p. 7-31, 1995.

ANYANGO, B., et. al. Diversity of rhizobia nodulation *Phaseolus vulgaris* L. in two kenyan soils with contrasting pHs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 11, p. 4016-4021, 1995.

ARAUJO, R. S. Caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica do rizóbio. In: HUNGRIA, M. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p. 21-43.

AMARGER, N. L.; MACHERET, V.; LAGUERRE, G. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov., from *Phaseolus vulgaris* Nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 4, p. 996-1006, 1997.

BANGEL, E. V. **Caracterização de estirpes SEMIA de *Bradyrhizobium* spp. recomendadas para a cultura da soja no Mercosul**. 2000. 115 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

BARRERA, L. L. et al. Biodiversity of *Bradyrhizobia* nodulating *Lupinus* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 4, p. 1086-1091, 1997.

BRASIL. Secretaria de defesa agropecuária: Instrução Normativa nº 10. **Diário oficial da união**. Seção 1, n. 58. 2006.

BOTTOMLEY, P. J.; CHENG, H. -H.; STRAIN, S. R. Genetic structure and symbiotic characteristics of a *Bradyrhizobium* population recovered from a pasture soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 6, p. 1754-1761, 1994.

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**, v. 6, p. 365-370, 1966.

CARVALHO, F. G.; SELBACH, P. A.; BIZARRO, M. J. Eficiência e competitividade de variantes espontâneos isolados de estirpes de *Bradyrhizobium* spp.

recomendadas para a cultura da soja (*Glycine max*). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 6, p. 883-891, 2005.

CHEN, W. M. et al. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, v. 51, n. 5, p. 1729-1735, 2001.

CHEN, W. X.; TAN, Z. Y.; GAO, J. L.; LI, Y.; WANG, E. T. *Rhizobium hainanense* sp. nov., isolated from tropical legumes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, v. 47, n. 3, p. 870-873, 1997.

CHEN, W. X.; YAN, G. H.; LI, J. L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, p. 392-397, 1988.

CHUEIRE, L. M. O.; BANGEL, E.; FERREIRA, M. C.; GRANGE, L.; CAMPO, R. J.; MOSTASSO, F. L.; ANDRADE, D. S.; PEDROSA, F. O. & HUNGRIA, M. **Classificação taxonômica, baseada na caracterização molecular, das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro**. Boletim de pesquisa, n. 3. EMBRAPA: Centro Nacional de Pesquisa de Soja, Londrina, 2000a. 32p.

CHUEIRE, L. M. O. et al; NISHI, C. Y. M., LOUREIRO, M. F.; HUNGRIA, M. Identificação das estirpes de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium* utilizadas em inoculantes comerciais para as culturas da soja e do feijoeiro pela técnica de PCR com “primers” aleatórios ou específicos. **Agricultura Tropical**, v. 4, n. 1, p. 80-95, 2000b.

CONN, H. J. Validity of the genus *Alcaligenes*. **Journal of Bacteriology**, n. 44, p. 353-360, 1942.

CONTERATO, I. F. **Estudos citogenéticos em espécies Americanas de *Lupinus L.***: Numero cromossômico e comportamento meiótico. 2004. 122f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

CORONADO, C.; SÁNCHEZ-ANDDÚJAR, B.; PALOMARES, A.J. Rhizobium extracellular structures in the symbiosis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n. 2, p. 127-136, 1996.

COWAN, S. T. **A dictionary of microbial taxonomic usage**. Edinburgh: Oliver & Boyd. 1968. p. 118.

DREYFUS, B.L.; GARCIA, J.L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov. s. nov., a stem nodulating nitrogen fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, n. 1, p. 89-98, 1988.

DELLAGLIO, F.; FELIS G. E.; GERMOND, J. Should names reflect the evolution of bacterial species? **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 279-81, 2004.

de LAJUDIE, P. et al. *Allorhizobium undicola* gen. nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, n. 4, p. 1277-1290, 1998a.

de LAJUDIE, P., WILLEMS, A., NICK, G. et al. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, n. 2, p. 369–382, 1998b

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

DOIGNON-BOURCIER, F. et al. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating small senegalese legumes by 16S-23S rRNA intergenic gene spacers and amplified fragment length polymorphism fingerprint analyses. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 9, p. 3987-3997, 2000.

ECKHARDT, M. M.; BALDWIN, I. L.; FRED, E. B. Studies of the root-nodule organism of *Lupinus*. **Journal of Bacteriology**, vol. 21, n. 4, p. 273-285, 1930.

EL SHEIKH, E. A. E.; WOOD, M. Salt effects on survival and multiplication of chickpea and soybean Rhizobia. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 22, n. 3, p. 343–347, 1988.

ELTZ, F. L. F. ; ROVEDDER, A.P.M. Revegetação e temperatura do solo em áreas degradadas no sudoeste do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.11, n. 2, p. 193-200, 2005.

EVERITT, B.S. **Cluster analysis**. New York, John Wiley, 1993. 170p.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M.; HUNGRIA, M. Caracterização genética de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros eficientes em culturas do guandu e caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 8, p. 908-920, 2003.

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

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 220p. (EMBRAPA-CENARGEN. Documentos, 20).

FRANK, B. Über die Pilzsymbiose der Leguminosen. **Ber. Dtsch. Bot. Ges**, v. 7, 332–346, 1889.

FRED, E. B.; BALDWIN, I. L.; McCOY, E. **Root nodule bacteria and leguminous plants**. Madison: University of Wisconsin, 1932. 132 p. Disponível em: <<http://digital.library.wisc.edu/1711.dl/HistSciTech.RootNodule>>. Acesso em: 05 dez. de 2006.

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

GAO, J. L. et al. *Mesorhizobium septentrionale* sp. nov. and *Mesorhizobium temperatum* sp. nov., isolated from *Astragalus adsurgens* growing in the northern regions of China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 2003-2012, 2004.

GIONGO, A. **Diversidade de rizóbios nativos que nodulam feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) isolados de áreas de campo nativo sob diferentes adubações**. 2003. 83f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

GOLVEIA, R. F.; ALMEIDA, D. L. **Avaliação das características agronômicas de sete adubos verdes de inverno no município de Paty de Alferes (RJ)**. Comunicado Técnico: EMBRAPA, n. 20, 1997, 17 p.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazônica**, v. 32, n. 2, p. 343-357, 2004.

HICKMANN, C. et al. Eficiência do *Lupinus albescens* H. et Arn. e *Secale cereale* L. para recuperação de solos arenizados do Sudoeste do Rio Grande do Sul. In: XX Jornada Acadêmica Integrada, UFSM. **Anais...UFSM**. 2005.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R. Enrichment and isolation. In: GERHARDT, P.; MURRAY, R. G. E.; WOOD, W. A., KRIEG, N. R. **Methods for general and molecular bacteriology**. Washington: American Society for Microbiology. 1994. p. 714.

HÜBNER, A. P. **Identificação de bactérias diazotróficas endofíticas do grupo bacillus associadas a raízes de plantas de arroz irrigado**. 2004. 119f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B. M.; PACE, N. Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 18, p. 4765 – 4774, 1998.

HUNGRIA, M. et al. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, n. 11/12, p. 1515-1528, 2000.

HUNGRIA, M. et al. Nitrogen fixation capacity and nodule occupancy by *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains. **Biology and Fertility of Soils**, v. 27, p. 393-399, 1998.

HUNGRIA, M. Coleta de nódulos e isolamento de rizóbios. In: HUNGRIA, M. ARAUJO, R. S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: Embrapa, 1994. Cap. 2, p. 45-59.

GRAHAM, P.H. et al. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 41, n. 4, p. 582-587, 1991.

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

JARVIS, B. D. W.; TIGHE, S. W. Rapid identification of *Rhizobium* based on cellular fatty acid analysis. **Plant and Soil**, v. 161, n. 1, p. 31-41, 1994.

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

JORDAN, D. C. Family III Rhizobiaceae. CONN. 1938. In: KRIEG, N.R., ed. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. p. 234-256.

JOURAND, P. et al. *Methylobacterium nodulans* sp. Nov., for a group of aerobic, facultatively methylotrophic, legume root-nodule-forming and nitrogen-fixing bacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, v. 54, n. 6, p. 2269-2273, 2004.

JUDD, A. K. et al. Use of repetitive sequences and the polymerase technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 6, p. 1702-1708, 1993.

KAY, H. E. et al. The identification of *Bradyrhizobium japonicum* strains isolated from Italian soils. **Microbiology**, v.140, n. 9, p.2333-2339, 1994.

LAGUERRE, G. et al. Genetic diversity of rhizobial symbionts isolated from legume species within the genera *Astragalus*, *Oxytropis*, and *Onobrychis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 12, p. 4748-4758, 1997.

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

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

LIU, J.; WANG, E. T.; CHEN, W. X. Diverse rhizobia associated with woody legume *Wisteria sinensis*, *Cercis racemosa* and *Amorpha fruticosa* grown in the temperate zone of China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, v. 55, n. 5, p. 1762-1770, 2005.

LUDWIG, W. et al. Complete 23S ribosomal RNA sequences of gram-positive bacteria with a low DNA G+C content. **Systematic and Applied Microbiology**, Stuttgart, v. 15, p. 487-501, 1992.

MARTIN, R.; HUMBERT, O.; CAMARA, M. et al. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, v. 20, p. 3479-3483, 1992.

MARTINS, L. M. V. et al. **Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de "Rizóbio"**. Comunicado Técnico: EMBRAPA, n. 19, 1997, 14 p.

MARTINEZ-ROMERO, E. Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. **Plant and Soil**, v.161, n. 1, p.11-20, 1994.

MENNA, P. et al. Molecular phylogeny based on the 16S rRNA gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 4, p. 315-332, 2006.

MELLONI, R. et al. O. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, n. 30, p. 235-246, 2006.

MICHIELS, J. et al. *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. **Microbial Ecology**, v.26, n. 3, p. 193-205, 1998.

MILLER, M. S.; PEPPER, I. L. Survival of a fast-growing strain of lupin rhizobia in Sonoran Desert soils. **Soil Biology Biochemistry**, v. 20, n. 3, p. 323-327, 1988.

MOSTASSO, L. et al. Selection of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, v. 73, n. 2, p. 121-132, 2002.

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

MOREIRA, F. M. S. et al. *Azorhizobium doebereineriae* sp. nov. microsymbiont of *sesbania virgata* (Caz.) Pers. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 197-206, 2006.

MOREIRA, F. M. S. Fixação biológica do nitrogênio em espécies arbóreas. In: ARAÚJOM R. S.; HUNGRIA, M. **Microorganismos de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA, 1994. 121-150.

MOREIRA, F. M. S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERS, K.; FRANCO, A. A. Characterization of rhizobia isolate from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total proteins. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 135-146, 1993.

MURRAY, R. G.; DOETSCH, R. N.; ROBINOW, C. F. Determinative and cytological light microscopy. In: GERHARDT, P.; MURRAY, R. G. E.; WOOD, W. A., KRIEG, N. R. **Methods for general and molecular bacteriology**. Washington: American Society for Microbiology. 1994. p. 21-40.

NEVES, M. C. P. & RUMJANEK, G. Ecologia de Bactérias Diazotróficas de Solos Tropicais. In: **Ecologia Microbiana**. Eds. Melo, I. S.; Azevedo, J. L., Jaguariúna, EMBRAPA – CNPMA. 1998. p. 15-60.

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

NISCHI, C. Y. M. Identificação sorológica de *Bradyrhizobium/Rhizobium*. In: HUNGRIA, M. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p. 171-179.

ODEE, D. W. et al. Phenotypic characteristics and composition of rhizobia associated with woody legumes growing in diverse Kenyan conditions. **Plant and Soil**, v. 188, n. 1, p. 65-75, 1997.

PELCZAR jr, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2ed. Rio de Janeiro: Makron Books do Brasil, 1997.

PIAZA, G. **Identificação molecular de bactérias de solo cultivado de Campo Belo do Sul (SC) capazes de nodular feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

PINHEIRO, M.; MIOTTO, S. T. S. **Leguminosae-Faboideae, gênero *Lupinus* L.** Boletim do Instituto de Biociências. Botânica, p. 1-100. 2001

PLANCHUELO, A. M.; DUNN, D. The simple leaved lupines and their relatives in Argentina. **Annual Missouri Botanic Gard**, v. 71, n. 1, p. 90-103, 1984.

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

ROSSATO, R. R. **Potencial de ciclagem de nitrogênio e potássio pelo nabo forrageiro intercalar ao cultivo de milho e trigo sob plantio direto**. 2004. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2004.

ROVEDDER, A. P. et al. Potencial para ciclagem de nitrogênio do *Lupinus albus* em Neossolo Quaternário degradado: acúmulo na parte aérea e caracterização da estirpe bacteriana. In: 30º Congresso Brasileiro de Ciência do Solo. **Anais...**, Recife, PE, 2005. CD-ROM.

ROVEDDER, A. P. et al. Produção de fitomassa e conteúdo de nitrogênio de *Lupinus albus* H. et Arn.: Nova alternativa para a recuperação de solos arenizados no sudoeste gaúcho. In: 5º Reunião Sul-Brasileira de Ciência do Solo. **Anais...**, Florianópolis, Santa Catarina, 2004. CD-ROM.

ROVEDDER, A. P. et al. Eficiência da revegetação na redução do transporte eólico de partículas em áreas degradadas no sudoeste gaúcho. In: 29º Congresso Brasileiro de Ciência do Solo. **Anais...**, Ribeirão Preto, São Paulo, 2003. CD-ROM.

ROVEDDER, A. P. M. **Revegetação com culturas de cobertura e espécies florestais para a contenção do processo de arenização em solos areníticos no sudoeste do Rio Grande do sul**. 2003. 120f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

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

SÁ, N. M. H. et al. Selection and characterization of *Rhizobium* spp strains stable and capable in fixing nitrogen in bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista de Microbiologia**, v. 24, n. 1, p. 28-48, 1993.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual**. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

SANTOS, M. T. P. **O gênero *Lupinus* L. (Leguminosae-Faboideae) no Rio Grande do Sul, Brasil**. 2000. 120f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

SANTOS, M. A.; VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Characterization of soybean bradyrhizobia strains adapted to the Brazilian cerrados region. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 30, p. 261-272, 1999.

SELENSKA-POBELL, S. et al. Characterization of *Rhizobium* 'hedysari' by RFLP analysis of PCR amplified rDNA and by genomic PCR fingerprinting. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 80, n. 5, p. 517-528, 1996.

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

SOUTO, J. J. **Deserto, uma ameaça?** Porto Alegre, Secretaria da Agricultura. 1984. 169p.

SOMASEGARAM, P.; HOBEN, J.H. **Methods in legume-Rhizobium technology**, Hawaii: Niftal, 1985. p. 54-63.

SPRENT, J. I.; SPRENT, P. **Nitrogen fixing organisms: pure and applied aspects**. 2° ed. University Press, Cambridge. 1990. p. 256.

STATISTICA, **Statistica for Windows Release 4.5**. Stasoft-Inc. 1993.

SUERTEGARAY, D. M. A. **A trajetória da natureza: um estudo geomorfológico sobre as areias de Quaraí, RS**. 1987. 243p. Tese (Doutorado em Geografia Física) – Curso de Pós-graduação em Geomorfologia. Universidade de São Paulo, São Paulo.

SUERTEGARAY, D. M. A. **Deserto grande do sul: controvérsia**. 2° ed. Porto Alegre, UFRGS, 1998. 130 p.

SUERTEGARAY, D. M. A. et al. **Projeto arenização no Rio Grande do Sul, Brasil: Gênese, dinâmica e espacialização**. Revista Bibliográfica de Geografia y Ciências Sociales, n. 287, 2001. Universidade de Barcelona. Disponível em: <<http://www.ub.es/geocrit/b3w-287.htm>>. Acesso em 25 de abril de 2006.

SWELIM, D.M. et al. Host specificity and phenotypic diversity of *Rhizobium* strains nodulating *Leucaena*, *Acacia* and *Sesbania* in Egypt. **Biology and Fertility of Soils**, v. 25, n. 3, p. 224-232, 1997.

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

TAN, Z. Y. et al. Phylogenetic and genetic relationships of *Mesorhizobium tianshanense* and related rhizobia. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 3, p. 874-879, 1997.

TAN, I. K. P.; BROUGHTON, W. J. Rhizobia in tropical legumes. XIII. Biochemical basis of acid and alkali reactions. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 13, p. 389-393, 1981.

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

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

VELÁZQUEZ, E.; IGUAL, J. M.; WILLEMS, A.; et al. *Mesorhizobium chacoense* sp. nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido region (Argentina). **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, v. 51, n. 3, p. 1011–1021, 2001.

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

van BERKUM, P. et al. *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen-fixing symbioses with *Medicago ruthenica* [(L.) Ledebour]. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, v. 48, n. 1, p. 13-22, 1998.

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

VANDAMME, P. et al. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 2, p. 407-438, 1996.

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

VIELMA, A. M. Characterization of indigenous strains of *Bradyrhizobium* sp (Lupinus) isolated from *Lupinus* spp. **Revista da Faculdade de Agronomia**, v. 16, n. 5, p. 495-508, 1999.

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

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

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

WANG, E. T. et al. Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, v. 49, n. 1, p. 51-65, 1999.

WANG, E. T. et al. *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, n. 3, p. 687-699, 1998.

WEI, G. H. et al. Characterization of rhizobia isolated from legume species within the genera *Astragalus* and *Lespedeza* grown in the Loess Plateau of China and description of *Rhizobium loessense* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, v. 53, n. 5, p. 1575-1583, 2003.

WEI, G. H. et al. *indigoferae* sp. nov. and *Sinorhizobium kummerowiae* sp. nov., respectively isolated from *Indigofera* spp. and *Kummerowia stipulacea*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, v. 52, v. 6, p. 2231-2239, 2002.

WIETHÖLTER, S. Nitrogênio para o trigo obtido através do cultivo intercalar de nabo forrageiro. In: 30° Congresso Brasileiro de Ciência do Solo. **Anais...**, Recife, PE, 2005. CD-ROM.

WILSON, J. K. Over five hundred reasons for abandoning the cross inoculation groups of legumes. **Soil Science**, v. 58, n. 1, p. 61-69, 1944.

WOLKO, B.; WEEDEN, N. F. Relationships among lupin species as reflected by isozyme phenotype. **Genetica Polonica**, v. 31, n. 3-4, p. 189-197, 1990.

XAVIER, G.R. et al. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea rhizobia population. **Biology and Fertility of Soils**, v. 27, n. 4, p. 386-392, 1998.

XU, L. M.; GE, C. Physiological-biochemical characteristics and symbiotic response of the fast growing *Rhizobium japonicum*. **Soybean Science**, v. 3, p. 102-109, 1984.

XU L.M. et al. *Bradyrhizobium liaoningensis* sp. nov. isolated from the root nodules of soybean, **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, n. 4, p. 706-71, 1995.

YAO, Z. Y. et al. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology**, v. 52, n. 6, p. 2219-2230, 2002.

YOUNG, J. M. et al. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. **International**

Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology, v. 51, n. 1, p. 89-103, 2001.

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

YOUNG, J.P.W.; HAUKKA, K.E. Diversity and phylogeny of rhizobia. **New Phytologist**, v. 133, n. 1, p. 87-94, 1996.

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

ZILLI, J. E. et al. Eficiência simbiótica de estirpes de *Bradyrhizobium* isoladas de solo do Cerrado em caupi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 5, p. 811-818, 2006

ANEXOS

ANEXO A – Meios de cultura e soluções utilizados para o estudo da população bacteriana oriunda de *Lupinus albus*.

Meio de cultura LMA (Vincent, 1970)

| | |
|--------------------------------------|---------|
| Manitol | 10,0g |
| K ₂ HPO ₄ | 0,5g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,2g |
| NaCl | 0,1g |
| Extrato de Levedura | 0,5g |
| Agar | 16,00 g |
| Água destilada | 1000 mL |
| Ajuste do pH para 6,8 | |

Meio de cultura LM (Vincent, 1970)

| | |
|--------------------------------------|---------|
| Manitol | 10,0g |
| K ₂ HPO ₄ | 0,5g |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,2g |
| NaCl | 0,1g |
| Extrato de Levedura | 0,5g |
| Água destilada | 1000 mL |
| Ajuste do pH para 6,8 | |

Azul de Bromotimol (Hungria, 1994)

| | |
|-----------------|----------------------|
| Solução estoque | 0,5g L ⁻¹ |
| Água destilada | 1000 mL |

Vermelho Congo (Hungria, 1994)

| | |
|-----------------|-----------------------|
| Solução estoque | 2,5 g L ⁻¹ |
| Água destilada | 1000 mL |

Solução Nutritiva (Somasegaran & Hoben, 1985)

| | |
|---------------------------------------|-------------------------|
| CaCl ₂ .H ₂ O | 294,1 g L ⁻¹ |
| KH ₂ PO ₄ | 136,1 g L ⁻¹ |
| FeEDTA | 4,5 g L ⁻¹ |
| Citrato-Fe | 6,70 g L ⁻¹ |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 123,3 g L ⁻¹ |
| K ₂ SO ₄ | 87,0 g L ⁻¹ |
| MnSO ₄ .H ₂ O | 338 mg L ⁻¹ |
| H ₃ BO ₃ | 247 mg L ⁻¹ |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 288 mg L ⁻¹ |
| CuSO ₄ .7H ₂ O | 100 mg L ⁻¹ |
| CoSO ₄ .7H ₂ O | 56 mg L ⁻¹ |
| NaMoO ₂ .2H ₂ O | 48 mg L ⁻¹ |