

**RELAÇÕES SIMBIÓTICAS E EDÁFICAS DE  
*Azorhizobium doebereinae* E DE OUTRAS  
ESPÉCIES NODULÍFERAS EM SOLOS  
COLETADOS PRÓXIMOS AO SISTEMA  
RADICULAR DE *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.**

**LIGIANE APARECIDA FLORENTINO**

**2007**

**LIGIANE APARECIDA FLORENTINO**

**RELAÇÕES SIMBIÓTICAS E EDÁFICAS DE *Azorhizobium doebereineriae* E DE OUTRAS ESPÉCIES NODULÍFERAS EM SOLOS COLETADOS PRÓXIMOS AO SISTEMA RADICULAR DE *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola para a obtenção do título de “Mestre”.**

Orientador  
Prof. Dra. Fátima M. S. Moreira

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2007

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Florentino, Ligiane Aparecida

Relações simbióticas e edáficas de *Azorhizobium doebereinae* e de outras espécies nodulíferas em solos coletados próximos ao sistema radicular de *Sesbania virgata* (cav.) pers. / Ligiane Aparecida Florentino. -- Lavras : UFLA, 2007.

62 p : il.

Orientador: Fátima M. S. Moreira.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Sesbania. 2. Simbiose. 3. Bactéria fixadora de nitrogênio. 4. Caracterização fenotípica. 5. Eletroforese. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-574.52482

-631.46

**LIGIANE APARECIDA FLORENTINO**

**RELAÇÕES SIMBIÓTICAS E EDÁFICAS DE *Azorhizobium doebereineriae* E DE OUTRAS ESPÉCIES NODULÍFERAS EM SOLOS COLETADOS PRÓXIMOS AO SISTEMA RADICULAR DE *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola para a obtenção do título de “Mestre”.**

APROVADA em 26 de fevereiro de 2007

Prof. Dr. Ivanildo Evódio Marriel

EMBRAPA

Prof. Dr. Romildo da Silva

UFLA

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Fátima Maria de Souza Moreira

UFLA  
(Orientadora)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

*Há homens que lutam um dia, e são bons;  
Há outros que lutam um ano, e são melhores;  
Há aqueles que lutam muitos anos, e são muito bons;  
Porém há os que lutam toda a vida  
Estes são os imprescindíveis.*

*Bertold Brecht*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

À Universidade Federal de Lavras.

À Capes, pela concessão da bolsa.

Ao Departamento de Biologia, aos professores, colegas e técnicos da Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola.

Ao Departamento de Ciência do Solo.

À professora Fátima M. S. Moreira, pela orientação e amizade.

Aos professores da banca examinadora, Prof. Dr. Ivanildo E. Marriel e Prof. Dr. Romildo da Silva, pelas sugestões.

À Marlene, pela amizade, incentivo e apoio sempre prestados.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia do Solo, pela agradável convivência. Principalmente, a Márcia e Ana Paula, pela valiosa ajuda na condução do trabalho.

Aos meus pais, Antônio e Leny, pelo exemplo de coragem e dignidade.

A minha irmã Keny, pelo amor incondicional demonstrado nos momentos mais difíceis da minha vida.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS E FIGURAS</b> .....	i
<b>RESUMO</b> .....	iv
<b>ABSTRACT</b> .....	v
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	04
2.1 Importância dos estudos sobre Fixação Biológica de N <sub>2</sub> atmosférico.....	04
2.2 Distribuição de bactérias fixadoras de N <sub>2</sub> atmosférico nos solos.....	05
2.3 Microsymbiontes do gênero <i>Sesbania</i> .....	06
2.4 <i>Sesbania virgata</i> .....	07
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	11
3.1 Amostragem de solos de áreas contendo plantas de <i>Sesbania virgata</i> .....	11
3.2 População de <i>Azorhizobium doebereinae</i> e de outras espécies de bactérias fixadoras de N <sub>2</sub> atmosférico (BFNNL) presentes nos solos coletados próximo do caule e a 10 metros de plantas de <i>S. virgata</i> .....	13
3.3 Caracterização cultural.....	17
3.4 Autenticação e eficiência simbiótica de isolados obtidos das espécies hospedeiras promíscuas, <i>L. leucocephala</i> , <i>M. atropurpureum</i> , <i>P. vulgaris</i> , e <i>V. unguiculata</i> .....	18
3.5 Inoculação dos isolados em plantas de <i>S. virgata</i> .....	19
3.6 Análise de proteínas totais por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS- PAGE) e sequenciamento do gene 16S rDNA.....	20
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	22
4.1 População de <i>Azorhizobium doebereinae</i> e de outras espécies de BFNNL em solos coletados próximo ao caule e a 10 metros de <i>Sesbania virgata</i> com várias espécies de plantas isca.....	22

4.2.1 <i>Sesbania virgata</i> .....	22
4.2.2 <i>Leucaena leucocephala</i> .....	25
4.2.3 <i>Macroptilium atropurpureum</i> .....	27
4.2.4 <i>Phaseolus vulgaris</i> .....	29
4.2.5 <i>Vigna unguiculata</i> .....	31
4.3 Caracterização cultural dos isolados obtidos de nódulos das plantas isca.....	34
4.4 Autenticação e Eficiência simbiótica dos isolados de <i>L. leucocephala</i> , <i>M.</i> <i>atropurpureum</i> , <i>P. vulgaris</i> e <i>V. unguiculata</i> .....	40
4.5 Simbiose entre <i>S. virgata</i> e isolados de diferentes espécies hospedeiras que apresentaram características culturais semelhantes á <i>A.</i> <i>doebereinae</i> .....	49
4.6 Caracterização fenotípica (SDS-PAGE) e sequenciamento do gene 16SrDNA.....	50
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	52
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	54
<b>ANEXOS</b> .....	59

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

<b>Tabela 1</b>	Resultados médios das amostras de solos coletadas próximo ao caule e a 10 metros das cinco plantas de <i>S. virgata</i> encontradas próximas das cidades de Ribeirão Vermelho e Nepomuceno.....	12
<b>TABELA 2</b>	Estirpes utilizadas na inoculação das espécies promíscuas e consideradas de alta eficiência simbiótica.....	16
<b>TABELA 3</b>	Matéria seca da parte aérea (MSPA), número (NN), peso fresco (PFN) e seco dos nódulos (PSN) e massa seca de raiz (MSR) de plantas de <i>Sesbania virgata</i> inoculadas com suspensões de solos coletados próximo ao caule e a 10 metros de <i>S. virgata</i> .....	25
<b>TABELA 4</b>	Matéria seca da parte aérea (MSPA), número (NN), peso fresco (PFN) e seco dos nódulos (PSN) e massa seca de raiz (MSR) de plantas de <i>L. leucocephala</i> inoculadas com suspensões de solos coletados às distâncias de 0 e 10 metros do caule de <i>S. virgata</i> .....	27
<b>TABELA 5</b>	Matéria seca da parte aérea (MSPA), número (NN), peso fresco (PFN) e seco dos nódulos (PSN) e massa seca de raiz (MSN) de plantas de <i>M. atropurpureum</i> inoculadas com suspensões de solos coletados próximo e a 10 metros de distância do caule de <i>S. virgata</i> .....	29
<b>TABELA 6</b>	Matéria seca da parte aérea (MSPA), número (NN), peso fresco (PFN) e seco dos nódulos (PSN) e massa seca de raiz (MSR) de plantas de <i>P. vulgaris</i> inoculadas com suspensões de solos coletados próximo e a 10 metros de distância do caule de <i>S. virgata</i> .....	31
<b>TABELA 7</b>	Matéria seca da parte aérea (MSPA), número (NN), peso fresco (PFN) e seco dos nódulos (PSN) e massa seca de raiz (MSN) de plantas de <i>V. unguiculata</i> inoculadas com suspensões de solos coletados às distâncias de 0 e 10 metros do caule de <i>S. virgata</i> .....	33

<b>TABELA 8</b>	Número de isolados obtidos dos nódulos das cinco espécies leguminosas inoculadas com solos coletados próximo ao caule e a 10 metros de <i>S. virgata</i> . Os valores entre parêntesis indicam o número de isolados que apresentaram tempo de crescimento rápido (2-3 dias) e reação alcalina em meio de cultura.....	36
<b>TABELA 9</b>	Características culturais dos isolados de <i>L. leucocephala</i> , <i>M. atropurpureum</i> , <i>P. vulgaris</i> e <i>V. unguiculata</i> reinoculados nos hospedeiros de origem.....	41
<b>TABELA 10</b>	Autenticação de isolados de <i>L. leucocephala</i> inoculados em seu hospedeiro de origem.....	42
<b>TABELA 11</b>	Resultados de matéria seca da parte aérea (MSPA), número (NN), peso fresco (PFN) e seco dos nódulos (PSN) e massa seca de raiz (MSR) de plantas de <i>M. atropurpureum</i> inoculadas com BFNNL obtidas do próprio hospedeiro.....	44
<b>TABELA 12</b>	Resultados de matéria seca da parte aérea (MSPA), número (NN), peso fresco (PFN) e seco dos nódulos (PSN) e massa seca de raiz (MSR) de plantas de <i>P. vulgaris</i> inoculadas com BFNNL obtidas do próprio hospedeiro.....	46
<b>TABELA 13</b>	Resultados de matéria seca da parte aérea (MSPA), número (NN), peso fresco (PFN) e seco dos nódulos (PSN) e massa seca de raiz (MSR) de plantas de <i>V. unguiculata</i> inoculadas com BFNNL obtidas do próprio hospedeiro.....	48
<b>TABELA 14</b>	Nodulação de <i>S. virgata</i> inoculada com isolados obtidos de diferentes espécies hospedeiras que apresentaram tempo de crescimento rápido e reação alcalina em meio de cultura.....	49
<b>TABELA 15</b>	Resultados do Sequenciamento do gene 16S rDNA.....	51

<b>FIGURA 1</b>	Distribuição de <i>Sesbania virgata</i> na América do Norte (A) e América do Sul (B).....	10
<b>FIGURA 2</b>	Visão geral dos experimentos instalados em casa de vegetação (A) <i>M. atropurpureum</i> (à esquerda) e <i>V. unguiculata</i> (à direita); (B) <i>S. virgata</i> (à esquerda) e <i>L. leucocephala</i> (direita); (C) e (D) <i>S. virgata</i> , <i>L. leucocephala</i> e <i>P. vulgaris</i> (à direita).....	34
<b>FIGURA 3</b>	Distribuição dos isolados de bactérias que nodulam <i>S. virgata</i> (A), <i>L. leucocephala</i> (B), <i>M. atropurpureum</i> (C), <i>P. vulgaris</i> (D) e <i>V. unguiculata</i> (E) em 7 tipos culturais em meio de cultura 79.....	39
<b>FIGURA 4</b>	Perfis de proteína celular total.....	50

## RESUMO

FLORENTINO, Ligiane Aparecida. **Relações simbióticas e edáficas de *Azorhizobium doebereinae* e de outras espécies nodulíferas em solos coletados próximos ao sistema radicular de *Sesbania virgata* (cav.) pers.: UFLA, 2007. 62p. (Dissertação - Mestrado em Microbiologia Agrícola)\***

Estudaram-se as relações simbióticas e edáficas de *Azorhizobium doebereinae* e de outras espécies de bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> nodulíferas de leguminosas (BFNNL), presentes em amostras de solos coletadas próximo ao caule e a 10 metros do caule de cinco plantas de *Sesbania virgata* encontradas em áreas de pastagem. A presença de BFNNL foi avaliada por meio da inoculação destas amostras de solos em condições assépticas em plantas de *S. virgata* e nas seguintes espécies hospedeiras consideradas promíscuas: *Leucaena leucocephala*, *Macroptilium atropurpureum*, *Phaseolus vulgaris* e *Vigna unguiculata*. Todas as amostras de solos apresentaram BFNNL capazes de nodular, pelo menos, uma espécie hospedeira, tendo *M. atropurpureum* sido considerado a espécie mais promíscua, seguida pelo *P. vulgaris*, *V. unguiculata*, e *L. leucocephala* igual a *S. virgata*. *S. virgata* formou simbiose preferencialmente com BFNNL presentes nas amostras de solos coletadas a próximo ao caule de *S. virgata*, e a maioria dos isolados apresentaram características culturais semelhantes a *A. doebereinae*. Os isolados das espécies hospedeiras consideradas promíscuas apresentaram grande diversidade cultural. Destes, foram selecionados 45 isolados para estudar suas propriedades simbióticas quando inoculados em seu hospedeiro de origem, observando-se que a maioria nodulou e alguns apresentaram alta eficiência simbiótica. Dentre a grande diversidade cultural de isolados, observou-se que as quatro espécies hospedeiras promíscuas foram capazes de capturar isolados com características culturais similares a *A. doebereinae*, porém apresentando produção de goma ligeiramente maior. Alguns destes isolados, juntamente com alguns isolados dos nódulos de *S. virgata*, foram selecionados para estudo das propriedades simbióticas quando inoculados em *S. virgata*, análise do perfil de proteína por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e sequenciamento do gene 16S rDNA. Dos isolados inoculados em *S. virgata*, somente os isolados desta espécie foram capazes de nodular este hospedeiro. Pela análise dos perfis de proteínas, observou-se que os isolados de outras espécies com características similares a de *A. doebereinae* apresentaram perfis distintos dos isolados de *S. virgata*, o que foi comprovado pelos resultados do sequenciamento, no qual a maioria destes isolados foi identificada como pertencentes ao gênero *Cupriavidus* sp.

Orientadora: Prof. Dra. Fátima M. S. Moreira – UFLA.

## ABSTRACT

FLORENTINO, Ligiane Aparecida. **Symbiotic and edaphic relationships of *Azorhizobium doebereinae* and other Leguminosae-nodulating bacteria isolated from soils samples collected close to the roots of *Sesbania virgata* (cav.) pers.: UFLA, 2007. 62p.** (Dissertation – Master program in Agricultural Microbiology)\*

We studied the symbiotic and edaphic relationships of *Azorhizobium doebereinae* and other Leguminosae-nodulating bacteria (LNB) present in soil samples collected close to and 10 m distant of the stem of five plants of *Sesbania virgata*. The presence of LNB was evaluated by inoculation soil samples suspensions in four promiscuous legume species (*Leucaena leucocephala*, *Macroptilium atropurpureum*, *Phaseolus vulgaris* and *Vigna unguiculata*) and *Sesbania virgata* with the collected samples. LNB able to induce nodulation in at least one of these legumes were found in all soil samples. *Macroptilium atropurpureum* was the most promiscuous species, followed by *P. vulgaris*, *V. unguiculata*, e *L. leucocephala*, which had a performance similar to *S. virgata*. *S. Virgata* was preferentially nodulated by LNB found in samples colleted close to the stem and the majority of its isolates presented cultural characteristics similar to *A. doebereinae*. A high cultural diversity was observed among the isolates of the promiscuous legumes and 45 isolates were selected for tests of symbiotic efficiency in their original host. The four promiscuous species were also able to capture isolates with cultural characteristics similar to *A. doebereinae* (*Azorhizobium*-like bacteria), however they present slightly more expolyssacaride production the *Azorhizobium*. Some of them, as well as *S.virgata* isolates were selected to symbiotic efficiency tests as well as for total protein profiling (SDS-PAGE) and sequencing of the 16S rRNA gene. Only *Azorhizobium*-like bacteria isolated of *S. virgata* were able to nodulate this species. The *Azorhizobium*-like bacteria isolated of other legume species presented distinct protein profiles. Sequencing of the 16S rRNA gene indicates that these isolates belong to the genus *Cupriavidus* and the isolates of *S. virgata* to the species *Azorhizobium doebereinae*.

\*Advisor: Prof. Dra. Fátima M. S. Moreira – UFLA.

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Sesbania* pertence à família Leguminosae e compreende, aproximadamente, 70 espécies (Allen & Allen, 1981), distribuídas, principalmente, nos continentes americano e africano, onde geralmente, são encontradas em solos degradados, de baixa fertilidade natural e em áreas alagadas, apresentando grande potencial para utilização em programas de recuperação de solos degradados e em reflorestamento de matas ciliares.

Os estudos de fixação biológica de nitrogênio (FBN) neste gênero concentram-se, principalmente, nas espécies *S. herbacea* e *S. virgata*, nativas do continente americano e *S. sesban* e *S. rostrata*, espécies africanas. *S. herbacea* forma simbiose com bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium*, e, em condições de alagamento, forma simbiose somente com a espécie *Rhizobium huautlense* (Wang et al., 1998; Wang & Martinez-Romero, 2000). *S. sesban* é amplamente utilizada em sistemas agroflorestais na África, onde contribui para promover a restauração de solos pobres em nutrientes. Esta espécie forma simbiose com bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium* (Bala et al., 2002). A espécie *S. rostrata*, utilizada como adubação verde em lavouras de arroz irrigado, apresenta nódulos caulinares e radiculares, forma simbiose com os gêneros *Azorhizobium* e *Sinorhizobium* (Boivin et al., 1997; Dreyfus et al., 1988). O gênero *Azorhizobium*, descrito por Dreyfus et al. (1988), apresenta características culturais que permitem a sua distinção de outros gêneros de BFNNL, apresentando tempo de crescimento rápido, reação alcalina em meio de cultura 79 (Fred & Waksman, 1928), também denominado YMA (Vincent, 1970) e baixa produção de goma.

*Sesbania virgata* é uma espécie nativa empregada em áreas de recuperação de solos degradados e em reflorestamento de matas ciliares. Todos os estudos de FBN envolvendo *S. virgata* mostram que esta espécie forma

simbiose eficiente somente quando é inoculada com estirpes da espécie *Azorhizobium doebereinae* (Florentino, 2005; Gonçalves & Moreira, 2004; Moreira et al., 2006), apesar de estabelecer simbiose inefectiva com *A. caulinodans*.

Os isolados obtidos de nódulos de *S. virgata* apresentam alta similaridade cultural, fenotípica, genotípica e simbiótica e foram recentemente classificados na nova espécie *A. doebereinae* (Moreira et al., 2006). Esta espécie, quando inoculada em outros hospedeiros, como, por exemplo, *Macroptilium atropurpureum*, *Phaseolus vulgaris* e *S. rostrata*, nodula, mas não forma simbiose efetiva (Gonçalves & Moreira, 2004). Dessa forma, observa-se a ocorrência de uma especificidade do hospedeiro, *S. virgata* e do microssimbionte, *A. doebereinae*.

Além disso, a maioria dos estudos visando avaliar a densidade e a diversidade de BFNNL presentes em solos de ecossistemas não relata a presença do gênero *Azorhizobium* (Jesus et al., 2005; Lafay & Burdon, 1998; Melloni et al., 2006). Florentino (2005) verificou que a distribuição de *A. doebereinae* nos solos está relacionada com a presença de seu hospedeiro, *S. virgata*, sendo que este microssimbionte não foi encontrado em amostras de solos coletadas à 20 metros de distância do caule da espécie hospedeira.

Baseando-se na especificidade simbiótica apresentada por *S. virgata* e *A. doebereinae*, os objetivos deste trabalho foram:

1. verificar a influência de *Sesbania virgata* na população de *Azorhizobium doebereinae* e de outras espécies de BFNNL, em solos coletados próximo ao seu caule e a 10 metros dele, por meio da inoculação de suspensões destes solos em *Sesbania virgata* e nos seguintes hospedeiros promíscuos: *Leucaena leucocephala*, *Macroptilium atropurpureum*, *Phaseolus vulgaris* e *Vigna unguiculata*;

2. caracterização cultural de isolados obtidos de todos os tratamentos no item 1;
3. autenticar e verificar a eficiência simbiótica por meio da re-inoculação dos isolados com diferentes características culturais nos seus hospedeiros de origem: *L. leucocephala*, *M. atropurpureum*, *P. vulgaris* e *V. unguiculata*;
4. estudar as características simbióticas dos isolados das espécies vegetais promíscuas que apresentam alguma similaridade cultural com o gênero *Azorhizobium* em *S. virgata*;
5. caracterização fenotípica, por meio da análise de proteínas totais por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e sequenciamento do gene 16SrDNA dos isolados estudados no item 4.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Importância dos estudos sobre simbioses de leguminosas e BFNNL

Nas regiões tropicais, onde os solos são geralmente ácidos, pobres em nutrientes e com elevados teores de alumínio, o cultivo de espécies leguminosas capazes de formar simbiose com bactérias fixadoras de  $N_2$  atmosférico nodulíferas em leguminosas (BFNNL) têm grande importância para manutenção do ecossistema. Isso porque estas espécies podem contribuir para a ciclagem de nutrientes de modo mais efetivo, uma vez que a qualidade do material aportado é, geralmente, superior àquele oriundo de espécies não leguminosas.

Segundo Franco & Faria (1997), as espécies leguminosas que são capazes de formar simbiose com BFNNL têm sido utilizadas para restaurar a fertilidade do solo em áreas degradadas, porque mantêm os níveis adequados de N no solo para o crescimento vegetal, dispensando o uso de fertilizantes nitrogenados que, além de caros, podem exercer impactos sobre o ecossistema.

A deposição das folhas e o crescimento das raízes estabilizam o solo, aumentam sua atividade biológica e criam condições propícias para o estabelecimento de outras espécies mais exigentes. O solo de áreas degradadas colonizadas por leguminosas capazes de se associarem com BFNNL apresenta maior diversidade e biomassa em relação às espécies que não formam associação com BFNNL (Campello, 1998).

Dessa forma, a utilização de espécies leguminosas que formam simbiose com BFNNL e que apresentam rápido crescimento e capacidade de sobreviver às condições de solo de baixa fertilidade natural, torna-se uma alternativa viável, do ponto de vista econômico e ecológico.

## 2.2 Distribuição de bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> atmosférico nos solos

O solo é considerado um ambiente complexo, heterogêneo e dinâmico (Moreira & Siqueira, 2006), de forma que diversos fatores, como as características químicas e físicas do solo, podem afetar a densidade e a diversidade dos microrganismos no solo. No caso das BFNNL, além das características do solo, podem-se citar também as características intrínsecas de cada espécie hospedeira e as características da própria BFNNL, que podem regular a densidade e a diversidade destas no solo e o processo simbiótico.

De acordo com Bala et al. (2003), a densidade e a diversidade genética de BFNNL presentes em solos de diversas regiões estão diretamente relacionadas com a acidez do solo e com os valores de pH. A maior densidade e diversidade de BFNNL foram encontradas com valores de pH em torno de 6,0.

Além das características dos solos, a habilidade de utilizar compostos orgânicos encontrados no solo e nos exsudados de raízes pode conferir vantagem competitiva a certos grupos de microrganismos no solo. Germida (1988) avaliou o crescimento de estirpes de *Rhizobium meliloti* e *R. leguminosarum* cultivadas em solo em que foram adicionados diferentes compostos orgânicos e verificaram que todos os compostos estimularam o crescimento de BFNNL nativas, tendo o crescimento variado de acordo com cada estirpe, a concentração do nutriente utilizado e o tipo de solo.

Robertson et al. (1994), estudando a ocorrência dos gêneros *Azorhizobium* e *Rhizobium* em solos rizosféricos e não rizosféricos, verificaram que a maior densidade de ambos os gêneros foi encontrada em solos rizosféricos das espécies *S. rostrata*, *Cassia obtusifolia*, *Acacia senegal* e *Hystic suaveolens*. *A. doebereineriae* somente foi encontrada em solos coletados próximos ao sistema radicular de seu hospedeiro, *S. virgata* (Florentino, 2005). Estes resultados sugerem que espécies de leguminosas podem exercer influência sobre as populações de BFNNL específicas.

### 2.3 Microsimbiontes do gênero *Sesbania*

O gênero *Sesbania*, família Leguminosae, subfamília *Papilionoideae* e tribo *Robinieae*, divide-se em quatro subgêneros: *Sesbania*, *Agati*, *Daubentonia* e *Pterosesbania*. A espécie tipo *Sesbania sesban* pertence ao subgênero *Sesbania*, no qual também estão inclusas as espécies *S. exasperata* e *S. rostrata*, encontradas no continente africano. No subgênero *Daubentonia*, estão incluídas as espécies *S. punicea* e *S. virgata*, nativas da parte sul do continente americano.

Por meio do isolamento de nódulos radiculares e caulinares de *S. rostrata*, Dreyfus et al. (1988) descreveram um novo gênero de bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> atmosférico (BFNNL), *Azorhizobium*, tendo a espécie descrita sido denominada *Azorhizobium caulinodans*, cuja estirpe tipo é a ORS 571<sup>T</sup>. Este gênero apresenta características culturais que o distinguem facilmente dos outros gêneros de bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> atmosférico, apresentando tempo de crescimento rápido, produzindo reação alcalina em meio de cultura 79 (Fred & Waksman, 1928), também denominado YMA (Vincent, 1970) e apresentando baixa produção de goma.

O isolamento de nódulos de outras espécies do gênero *Sesbania* proporcionou a descrição de outras espécies de BFNNL. De Lajudie et al. (1994) descreveram as espécies *Sinorhizobium saheli* e *S. terangae* de nódulos de *S. rostrata*, *S. cannabina*, *S. aculeata*, *S. sesban*, *S. grandiflorea* e *S. pachicarpa*. Wang et al. (1998) descreveram a espécie *Rhizobium huautlense*, S02<sup>T</sup>, de nódulos de *S. herbacea* e Moreira et al. (2006) descreveram a espécie *A. doebereineriae*, BR 5401<sup>T</sup>, de nódulos de *S. virgata*.

*S. herbacea* forma simbiose com BFNNL dos gêneros *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium*. Quando esta espécie é cultivada em solos alagados, verifica-se que esta forma simbiose somente com a espécie *Rhizobium huautlense* (Wang et al., 1998; Wang & Martinez-Romero, 2000). Wang et al. (1998) relacionam esta especificidade com a limitada diversidade encontrada

entre os isolados de *R. huautlense*, uma vez que estes isolados somente são encontrados quando *S. herbacea* é cultivada em condições de alagamento.

A espécie *Sesbania rostrata* é cultivada e incorporada em áreas de cultivo de arroz irrigado, fornecendo grande quantidade de N para esta cultura. De acordo com Dreyfus et al. (1988), esta espécie forma simbiose com *Azorhizobium caulinodans*, apresentando nódulos no caule e nas raízes.

*S. sesban* é utilizada em sistemas agroflorestais, visando aumentar a disponibilidade de N e restaurar a fertilidade dos solos, proporcionando um aumento na produtividade milho (Kwesiga et al., 1999). Bala et al. (2002), analisando a diversidade genética de rizóbios que nodulam *S. sesban* em solos da África, encontraram rizóbios pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium*. Neste trabalho observaram que a maioria dos isolados encontrados pertencia ao gênero *Mesorhizobium*.

Ao analisar os isolados de nódulos radiculares de *S. virgata*, Moreira et al. (1998) verificaram que estes apresentavam alta semelhança com *A. caulinodans*, porém, por meio do sequenciamento parcial do gene 16S rDNA, estes isolados apresentaram alguns pares de bases distintas de *A. caulinodans*, levando à descrição da segunda espécie *A. doebereineriae* (Moreira et al., 2006). Não foi observada nodulação em *S. virgata*, quando inoculada com BFNNL dos gêneros *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (Gonçalves & Moreira, 2004).

#### **2.4 *Sesbania virgata***

O gênero *Sesbania* apresenta 70 espécies distribuídas entre ervas, arbustos ou árvores de pequeno a médio porte, relacionadas com o melhoramento da qualidade do solo, por meio da prevenção de erosões e aumento da quantidade de nitrogênio disponível, pois são capazes de fazer a fixação biológica do nitrogênio, por meio da simbiose com o rizóbio. Outras

espécies podem ser utilizadas na formação de cercas vivas, barreiras contra o vento e, em alguns casos, como fornecedoras de fibras de boa qualidade e na alimentação animal (Allen & Allen, 1981).

O grande potencial de utilizações destas espécies está diretamente relacionado com a capacidade destas espécies em formar simbiose com BFNNL.

*Sesbania virgata* (Cav.) Pers., Syn. *Aeschynomene virgata* Cav.; *Coronilla virgata* (Cav.) Willd.; *Coursetia virgata* (Cav.) DC.; *Sesbania marginata* Benth. (Lorenzi, 2000; Pott & Pott, 1994) é conhecida popularmente como sarazinho, mãe-josé e feijãozinho (Pott & Pott, 1994), angiquinho-grande e angiquinho gigante (Kissmann & Groth, 1992, 1999). É uma espécie nativa que apresenta crescimento rápido, podendo atingir de 1 a 4 metros de altura e diversos surtos de florescimento por ano, com maior intensidade nos meses de janeiro, abril, setembro e outubro. Suas frutificações acontecem em janeiro, outubro e novembro (Kissmann & Groth, 1992, 1999; Lorenzi, 2000; Pott & Pott, 1994, 1994).

A distribuição de *S. virgata* ao longo dos ecossistemas é desuniforme e está associada a áreas que sofreram algum tipo de impacto humano. Ela pode ser encontrada em campos alagáveis, solos arenosos ou argilosos e de baixa fertilidade natural. Por apresentar este aspecto rústico, esta espécie tem sido amplamente utilizada no reflorestamento da mata ciliar, na recuperação de solos degradados e no controle da erosão (Allen & Allen, 1981; Franco et al., 1996).

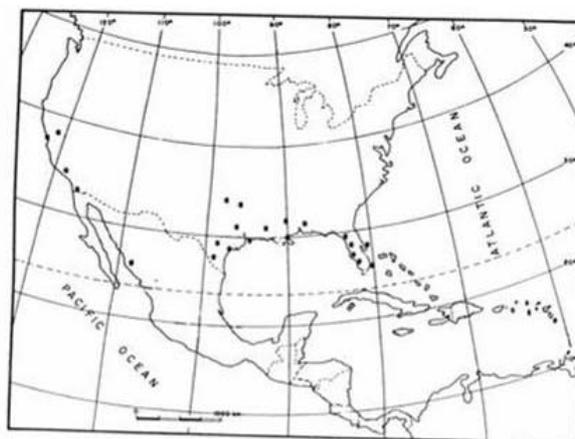
Franco et al. (1996), testando o potencial de utilização de espécies florestais em áreas de revegetação após extração da bauxita, solos com alto grau de compactação, verificaram que *S. virgata* (syn. *S. marginata*) foi a espécie que apresentou melhor desenvolvimento, apresentando alta taxa de sobrevivência das mudas, maior altura e, aos cinco meses, atingiu em torno de 2,5 metros e maior diâmetro à altura do colo.

Alguns autores como, Kissmann (1992,1994) e Lorenzi (2000) consideram esta espécie uma invasora de áreas úmidas ou alagadas, incluindo lavouras de arroz irrigado e pastagem, nas quais pode causar problemas de toxidez ao gado.

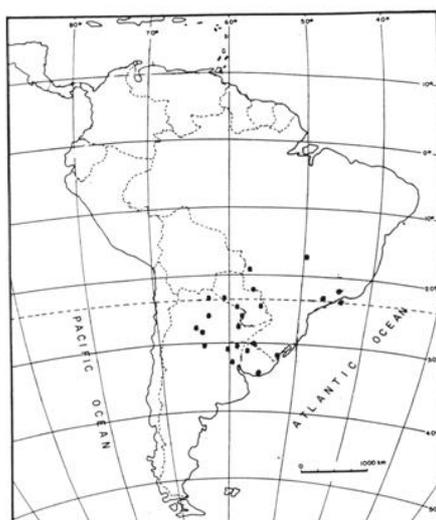
Segundo Pott & Pott (1994), esta planta pode ser utilizada, na atividade apícola, como fornecedora de lenha e para revegetação de áreas degradadas, pois funciona como pioneira e local de pouso de aves que trazem sementes de trepadeiras e de outras plantas sucessoras. Na Argentina, a semente torrada substitui o café; “café” é um dos nomes populares e é cultivada em jardim.

Braggio et al. (2002) verificaram que as folhas de *S. virgata* apresentam atividades farmacológicas que reduzem o estímulo doloroso e o edema inflamatório.

Na Figura 1 mostra-se a distribuição de *S. virgata* nas Américas do Norte, Central e Sul, verificando-se a ocorrência em torno dos Trópicos de Capricórnio e Câncer.



A



B

FIGURA 1 Distribuição de *Sesbania virgata* na América do Norte (A) e América do Sul (B). Adaptado de Monteiro, 1984.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Amostragem de solos de áreas contendo plantas de *Sesbania virgata*

Os solos foram coletados durante o mês de fevereiro de 2006, em áreas de pastagem no Sul de Minas Gerais contendo plantas de *S. virgata*. Foram amostradas cinco plantas de *S. virgata*, sendo três próximas à cidade de Nepomuceno e duas próximas de Ribeirão Vermelho. Em cada planta, foram coletadas duas amostras compostas, uma no caule e a outra a 10 metros de distância, totalizando 10 amostras compostas na camada de 0-20cm de profundidade, cada uma tendo sido constituída de quatro amostras simples (Anexo 1A).

Durante a amostragem, a serrapilheira foi removida e os instrumentos foram flambados antes de cada coleta de cada amostra composta, objetivando-se evitar contaminação. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis e conduzidas ao Laboratório de Microbiologia do Solo, onde foram armazenadas em câmara fria (4°C) para sua conservação até o momento da inoculação de suspensões destes solos nas plantas leguminosas com o objetivo de capturar as BFNNL presentes nestes solos.

De todas as amostras de solos foram retirados cerca de 500g de solo para as análises texturais e químicas, tendo estas últimas sido realizadas utilizando-se os seguintes métodos: pH em H<sub>2</sub>O; P, K, Zn, Fe, Mn e Cu (mg/dm<sup>3</sup>) em extrator Mehlich 1; Ca<sup>+2</sup>, Mg<sup>+2</sup> e Al<sup>+3</sup> (cmolc/dm<sup>3</sup>) em extrator KCl 1N; H + Al (cmolc/dm<sup>3</sup>) em extrator SMP; B (mg/dm<sup>3</sup>) em extrator água quente; S (mg/dm<sup>3</sup>) em extrator fosfato monocálcico em ácido acético e matéria orgânica (dag/kg) por meio de oxidação de Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 4N + H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10N. As análises foram realizadas no Laboratório de Fertilidade da Universidade Federal de Lavras. Os resultados das análises texturais e químicas de todas as amostras de solos encontram-se nos Anexos (B1, B2 e B3).

A média dos resultados das análises químicas dos solos coletados no caule e a 10 metros de distância de *S. virgata* encontradas em áreas de pastagem próximo às cidades de Ribeirão Vermelho e Nepomuceno encontram-se na Tabela 1.

TABELA 1 Resultados médios das amostras de solos coletadas próximo ao caule e a 10 metros das cinco plantas de *S. virgata* encontradas próximas às cidades de Ribeirão Vermelho e Nepomuceno.

Características químicas		Caule <i>S. virgata</i>	10 metros <i>S. virgata</i>
pH (H <sub>2</sub> O)		6,74	6,10
P	(mg/dm <sup>3</sup> )	2,16	0,80
K		155,4	95,60
Ca <sup>+2</sup>		3,32	1,56
Mg <sup>+2</sup>		0,54	0,36
Al <sup>+3</sup>		0,14	0,18
H+Al	(cmolc/dm <sup>3</sup> )	1,96	2,68
SB		4,24	2,16
(t)		4,38	2,34
(T)		6,20	4,84
V	(%)	65,26	42,42
m		8,00	8,00
MO (dag/kg)		2,26	1,26
P-rem (mg/L)		14,90	7,86
Zn		4,92	2,50
Fe		73,60	47,00
Mn	(mg/dm <sup>3</sup> )	23,02	8,84
Cu		3,16	2,12
B		0,48	0,30
S		26,54	53,50

### **3.2 População de *Azorhizobium doebereinae* e de outras espécies de bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> atmosférico (BFNNL) presentes nos solos coletados próximo do caule e a 10 metros de plantas de *S. virgata***

Com o objetivo de estudar se *S. virgata* exerce influência nas populações de *A. doebereinae* e de outras espécies de BFNNL, foram instalados cinco experimentos em casa de vegetação, no Departamento de Ciência do Solo da Universidade Federal de Lavras. O objetivo foi estudar a diversidade de BFNNL presentes nas 10 amostras de solos coletadas no caule e a 10 metros do caule de *S. virgata*. Em cada experimento, as 10 amostras de solos foram inoculadas nas seguintes espécies hospedeiras: *Sesbania virgata*, *Leucaena leucocephala*, *Macroptilium atropurpureum*, *Phaseolus vulgaris* e *Vigna unguiculata*. Exceto *S. virgata*, todas as plantas hospedeiras utilizadas são consideradas promíscuas, ou seja, são capazes de formar simbiose com mais de um gênero ou espécie de BFNNL.

Para a quebra da dormência das sementes de *S. virgata*, *L. leucocephala* e *M. atropurpureum*, utilizou-se ácido sulfúrico concentrado, 98,08%, durante 40, 35 e 50 minutos, respectivamente. As sementes de *P. vulgaris* e *V. unguiculata* foram desinfestadas superficialmente utilizando-se álcool e hipoclorito de sódio (2%), por 30 e 120 segundos, respectivamente. Após o processo de escarificação e desinfestação, as sementes foram lavadas em água esterilizada e colocadas em placas de Petri esterilizadas contendo algodão e papel de filtro umedecido com água esterilizada até o surgimento da radícula. No momento do plantio, foi retirado o tegumento de todas as sementes e a radícula foi inserida nos frascos de vidro, seguindo-se a inoculação com as suspensões das amostras dos solos.

Para a inoculação das amostras de solos nas plantas hospedeiras, utilizaram-se 50 g da amostra de cada solo suspensos em 50 mL de solução salina (0,55%) estéril, seguindo-se de agitação a 120 rpm, durante 30 minutos.

Um mL destas suspensões foi inoculado nas sementes pré-germinadas das plantas hospedeiras, no momento do plantio.

As suspensões de solos inoculadas nas plantas hospedeiras foram identificadas da seguinte forma: as amostras de solos das duas plantas de *S. virgata* colhidas próximo da cidade de Ribeirão Vermelho foram denominadas de A e B; A0 e B0 indicam que as amostras de solos foram coletadas a 0 metro do caule de *S. virgata* e A10 e B10, que as amostras de solo foram coletadas a 10 metros do caule de *S. virgata*.

Para as amostras de solos obtidas das três plantas de *S. virgata* amostradas próximo à cidade de Nepomuceno, utilizaram-se, respectivamente, as letras C, D e E, sendo C0, D0 e E0, as amostras de solo coletadas a 0 metro do caule e C10, D10 e E10, as amostras de solo coletadas a 10 metros do caule de *S. virgata*.

As plantas de *S. virgata*, *M. atropurpureum*, *P. vulgaris* e *V. unguiculata* foram cultivadas em frascos de vidro com capacidade de 600 mL, contendo 500 mL de solução nutritiva de Jensen sem nitrogênio ( $\text{CaHPO}_4$  1  $\text{gL}^{-1}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,2  $\text{gL}^{-1}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,2  $\text{gL}^{-1}$ ,  $\text{NaCl}$  0,2  $\text{gL}^{-1}$ ,  $\text{FeCl}_3$  0,1  $\text{gL}^{-1}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  2,86  $\text{mgL}^{-1}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  2,03  $\text{mgL}^{-1}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,22  $\text{mgL}^{-1}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0,08  $\text{mgL}^{-1}$  e  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,09  $\text{mgL}^{-1}$ ) (Jensen, 1942) diluída quatro vezes (pH 6,8). Esta quantidade utilizada de solução nutritiva foi suficiente para o desenvolvimento da planta até o surgimento dos nódulos, sem que houvesse necessidade de reposição. Antes do plantio, os frascos contendo solução nutritiva de Jensen sem nitrogênio e papel de filtro foram autoclavados durante 40 minutos, a uma pressão de 1,5  $\text{kg/cm}^2$  e a 127°C.

As plantas de *L. leucocephala* foram cultivadas em vasos de Leonard, pelo fato de em um experimento realizado anteriormente, esta espécie não ter se desenvolvido bem quando cultivada em frascos de vidro, nos quais foram cultivadas as espécies de *S. virgata*, *M. atropurpureum*, *P. vulgaris* e *V.*

*unguiculata*. Os vasos de Leonard continham areia e vermiculita na proporção 1:1 na parte superior e solução nutritiva de Jensen sem nitrogênio, diluída quatro vezes na parte inferior. Os vasos foram autoclavados por uma hora, à pressão de  $1,5 \text{ kg cm}^{-2}$ , a  $127^\circ\text{C}$ . No momento da semeadura, com quatro sementes por vaso, ocorreu a inoculação com um mL de suspensão de solo por semente. A superfície do vaso foi coberta com uma fina camada de mistura esterilizada de areia, benzeno e parafina, na proporção de 5:1:0,015, respectivamente, com a finalidade de evitar possíveis contaminações. Os níveis de solução nos vasos foram repostos, periodicamente, com solução nutritiva de Jensen sem nitrogênio, autoclavada por 40 minutos à pressão de  $1,5 \text{ kg cm}^{-2}$  e a  $127^\circ\text{C}$ . Decorridos três a cinco dias da germinação, foi feito o desbaste, deixando-se duas plantas por vaso.

Em todos os experimentos, foram utilizados quatro tratamentos controle, um sem nitrogênio mineral e sem inoculação com rizóbio, dois tratamentos em que foram inoculadas as duas espécies descritas do gênero *Azorhizobium*: *Azorhizobium caulinodans*, estirpe ORS 571<sup>T</sup> (BR 5410<sup>T</sup>), isolada de *Sesbania rostrata* (Dreyfus et al., 1988) e *A. doebereineriae* (Moreira et al., 2006), estirpe Br 5401<sup>T</sup>, também recomendada como inoculante para *S. virgata*, pela Embrapa Agrobiologia (Faria & Melo, 1998) e o outro contendo nitrogênio mineral. Para as espécies de *S. virgata*, *M. atropurpureum*, *P. vulgaris* e *V. unguiculata*, cultivadas em frascos de vidro, sem reposição de solução nutritiva, utilizaram-se  $28 \text{ mg.kg}^{-1}$  de N na forma de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . A aplicação foi parcelada em duas vezes, sendo a primeira parcela,  $14 \text{ mg.kg}^{-1}$ , aplicada sete dias após o plantio e a segunda, quinze dias após o plantio. Para *L. leucocephala* cultivada em vasos de Leonard, utilizaram-se  $210 \text{ mg.kg}^{-1}$  de N na forma de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , cuja aplicação foi parcelada em três vezes, de  $70 \text{ mg.kg}^{-1}$ /aplicação, que foram realizadas nas três primeiras semanas após o plantio.

Os experimentos com *L. leucocephala*, *P. vulgaris* e *V. unguiculata* constaram, ainda, da inoculação de estirpes de BFNNL recomendadas como inoculantes para cada espécie (Tabela 2). Para *M. atropurpureum*, foi utilizada estirpe St<sub>2</sub>12, pertencente ao Laboratório de Microbiologia do Solo, isolada de solos da Amazônia e de comprovada eficiência simbiótica, quando inoculada nesta espécie (Tabela 1). As estirpes de crescimento rápido, BR 827, St<sub>2</sub>12 e CIAT 899<sup>T</sup>, foram cultivadas por três dias em meio de cultura 79 (Fred & Waksman, 1928), também denominado YMA (Vincent, 1970) líquido, com azul de bromotimol e pH 6,8, sob agitação; as estirpes UFLA 03-84 e INPA 03-11B, de crescimento lento, foram cultivadas sob as mesmas condições, por cinco dias, para serem inoculadas nas sementes pré-germinadas no momento do plantio.

TABELA 2 Estirpes utilizadas na inoculação das espécies promíscuas e consideradas de alta eficiência simbiótica.

<i>Hospedeiro</i>	<i>Estirpe inoculante</i>	<i>Espécie do microsimbionte</i>
<i>Leucaena leucocephala</i>	BR 827	<i>Sinorhizobium freddi</i>
<i>Macroptilium atropurpureum</i>	ST <sub>2</sub> 12	-
<i>Phaseolus vulgaris</i>	CIAT 899 <sup>T</sup> (BR 322 <sup>T</sup> )	<i>Rhizobium tropici</i>
<i>Vigna unguiculata</i>	UFLA 03-84, INPA 03-11B	<i>Bradyrhizobium</i> sp.

As plantas de *S. virgata*, *L. leucocephala* e *M. atropurpureum* foram cultivadas por 40 dias e *P. vulgaris* e *V. unguiculata* por 30 dias. De todas as plantas, foram avaliados o peso seco da parte aérea (MSPA), dos nódulos (PSN) e da raiz (MSR), o peso fresco dos nódulos (PFN) e o número de nódulos (NN).

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições. Os dados de peso da MSPA, MSR, PFN, PSN e NN foram analisados estatisticamente utilizando o programa SISVAR, utilizando-se o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

### 3.3 Caracterização cultural

De todas as cinco espécies hospedeiras que apresentaram nódulos, foram retirados aleatoriamente quatro deles em cada repetição (planta), para a realização do isolamento, de acordo com o procedimento a seguir: 30 segundos em álcool, 60 segundos em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e seis lavagens sucessivas em água esterilizada. Após a desinfestação superficial, os nódulos foram macerados, em condições assépticas, sobre meio de cultura 79.

Os isolados obtidos dos nódulos radiculares das cinco espécies hospedeiras foram caracterizados em meio de cultura 79, de acordo com o tempo de aparecimento da colônia isolada (2-3 dias – crescimento rápido; 4-5 dias – crescimento intermediário; 6-10 dias – crescimento lento), alteração do pH do meio de cultura (reação ácida, neutra ou alcalina), tamanho, forma, elevação, superfície e cor da colônia, quantidade (baixa, média ou alta) e consistência do muco produzido e absorção de indicador.

O código de identificação dos isolados obtidos de nódulos das cinco espécies foi estabelecido da seguinte forma: as letras iniciais de cada hospedeiro de origem (*S. virgata*, SV; *L. leucocephala*, Le, *M. atropurpureum*, Ma, *P. vulgaris* (feijão), F e *V. unguiculata*, Vu), seguidas das letras A, B, C, D ou E, indicam a área onde o solo foi coletado e a distância do caule de *S. virgata* (0 ou 10 metros), de onde o solo foi coletado; o número em algarismo romano (I, II, III ou IV) indica a repetição (planta) dentro de cada tratamento e, por último, o número em algarismo arábico (1, 2, 3 ou 4) indica de qual nódulo o isolado foi obtido. A seguir, é mostrada a identificação de um isolado de nódulos de *S. virgata*, a qual foi inoculada com o solo A, coletado a 0 metro de distância do caule de *S. virgata*. Este isolado foi obtido da primeira repetição do tratamento

inoculado com a amostra de solo A, coletada no caule (0 metros) de *S. virgata* e do primeiro nódulo selecionado.

- SV → isolado de planta de *S. virgata*
- A0 → solo coletado próximo ao caule de *S. virgata*
- I → número da repetição dentro de cada tratamento
- 1 → número do nódulo do qual o isolado foi obtido

#### **3.4 Autenticação e eficiência simbiótica de isolados obtidos das espécies hospedeiras promíscuas *L. leucocephala*, *M. atropurpureum*, *P. vulgaris* e *V. unguiculata***

Os isolados foram agrupados em grupos, de acordo com as suas características culturais e, de cada grupo, foram selecionados, aleatoriamente, representantes de isolados obtidos de nódulos de *L. leucocephala*, *M. atropurpureum*, *P. vulgaris* e *V. unguiculata* para serem reinoculados nos seus hospedeiros de origem, com o objetivo de estudar a habilidade destes isolados em nodular e fixar N<sub>2</sub>.

Para o cultivo das plantas, a desinfestação das sementes e a utilização de tratamentos controle, seguiram-se os mesmos procedimentos adotados no item 3.2.

As estirpes de tempo de crescimento rápido, intermediário e lento foram cultivadas em meio de cultura 79 líquido, sob agitação, durante três, quatro e cinco dias, respectivamente, antes da inoculação nas sementes pré-germinadas, no momento do plantio.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições. Os dados de peso da MSPA, MSR, MFN e MSN e

NN foram analisados estatisticamente, utilizando-se o programa Sisvar, utilizando-se o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

### **3.5 Inoculação dos isolados em plantas de *S. virgata***

Dentre os isolados dos nódulos das plantas hospedeiras consideradas promíscuas que apresentaram diversas características culturais, foi observada a presença daqueles que apresentaram características culturais, como tempo de crescimento rápido, produção de reação alcalina em meio de cultura e baixa quantidade de goma. Com exceção da quantidade de goma, as outras duas características são bastante similares às do gênero *Azorhizobium*. Então, objetivou-se saber se estes isolados, obtidos de solos coletados próximo ao sistema radicular e a 10 metros de *S. virgata*, seriam capazes de nodular *S. virgata*.

Foram selecionados 12 isolados, obtidos do isolamento de nódulos de *L. leucocephala*, *M. atropurpureum*, *P. vulgaris* e *V. unguiculata*, além de 7 isolados de *S. virgata*, totalizando 19 isolados para serem inoculados em *S. virgata*.

Para cultivo das plantas, desinfestação das sementes e utilização de tratamentos controle, foram adotados os procedimentos citados no item 3.2.

Todos os isolados apresentaram crescimento rápido e foram cultivados em meio de cultura 79 líquido, sob agitação durante, três dias antes da inoculação nas sementes pré-germinadas, no momento do plantio.

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC), com quatro repetições. Os dados de MSPA, MSR, MSN e NN foram analisados estatisticamente, utilizando o programa Sisvar, utilizando-se o teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

### **3.6 Análise de proteínas totais por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e sequenciamento do gene 16S rDNA**

Além do estudo das características simbióticas apresentadas pelos isolados do item 3.5, objetivou-se, ainda, estudar o perfil de proteínas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e o sequenciamento do gene 16S rDNA destes isolados.

#### **3.6.1 Análises de proteínas totais**

Para a análise de proteínas totais, as condições de cultivo foram rigorosamente padronizadas para todas as estirpes. Os isolados obtidos foram cultivados em meio de cultura 79. Posteriormente, foram cultivados duas vezes sucessivas em meio TY sólido com mesmo tempo de incubação e, em seguida, as colônias isoladas foram inoculadas em 50 mL de meio de cultura líquido TY, onde foram cultivadas por 3 dias, sob agitação constante de 120, rpm à 28°C. Em seguida, o meio com cada cultura foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos à temperatura 4°C, o sobrenadante descartado e o “pellet” formado ressuspenso em tampão NaPBS, para lavagem das células. Setenta miligramas do “pellet” foram transferidos para tubos de 1,5 mL e foram adicionados 0,9 mL do tampão da amostra (TTA) e 0,1 mL de SDS 20% para solubilização das proteínas. Esta mistura foi aquecida em banho-maria a 95°C por 10 minutos. As amostras de proteínas solubilizadas foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 minutos, à temperatura de 4°C e 30 µL destas submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). Para tal, foi utilizado o método Laemmli (1970), com modificações descritas por Jackman (1985), utilizadas para rizóbio por Moreira et al. (1993). Para eletroforese, foi utilizado um gel de sistema descontínuo com concentração de poliacrilamida a 12% para o gel separador e a 5% para o gel de concentração.

### 3.6.2 Amplificação e sequenciamento do gene 16S do DNA ribossomal

Para a amplificação e o sequenciamento parcial do gene 16S rDNA, os isolados foram crescidos em meio 79 e as colônias isoladas foram retiradas e colocadas em microtubos de 1,5 mL contendo 1 mL de água ultrapura estéril e aquecidas por 10 minutos, a 95°C. Uma alíquota de 10 µL foi utilizada para a reação em cadeia da polimerase (PCR), para um volume final de 50 µL por reação. As concentrações finais dos reagentes por reação foram de 0,2µM de cada oligonucleotídeo iniciadores 27F(5AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) e 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT), 2,5 Mm de cloreto de magnésio, tampão 1x para PCR, 0,2 µM de cada dNTP e 0,02 U Taq DNA polimerase (Taq DNA polimerase, Invitrogen). A reação de amplificação foi realizada no termociclador Eppendorf Mastercycler®, Alemanha. As temperaturas do ciclo de amplificação foram uma desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação (94°C por 40 segundos), anelamento (55°C por 40 segundos), extensão (72°C por 1,5 minutos) e uma extensão final de 72° por 7 minutos. A reação de PCR do r DNA 16S (50µL) foi corrida em gel de agarose 1% (p/v), com tampão TAE, e depois corada em brometo de etídeo (5µg mL<sup>-1</sup>). As amostras foram congeladas e liofilizadas e enviadas para a empresa Macrogen, República da Coréia, para a realização do sequenciamento.

Para comparar as seqüências dos isolados obtidos das cinco espécies hospedeiras, com seqüências obtidas junto ao GenBank, foram utilizados o banco de seqüências público ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Para a pesquisa no Genbank, foi utilizado o programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) ([www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)), que compara várias seqüências simultaneamente, contidas em um único arquivo, contra um banco de dados de nucleotídeos.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 População de *Azorhizobium doebereinae* e de outras espécies de BFNNL em solos coletados próximo ao caule e a 10 metros de *Sesbania virgata*

Os solos coletados próximos ao caule e a 10 metros de *S. virgata* apresentaram valores de pH médio de 6,7 e 6,1, respectivamente. Os resultados médios de todas as características químicas, exceto para o enxofre (S), demonstraram que as amostras de solos coletadas próximos ao caule de *S. virgata* apresentaram valores superiores às amostras coletadas a 10 metros do caule de *S. virgata*.

Em todos os cinco experimentos instalados, não foram observados nódulos nos tratamentos controles com N mineral e sem N mineral e sem inoculação, comprovando a ausência de contaminação.

Os nódulos de *S. virgata* e *L. leucocephala* apresentaram crescimento indeterminado, enquanto que os nódulos das outras espécies hospedeiras, *M. atropurpureum*, *P. vulgaris* e *V. unguiculata*, apresentaram crescimento determinado.

#### 4.2.1 *Sesbania virgata*

O controle inoculado com a estirpe BR 5401<sup>T</sup> apresentou um grande número de nódulos (NN), comprovando a alta eficiência desta estirpe quando inoculada em *S. virgata*. No tratamento controle inoculado com a estirpe de *A. caulinodans*, ORS 571<sup>T</sup>, foi observada a presença de pseudonódulos, como observado também por Gonçalves & Moreira (2004). Segundo estes autores, a presença destes pseudonódulos deve-se à proximidade filogenética existente entre *A. doebereinae* e *A. caulinodans*.

Das cinco amostras de solos coletadas próximo do caule de *S. virgata*, somente uma delas (E0) não apresentou BFNNL capazes de formar nódulos nas plantas de *S. virgata*. Os valores de matéria seca da parte aérea (MSPA) dos tratamentos A0, B0, C0 e D0 foram semelhantes e até superior, no caso de C0, ao tratamento em que foi inoculada a estirpe BR 5401<sup>T</sup>. Todos os tratamentos inoculados com estas amostras de solos apresentaram NN superior ao tratamento inoculado com a estirpe BR 5401<sup>T</sup>. Isso pode ser devido a uma maior densidade de BFNNL presente nos solos. Porém, os resultados de peso fresco (PFN) e seco (PSN) dos nódulos das plantas destes tratamentos seguiram tendência inversa aos resultados de NN, sendo considerados inferiores ao tratamento inoculado com a estirpe BR 5401<sup>T</sup>. Os resultados de peso da matéria seca da raiz (MSR) destes tratamentos seguiram, de forma semelhante, o mesmo comportamento dos resultados de PFN e PSN (Tabela 3).

Somente uma das amostras de solo coletada a 10 metros do caule de *S. virgata* (A10) apresentou BFNNL capazes de formar nódulos em *S. virgata*. Porém, o tratamento inoculado com estes solos apresentou MSPA e NN inferior aos tratamentos inoculados com os solos coletados próximo ao caule de *S. virgata* e com a estirpe BR 5401<sup>T</sup> (Tabela 3). Estes resultados podem indicar que a população de BFNNL capazes de nodular *S. virgata* pode estar ocorrendo em baixa densidade neste solo ou devido à ocorrência de relações antagônicas com outros microrganismos.

Esta alta eficiência simbiótica de populações de BFNNL presentes nos solos capazes de nodular *S. virgata* também foi verificada por Florentino (2005). Bala et al. (2003), estudando a simbiose de *S. sesban* com as populações de BFNNL nativas presentes em vários solos, verificaram que esta espécie forma simbiose apenas com uma restrita faixa de microsimbiontes presentes em poucos solos e que esta simbiose é sempre altamente eficiente, assim como

observado para *S. virgata*, indicando que estas espécies apresentam características simbióticas em comum.

Em quatro dos cinco solos testados, não foram encontradas BFNNL capazes de nodular *S. virgata* a distância de 10 metros do caule desta espécie. Florentino (2005), estudando a presença de BFNNL nos solos coletados próximo ao caule e a 4, 20 e 40 metros de *S. virgata*, por meio da inoculação destes no mesmo hospedeiro, verificou que aqueles coletados às distâncias de 20 e 40 metros não apresentaram BFNNL capazes de nodular este hospedeiro. Neste trabalho, observa-se que a influência de *S. virgata* sobre seus simbiossiontes pode ser menor que 10 metros.

TABELA 3 Matéria seca da parte aérea (MSPA), número (NN), peso fresco (PFN) e seco dos nódulos (PSN) e massa seca de raiz (MSR) de plantas de *Sesbania virgata* inoculadas com suspensões de solos coletados próximo ao caule e a 10 metros de *S. virgata*.

Tratamento	MSPA (g planta <sup>-1</sup> )	NN (número planta <sup>-1</sup> )	PFN (mg planta <sup>-1</sup> )	PSN (g planta <sup>-1</sup> )	MSR (g planta <sup>-1</sup> )
Sem N mineral e inoculação	0,08 d	0,00 c	0,00 e	0,00 e	0,14 e
N mineral (28mg.kg <sup>-1</sup> )	1,05 b	0,00 c	0,00 e	0,00 e	0,85 a
BR 5401 <sup>T</sup>	1,08 b	104,75 b	564,75 a	155,00 a	0,72 b
ORS 571 <sup>T</sup> (BR 5410 <sup>T</sup> )	0,11 d	0,00 c	0,00 e	0,00 e	0,19 e
A0	1,03 b	151,50 a	421,75 c	107,00 c	0,53 c
A10	0,70 c	53,00 c	112,50 d	43,75 d	0,32 d
B0	1,07 b	136,25 a	458,50 c	129,50 b	0,65 b
B10	0,10 d	0,00 c	0,00 a1	0,00 e	0,13 e
C0	1,16 a	142,50 a	513,25 b	131,00 b	0,58 c
C10	0,10 d	0,00 c	0,00 e	0,00 e	0,15 e
D0	1,01 b	139,50 a	456,25 c	107,75 c	0,48 c
D10	0,09 d	0,00 c	0,00 e	0,00 e	0,16 e
E0	0,11 d	0,00 c	0,00 e	0,00 e	0,17 e
E10	0,10 d	0,00 c	0,00 e	0,00 e	0,21 e
CV(%)	9,60	18,57	16,88	10,50	15,68

Médias seguidas por uma mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

#### 4.2.2 *Leucaena leucocephala*

Não foram encontrados nódulos nas plantas de *L. leucocephala* inoculadas com a estirpe BR 827. Esta estirpe é recomendada como inoculante para esta espécie e, por isso, foi utilizada como controle positivo para testar se as

condições experimentais eram adequadas à nodulação. Analisando-se o trabalho de Gonçalves & Moreira (2004), observa-se que o tratamento inoculado com esta estirpe apresentou nódulos, tendo os valores de MSPA das plantas sido superior ao tratamento controle em que não foi adicionado N mineral e não foi inoculado. Neste trabalho, como alguns tratamentos apresentaram nódulos é possível que tenha ocorrido algum problema com esta estirpe.

As estirpes de ORS 571<sup>T</sup>, *A. caulinodans* e BR 5401<sup>T</sup>, *A. doebereineriae*, foram capazes de nodular *L. leucocephala*, tendo o tratamento inoculado com esta última sido o que apresentou maior NN, PFN, PSN e MSR em relação ao tratamento inoculado com a estirpe ORS 571<sup>T</sup>. Porém, a MSPA do tratamento inoculado com a estirpe ORS 571<sup>T</sup> foi superior ao tratamento inoculado com a estirpe BR 5401<sup>T</sup>. Estes resultados discordam dos encontrados por Gonçalves & Moreira (2004), que observaram que a inoculação de *L. leucocephala* com estas duas estirpes não apresentou nódulos.

Das 10 amostras de solos coletadas próximo ao caule (0 metro) e a 10 metros de distância de *S. virgata*, que foram inoculadas em *L. leucocephala* apenas cinco, A0, B0, D0, D10 e E10, apresentaram BFNNL capazes de formar simbiose com este hospedeiro. Dos tratamentos inoculados com as amostras de solos coletados próximos ao caule de *S. virgata*, A0, B0 e D0, B0 foi o tratamento que apresentou maior NN e PFN. Os resultados de MSPA dos tratamentos inoculados com as amostras de solo A0 e B0 foram superiores em relação ao tratamento inoculado com D0. A MSR dos tratamentos inoculados com estas três amostras de solos foi semelhante.

O tratamento inoculado com a amostra de solo coletado a 10 metros de distância do caule de *S. virgata*, E10, apresentou maior MSPA, NN, PFN e PSN em relação ao tratamento inoculado com D10 (Tabela 4).

TABELA 4 Matéria seca da parte aérea (MSPA), número (NN), peso fresco (PFN) e seco dos nódulos (PSN) e massa seca de raiz (MSR) de plantas de *L. leucocephala* inoculadas com suspensões de solos coletados às distâncias de 0 e 10 metros do caule de *S. virgata*

Tratamento	MSPA (g planta <sup>-1</sup> )	NN (número planta <sup>-1</sup> )	PFN (mg planta <sup>-1</sup> )	PSN (mg planta <sup>-1</sup> )	MSR (g planta <sup>-1</sup> )
Sem N mineral e inoculação	0,11 f	0,00 e	0,00 f	0,00 e	0,39 c
N mineral (28mg.kg <sup>-1</sup> )	0,63 a	0,00 e	0,00 f	0,00 e	0,62 a
BR 5401 <sup>T</sup>	0,29 c	76,00 a	0,15 d	0,02 d	0,56 a
ORS 571 <sup>T</sup> (BR 5410 <sup>T</sup> )	0,35 b	22,00 c	0,07 e	0,00 e	0,44 b
BR 827	0,10 f	0,00 d	0,00 f	0,00 e	0,32 c
A0	0,25 d	14,00 d	0,34 c	0,06 b	0,27 d
A10	0,21 e	0,00 e	0,00 f	0,00 e	0,28 d
B0	0,23 d	20,00 c	0,38 b	0,04 c	0,27 d
B10	0,10 f	0,00 e	0,00 f	0,00 e	0,28 d
C0	0,22 e	0,00 e	0,00 f	0,00 e	0,23 d
C10	0,20 e	0,00 e	0,00 f	0,00 e	0,26 d
D0	0,22 e	12,00 d	0,15 d	0,02 d	0,27 d
D10	0,21 e	13,00 d	0,00 f	0,02 d	0,36 c
E0	0,20 e	0,00 e	0,00 f	0,00 e	0,23 d
E10	0,25 d	33,00 b	0,67 a	0,09 a	0,26 d
CV(%)	8,20	15,42	16,85	38,95	12,40

Médias seguidas por uma mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

#### 4.2.3 *Macropodium atropurpureum*

A simbiose entre *M. atropurpureum* e a estirpe St<sub>2</sub>12, isolada de solos da Amazônia, foi eficiente, concordando com os resultados de experimentos anteriores.

Das duas espécies do gênero *Azorhizobium*, somente a estirpe de *A. doebereineriae* foi capaz de nodular *M. atropurpureum*. Os nódulos encontrados foram nódulos pequenos e de coloração branca. O resultado da MSPA do tratamento inoculado com esta estirpe foi semelhante ao resultado de MSPA do tratamento sem inoculação e sem N mineral. O tratamento inoculado com a estirpe de *A. caulinodans*, ORS 571<sup>T</sup>, não apresentou nodulação (Tabela 5).

Gonçalves & Moreira (2004) também verificaram que as duas espécies do gênero *Azorhizobium* foram capazes de nodular *M. atropurpureum*.

Todas as amostras de solos coletadas próximo ao caule (0 metro) e a 10 metros de distância de *S. virgata* apresentaram BFNNL capazes de formar simbiose com *M. atropurpureum*, comprovando-se a alta promiscuidade deste hospedeiro.

Das populações nativas de BFNNL presentes nas amostras de solo coletadas próximo ao caule de *S. virgata*, A0, B0, C0, D0 e E0, o tratamento inoculado com a amostra B0 foi o que apresentou valores superiores de MSPA, NN, PFN e PSN em relação aos tratamentos inoculados com as outras amostras de solos. Porém, estes valores foram inferiores ao tratamento inoculado com a estirpe St<sub>2</sub>12.

De acordo com os resultados de MSPA, NN e PFN dos tratamentos inoculados com as amostras de solos coletadas a 10 metros de distância de *S. virgata*, A10, B10, C10, D10 e E10, observa-se que o tratamento inoculado com a amostra E10 foi superior aos demais tratamentos, tendo os valores de NN e PFN deste tratamento sido superior aos valores do tratamento inoculado com a estirpe St<sub>2</sub>12.

TABELA 5 Matéria seca da parte aérea (MSPA), número (NN), peso fresco (PFN) e seco dos nódulos (PSN) e massa seca de raiz (MSR) de plantas de *M. atropurpureum* inoculadas com suspensões de solos coletados próximo e a 10 metros de distância do caule de *S. virgata*.

Tratamento	MSPA (g planta <sup>-1</sup> )	NN (número planta <sup>-1</sup> )	PFN (mg planta <sup>-1</sup> )	PSN (mg planta <sup>-1</sup> )	MSR (g planta <sup>-1</sup> )
Sem N mineral e inoculação	0,02 f	0,00 g	0,00 g	0,00 e	0,02 d
N mineral (28mg.kg <sup>-1</sup> )	0,21 a	0,00 g	0,00 g	0,00 e	0,14 a
BR 5401 <sup>T</sup>	0,02 f	10,75 d	21,25 f	3,50 e	0,01 d
ORS 571 <sup>T</sup> (BR 5410 <sup>T</sup> )	0,02 f	0,00 g	0,00 g	0,00 e	0,02 d
St <sub>2</sub> 12	0,18 b	29,50 b	151,75 b	34,75 a	0,04 c
A0	0,06 e	4,25 f	41,75 e	9,00 d	0,03 d
A10	0,04 e	3,25 f	38,00 e	6,75 d	0,04 c
B0	0,08 d	23,25 c	83,25 d	19,75 c	0,05 c
B10	0,09 d	20,25 c	125,25 c	17,50 c	0,05 c
C0	0,02 f	6,25 f	22,75 f	9,25 d	0,04 c
C10	0,10 d	30,00 b	146,50 b	24,25 b	0,04 c
D0	0,04 e	7,25 e	35,75 e	7,50 d	0,02 d
D10	0,03 f	5,00 f	90,75 d	5,00 d	0,03 d
E0	0,04 e	4,75 f	19,00 f	9,25 d	0,03 d
E10	0,14 c	50,00 a	190,00 a	18,00 c	0,09 b
CV(%)	18,48	33,27	20,33	32,86	29,39

Médias seguidas por uma mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

#### 4.2.4 *Phaseolus vulgaris*

As estirpes de *A. doebereinae* e *A. caulinodans* formaram um grande número de nódulos pequenos e coloração branca. Os resultados de MSPA dos tratamentos inoculados com estas duas estirpes foram semelhantes ao tratamento sem inoculação e sem N mineral. A capacidade de nodução em plantas de *P.*

*vulgaris*, quando inoculadas com estas duas estirpes, também foram observadas por Gonçalves & Moreira (2004).

Somente uma das amostras de solo coletadas próximo ao caule de *S. virgata*, E0, não apresentou BFNNL capazes de induzir a formação de nódulos em *P. vulgaris*. Dos tratamentos que apresentaram nódulos, observa-se que A0, B0 e C0 apresentaram valores de NN e PFN semelhantes a até superiores ao tratamento inoculado com a estirpe CIAT 899<sup>T</sup>. Porém, os resultados de MSPA e PSN dos tratamentos inoculados com estas amostras de solos seguiram a mesma tendência, sendo estes valores inferiores ao tratamento inoculado com a estirpe CIAT 899<sup>T</sup>.

Como observado para as amostras de solo coletadas próximo ao caule de *S. virgata*, verificou-se também que das cinco amostras de solo coletadas a 10 metros de distância, somente uma, D10, não apresentou BFNNL capazes de nodular *P. vulgaris*. Dos tratamentos que apresentaram nodulação, A10, B10, C10 e E10, este último apresentou NN e PFN superior ao tratamento inoculado com a estirpe CIAT 899<sup>T</sup>.

TABELA 6 Matéria seca da parte aérea (MSPA), número (NN), peso fresco (PFN) e seco dos nódulos (PSN) e massa seca de raiz (MSR) de plantas de *P. vulgaris* inoculadas com suspensões de solos coletados próximo e a 10 metros de distância do caule de *S. virgata*.

Tratamento	MSPA (g planta <sup>-1</sup> )	NN (número planta <sup>-1</sup> )	PFN (mg planta <sup>-1</sup> )	PSN (mg planta <sup>-1</sup> )	MSR (g planta <sup>-1</sup> )
Sem N mineral e inoculação	0,23 e	0,00 e	0,00 e	0,00 e	0,22 b
N mineral (28mg.kg <sup>-1</sup> )	0,84 a	0,00 e	0,00 e	0,00 e	0,33 a
BR 5401 <sup>T</sup>	0,25 e	105,00 b	143,25 d	16,25 d	0,18 c
ORS 571 <sup>T</sup> (BR 5410 <sup>T</sup> )	0,25 e	81,25 c	179,75 d	18,75 d	0,19 c
CIAT 899 <sup>T</sup> (BR 322 <sup>T</sup> )	0,58 b	86,25 c	341,50 c	61,50 a	0,15 c
A0	0,38 d	94,75 b	283,75 c	31,25 c	0,18 c
A10	0,41 c	77,75 c	346,50 c	37,75 c	0,18 c
B0	0,41 c	68,75 c	530,75 b	50,75 b	0,16 c
B10	0,36 d	39,00 d	150,00 d	16,75 d	0,22 b
C0	0,49 c	150,50 a	275,00 c	38,25 c	0,22 b
C10	0,41 c	34,00 d	38,00 e	3,50 e	0,21 b
D0	0,34 d	37,00 d	171,75 d	12,50 d	0,21 b
D10	0,36 d	0,00 e	0,00 e	0,00 e	0,21 b
E0	0,32 e	0,00 e	0,00 e	0,00 e	0,18 c
E10	0,35 d	94,25 b	775,00 a	64,50 a	0,18 c
CV (%)	13,08	19,98	30,97	24,25	9,93

Médias seguidas por uma mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

#### 4.2.5 *Vigna unguiculata*

As estirpes de *A. doebereineriae* e *A. caulinodans* formaram nódulos pequenos e de coloração branca, em *V. unguiculata*. Estas características, aliadas aos baixos valores do peso da matéria seca da parte aérea (MSPA), encontrados

nos tratamentos inoculados com estas estirpes, indicam que a simbiose é ineficiente (Tabela 7). Gonçalves & Moreira (2004) não verificaram a presença de nódulos em *V. unguiculata* quando inoculadas com estas duas estirpes do gênero *Azorhizobium*.

Três das amostras de solos coletadas próximo ao caule de *S. virgata*, B0, C0 e D0 apresentaram BFNNL que formaram nódulos em *V. unguiculata*. Destes tratamentos, B0 apresentou valores de NN, PFN, PSN e MSR semelhantes aos tratamentos inoculados com as estirpes recomendadas como inoculante para esta cultura, UFLA 03-84 e INPA 03-11B. O tratamento inoculado com B0 apresentou valor de MSPA superior aos tratamentos inoculados com as estirpes inoculantes.

Das amostras de solos coletadas a 10 metros de distância de *S. virgata*, quatro delas, B10, C10, D10 e E10, apresentaram BFNNL que formaram nódulos em *V. unguiculata*. Dos tratamentos inoculados com estas quatro amostras de solos, E10 apresentou valores de MSPA, NN, PFN e PSN superiores aos demais. O tratamento inoculado com a amostra E10 apresentou valores de NN semelhantes aos tratamentos inoculados com as duas estirpes inoculantes.

TABELA 7 Matéria seca da parte aérea (MSPA), número (NN), peso fresco (PFN) e seco dos nódulos (PSN) e massa seca de raiz (MSR) de plantas de *V. unguiculata* inoculadas com suspensões de solos coletados às distâncias de 0 e 10 metros do caule de *S. virgata*

Tratamento	MSPA (g planta <sup>-1</sup> )	NN (número planta <sup>-1</sup> )	PFN (mg planta <sup>-1</sup> )	PSN (mg planta <sup>-1</sup> )	MSR (g planta <sup>-1</sup> )
Sem N mineral e inoculação	0,09 f	0,00 f	0,00 e	0,00 f	0,11 c
N mineral (28mg.kg <sup>-1</sup> )	0,72 a	0,00 f	0,00 e	0,00 f	0,19 a
BR 5401 <sup>T</sup>	0,08 f	32,00 b	0,017 e	0,01 e	0,10 c
ORS 571 <sup>T</sup> (BR 5410 <sup>T</sup> )	0,07 f	30,00 b	0,019 e	0,01 e	0,08 c
UFLA 03-84	0,30 c	40,00 a	0,28 b	0,07 a	0,12 b
INPA 03-11B	0,22 d	45,00 a	0,36 a	0,07 a	0,13 b
A0	0,10 f	0,00 f	0,00 e	0,00 f	0,10 c
A10	0,17 e	0,00 f	0,00 e	0,00 f	0,13 b
B0	0,47 b	45,00 a	0,38 a	0,07 a	0,12 b
B10	0,16 e	17,00 c	0,19 c	0,01 e	0,08 c
C0	0,20 d	35,00 b	0,22 c	0,07 a	0,11 b
C10	0,23 d	18,00 c	0,13 d	0,02 d	0,12 b
D0	0,15 e	3,00 e	0,04 e	0,01 e	0,11 b
D10	0,19 e	6,00 d	0,18 c	0,03 c	0,13 b
E0	0,15 e	0,00 f	0,00 e	0,00 f	0,09 c
E10	0,33 c	40,00 a	0,30 b	0,04 b	0,12 b
CV(%)	18,05	21,44	31,90	20,76	12,33

Médias seguidas por uma mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

Uma visão geral dos experimentos instalados com as cinco espécies vegetais inoculadas com amostras de solos coletadas a 0 e 10 metros do caule de *S. virgata*, em casa de vegetação, é mostrada na Figura 2.

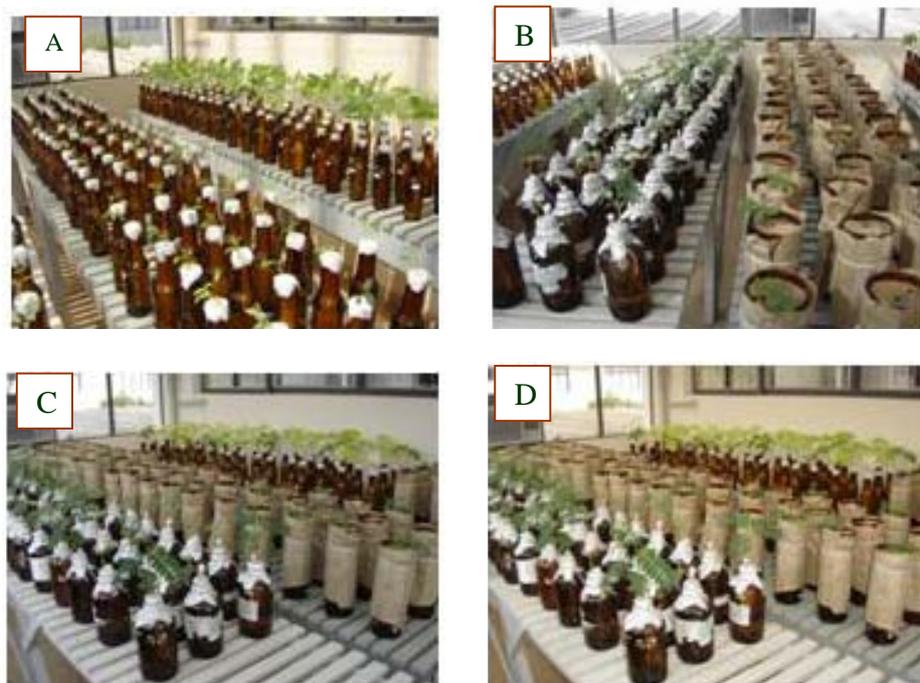


FIGURA 2 Visão geral dos experimentos instalados em casa de vegetação (A) *M. atropurpureum* (à esquerda) e *V. unguiculata* (à direita); (B) *S. virgata* (à esquerda) e *L. leucocephala* (direita); (C) e (D) *S. virgata*, *L. leucocephala* e *P. vulgaris* (à direita).

### 4.3 Caracterização cultural

Foi obtido um total de 421 isolados de nódulos das cinco espécies hospedeiras, sendo 80 de *S. virgata*, 42 de *L. leucocephala*, 91 de *M. atropurpureum*, 126 de *P. vulgaris* e 82 de *V. unguiculata* (Tabela 8). Noventa e seis por cento dos isolados de *S. virgata* apresentaram características culturais semelhantes à estirpe de *A. doebereinae*, BR 5401<sup>T</sup>, ou seja, tempo de crescimento rápido, reação alcalina em meio de cultura e escassa produção de goma.

A maioria dos isolados de *S. virgata* e alguns isolados obtidos dos outros hospedeiros promíscuos, *L. leucocephala*, *M. atropurpureum*, *P. vulgaris* e *V. unguiculata*, apresentaram características culturais similares. Porém, os isolados de *S. virgata* apresentaram quantidade de goma inferior aos outros isolados, sendo considerada produção de goma escassa e para os demais isolados a produção de goma foi considerada baixa.

Todos os isolados obtidos das cinco espécies hospedeiras foram agrupados em sete tipos culturais descritos a seguir: isolados que apresentaram tempo de crescimento rápido e intermediário que acidificaram, alcalinizaram e os que não produziram reação no meio de cultura e os isolados que apresentaram tempo de crescimento lento e que alcalinizaram o meio de cultura conforme Figura 3.

*S. virgata* apresentou nódulos de crescimento indeterminado e observou-se que, imediatamente após a maceração destes nódulos sobre o meio de cultura 79, ocorreu a alcalinização do meio de cultura. Todos os 80 isolados de *S. virgata* apresentaram crescimento rápido e baixa diversidade morfológica, tendo 96% destes isolados apresentado características culturais semelhantes a *A. doebereineriae*, tempo de crescimento rápido, reação alcalina no meio de cultura e produção de goma escassa (Figura 3.A).

TABELA 8 Número de isolados obtidos dos nódulos das cinco espécies leguminosas inoculadas com solos coletados próximo ao caule e a 10 metros de *S. virgata*. Os valores entre parênteses indicam o número de isolados que apresentaram tempo de crescimento rápido (2-3 dias) e reação alcalina em meio de cultura.

Solos	Ll <sup>1</sup>	Ma <sup>2</sup>	Pv <sup>3</sup>	Vu <sup>4</sup>	Total
A0	5(0)	13(2)	19(1)	0(0)	37(3)
A10	0	8(2)	17(1)	0(0)	25(3)
B0	16(16)	11(4)	16(7)	14(1)	57(28)
B10	0	15(5)	13(1)	12(2)	40(8)
C0	0	5(0)	19(3)	15(1)	39(4)
C10	0	14(1)	9(0)	15(0)	38(1)
D0	6(0)	7(1)	17(7)	8(2)	38(10)
D10	4(4)	7(0)	0(0)	4(2)	15(6)
E0	0	4(0)	0(0)	0(0)	4(0)
E10	11(11)	7(3)	16(6)	10(0)	44(20)
Total/ Planta	42(31)	91(18)	126(26)	82(8)	341(83)

<sup>1</sup>isolados de *L. leucocephala*; 2 isolados de *M. atropurpureum*; 3 isolados de *P. vulgaris* e 4 isolados de *V. unguiculata*

A maioria dos isolados de *L. leucocephala*, 76%, apresentou tempo de crescimento rápido, reação alcalina em meio de cultura e produção de goma superior à de *A. doebereineriae*. Estes isolados foram obtidos dos tratamentos inoculados com as amostras B0, D10 e E10. O outro grupo, 24%, constituiu-se de isolados que apresentaram crescimento intermediário, produzindo reação ácida em meio de cultura 79 e média produção de goma (Figura 3.B).

*L. leucocephala* é considerada uma espécie promíscua e capaz de formar simbiose com BFNNL de crescimento rápido dos gêneros *Mesorhizobium*, *Rhizobium* e *Sinorhizobium* (Moreira et al., 1998), porém, os resultados mostram que nenhum dos isolados de *L. leucocephala* apresentou características culturais semelhantes aos gêneros citados acima.

Wang et al. (1999), estudando a diversidade de isolados de nódulos de *L. leucocephala* cultivada em dois tipos distintos de solos, um em que havia sido cultivado anteriormente com feijão e o outro em que não havia sido cultivado com nenhuma cultura. Eles verificaram que os isolados de *L. leucocephala* cultivada no primeiro solo, apresentaram menor diversidade. De acordo com os autores o cultivo com feijão alterou a população de BFNNL e este efeito refletiu nas populações encontradas nos nódulos de *L. leucocephala*. No caso deste trabalho, observa-se situação semelhante, uma vez que foi encontrada uma baixa diversidade cultural entre os isolados.

O *M. atropurpureum* foi a espécie hospedeira que apresentou maior promiscuidade, pois seus isolados foram classificados em seis tipos culturais e também foram capazes de formar simbiose com bactérias nodulíferas presentes em todos os solos. Estes isolados apresentaram grande diversidade cultural, tendo, dos 91 isolados, 18 apresentando características culturais semelhantes aos isolados obtidos de *L. leucocephala*, ou seja, tempo de crescimento rápido, reação alcalina em meio de cultura e produção de goma superior à de *A. doebereineriae*. Estes isolados foram obtidos de amostras de solos coletados próximos ao caule, A0, B0 e D0 e a 10 metros de *S. virgata*, A10, B10, C10 e E10 (Figura 3.C).

Esta grande diversidade cultural entre os isolados de nódulos de *M. atropurpureum* também foi encontrada por Jesus et al. (2005). Entretanto, estes autores não relatam a presença de isolados que apresentam crescimento rápido, reação alcalina no meio de cultura e baixa produção de goma, característica do gênero *Azorhizobium*. Isso indica a ausência deste gênero nos solos estudados por estes autores.

Foram obtidos 126 isolados de nódulos de *P. vulgaris*. Todos os isolados apresentaram tempo de crescimento rápido e uma grande variação quanto à reação no pH do meio de cultura. Vinte e seis isolados apresentaram

características culturais semelhantes aos isolados a alguns isolados obtidos de *L. leucocephala* e *M. atropurpureum*. Dos 26 isolados, 18 foram encontrados em tratamentos inoculados com amostras de solos coletadas próximos do caule de *S. virgata*, A0, B0, C0 e D0 (Figura 3.D).

Não foi encontrado nenhum trabalho que mostra que *P. vulgaris* apresenta a capacidade de capturar isolado com característica cultural semelhante ao gênero *Azorhizobium* do solo. Melloni et al. (2006) obtiveram isolados com características distintas do gênero *Rhizobium* de nódulos de *P. vulgaris*, mas nenhum destes isolados apresentou características semelhantes ao gênero *Azorhizobium*.

Dos 82 isolados de *V. unguiculata*, 52 apresentaram crescimento rápido e, destes, oito isolados apresentaram características culturais semelhantes aos isolados de *L. leucocephala*, *M. atropurpureum* e *P. vulgaris* (Figura 3.E).

Melloni et al. (2006) verificaram que a maioria dos isolados de *V. unguiculata* apresentou características semelhantes ao gênero *Bradyrhizobium*, crescimento rápido, produção alcalina em meio de cultura e produção de goma variando entre baixa e média, em meio de cultura 79.

Analisando-se os tipos culturais dos isolados BFNNL obtidos de nódulos de *L. leucocephala*, *M. atropurpureum*, *P. vulgaris* e *V. unguiculata*, observa-se que cada hospedeiro foi capaz de capturar BFNNL dos solos com características distintas da que é relatada na literatura (Jesus et al., 2005; Lafay & Burdon, 1998; Melloni et al., 2006).

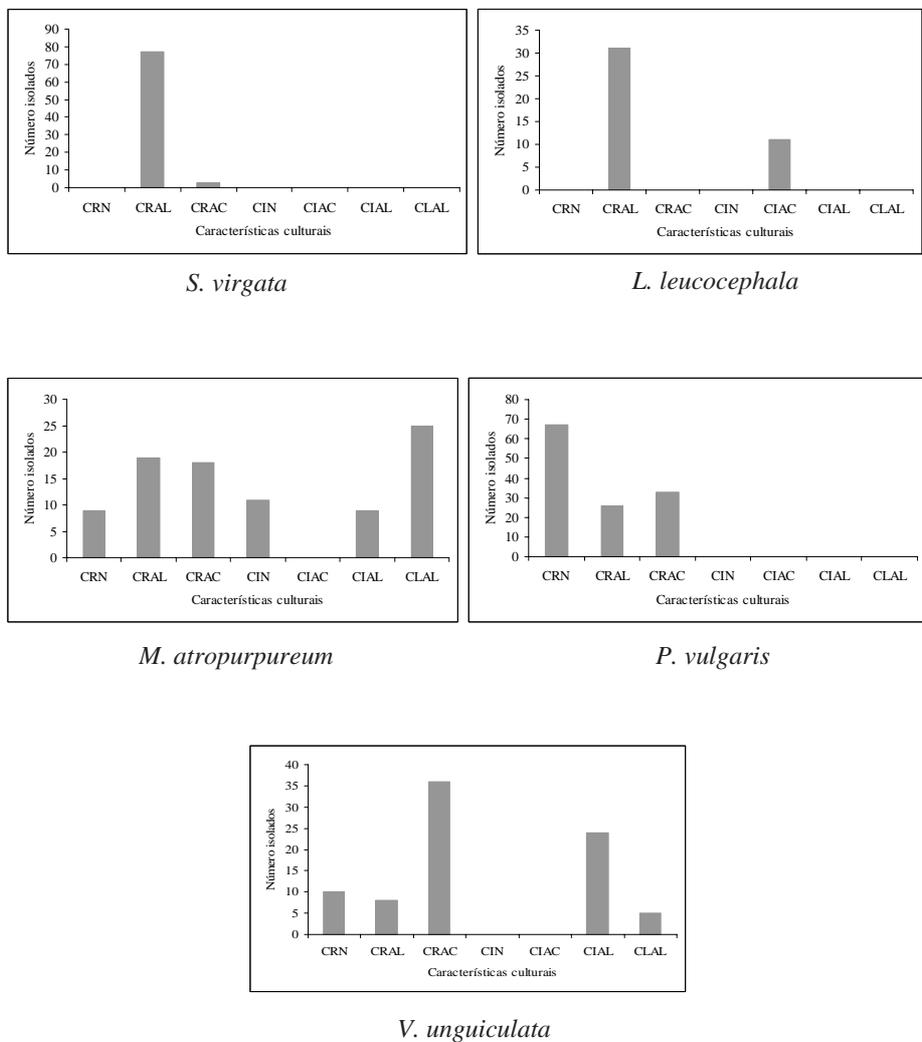


FIGURA 3 Distribuição dos isolados de bactérias 7 tipos culturais em meio de cultura 79: CRN – crescimento rápido e não produz reação no meio de cultura; CRAL – crescimento rápido e alcaliniza o meio de cultura; CRAC – crescimento rápido e acidifica o meio de cultura; CIN – crescimento intermediário e não produz reação no meio de cultura; CIAC – crescimento intermediário e acidifica o meio de cultura; CIAL – crescimento intermediário e alcaliniza o meio de cultura; CLAL – crescimento lento e alcaliniza o meio de cultura.

#### **4.4 Autenticação e eficiência simbiótica dos isolados de *L. leucocephala*, *M. atropurpureum*, *P. vulgaris* e *V. unguiculata***

As características culturais dos isolados utilizados na inoculação de *L. leucocephala*, *M. atropurpureum*, *P. vulgaris* e *V. unguiculata* encontram-se na Tabela 9. Na primeira linha da tabela estão os isolados que apresentaram características similares ao gênero *Azorhizobium*, porém, com quantidade de goma um pouco maior.

TABELA 9 Características culturais dos isolados de *L. leucocephala*, *M. atropurpureum*, *P. vulgaris* e *V. unguiculata* reinoculados nos hospedeiros de origem.

Isolados	A <sup>1</sup>	B <sup>2</sup>	C <sup>3</sup>	D <sup>4</sup>	E <sup>5</sup>
<b>LeB0I2, LeB0I4, LeB0IV2, LeE10I1, LeB0IV4, LeD0II4 MaB10III4, FB0III1, FB0IV1, FC0III2, FC0III3b, FD0II2, FD0II4, FD0IV4b, FE10I4, FE10III1</b>	<b>rápido</b>	<b>alcalino</b>	<b>baixa</b>	<b>branca</b>	<b>não</b>
MaE0IV3	rápido	ácido	alta	amarela	sim
MaE0IV2, FC0II4	rápido	ácido	alta	amarela	não
VuB0I2, VuB10IV1, VuB10IV2, VuC10I4	rápido	ácido	baixa	amarela	não
FA0III3b, FC0III3a	rápido	neutro	média	creme	não
MaE10II2	rápido	neutro	alta	creme	não
MaE10III1	intermediário	neutro	baixa	creme	não
MaC0IV1	intermediário	neutro	baixa	creme	não
LeA0III2, LeA0III3	intermediário	ácido	média	amarela	não
VuB0I1, VuC10I2, VuC10I3, VuC0II1, VuC0IV3, VuC0IV4, VuE10IV3, VuE10IV4	intermediário	alcalino	baixa	creme	não
MaA0II3, MaA10IV1, MaB0I4, MaD10I4, VuB10I4	lento	alcalino	média	creme	não
MaD0IV1, MaD0IV2	lento	alcalino/ácido	baixa	branca	não

<sup>1</sup> Tempo de aparecimento da colônia isolada; <sup>2</sup> Alteração do pH em meio 79; <sup>3</sup> Produção de goma; <sup>4</sup> Cor da colônia; <sup>5</sup> Absorção do indicador (azul de bromotimol)

#### 4.4.1 *Leucaena leucocephala*

Como observado no experimento anterior, as estirpes de *Azorhizobium caulinodans* (ORS 571<sup>T</sup>) e *A. doebereineriae* (BR 5401<sup>T</sup>) formaram nódulos em *L. leucocephala*. O tratamento inoculado com a estirpe BR 827 não apresentou nodulação.

Dos oito isolados de *L. leucocephala*, testados quanto à capacidade de nodular seu hospedeiro de origem seis deles, LeB0I2, LeB0I4, LeB0IV2, LeB0IV4, LeD0II4 e LeE10I1 apresentaram características culturais similares ao gênero *Azorhizobium*, apresentando crescimento rápido, reação alcalina no meio de cultura, porém, produção de goma superior à *A. doebereinae*. Destes três, LeB0I4, LeB0IV2 e LeB0IV4 não formaram nódulos em seu hospedeiro original. Os dois isolados que apresentaram crescimento intermediário e reação ácida em meio de cultura foram capazes de nodular *L. leucocephala* (Tabela 10).

TABELA 10 Autenticação de isolados de *L. leucocephala* inoculados em seu hospedeiro de origem

Tratamentos	Nodulação
Sem N mineral e inoculação	-
N mineral (28mg.kg <sup>-1</sup> )	-
BR 5401 <sup>T</sup>	+
ORS 571 <sup>T</sup> (BR 5410 <sup>T</sup> )	+
BR 827	-
LeA0III2	+
LeA0III3	+
LeB0I2	+
LeB0I4	-
LeB0IV2	-
LeB0IV4	-
LeD0II4	+
LeE10I1	+

#### 4.4.2 *Macropodium atropurpureum*

Não foi observada nodulação nas plantas de *M. atropurpureum* inoculadas com a estirpe de *Azorhizobium caulinodans* (ORS 571<sup>T</sup>). Já a nodulação de *M. atropurpureum* com a estirpe de *A. doebereinae* (BR 5401<sup>T</sup>)

foi ineficiente, não contribuindo para o desenvolvimento do peso da matéria seca da parte aérea (MSPA) das plantas (Tabela 11).

Das características culturais dos 12 isolados de *M. atropurpureum* inoculados em seu hospedeiro original, somente o isolado MaB10III4 apresentou tempo de crescimento rápido e reação alcalina em meio de cultura. O tratamento inoculado com este isolado apresentou MSPA superior aos tratamentos inoculados com as estirpes BR 5401<sup>T</sup> e St<sub>2</sub>12.

MaE0IV3 foi o único isolado que não nodulou *M. atropurpureum*. Dos 11 isolados que nodularam o *M. atropurpureum*, oito deles proporcionaram desenvolvimento no peso da matéria seca da parte aérea (MSPA) das plantas igual ou superior àquelas que foram inoculadas com a estirpe ST<sub>2</sub>12, indicando a necessidade de novos estudos, uma vez que estes isolados apresentaram grande potencial em fixar N<sub>2</sub>.

TABELA 11 Resultados de matéria seca da parte aérea (MSPA), número (NN), peso fresco (PFN) e seco dos nódulos (PSN) e massa seca de raiz (MSR) de plantas de *M. atropurpureum* inoculadas com BFNNL obtidas do próprio hospedeiro.

Tratamento	MSPA (g.planta <sup>-1</sup> )	NN (número. planta <sup>-1</sup> )	PFN (mg.planta <sup>-1</sup> )	PSN (mg.planta <sup>-1</sup> )	MSR (g.planta <sup>-1</sup> )
Sem N mineral e inoculação	0,026 f	0,00 g	0,00 g	0,00 f	0,027 d
N mineral (28mg.kg <sup>-1</sup> )	0,143 a	0,00 g	0,00 g	0,00 f	0,057 a
St <sub>2</sub> 12	0,046 d	18,75 d	0,035 e	0,007 e	0,020 e
BR 5401 <sup>T</sup>	0,023 f	23,25 c	0,021 f	0,003 f	0,025 d
ORS 571 <sup>T</sup> (BR 5410 <sup>T</sup> )	0,022 f	0,00 g	0,00 g	0,00 f	0,025 d
MaA0II3	0,061 c	22,00 c	0,072 c	0,016 c	0,024 d
MaA10IV1	0,044 d	11,00 f	0,044 e	0,011 d	0,020 e
MaB0I4	0,095 b	42,50 a	0,107 b	0,021 b	0,035 b
MaB10III4	0,064 c	22,75 c	0,070 c	0,018 c	0,025 d
MaC0IV1	0,039 e	24,25 c	0,040 e	0,013 d	0,030 c
MaD0IV1	0,036 e	38,00 b	0,056 d	0,013 d	0,030 c
MaD0IV2	0,026 f	13,00 f	0,036 e	0,009 e	0,017 e
MaD10I4	0,059 c	16,25 e	0,033 e	0,007 e	0,024 d
MaE0IV2	0,109 b	37,75 b	0,107 b	0,022 b	0,036 b
MaE0IV3	0,025 f	0,00 g	0,00 g	0,00 f	0,035 b
MaE10II1	0,056 c	16,25 e	0,055 d	0,030 a	0,019 e
MaE10II2	0,100 b	22,50 c	0,119 a	0,011 d	0,039 b
CV(%)	16,84	12,60	14,04	25,15	12,44

Médias seguidas por uma mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

#### 4.4.3. *Phaseolus vulgaris*

Os tratamentos inoculados com as estirpes ORS 571<sup>T</sup> de *A. caulinodans* e BR 5401<sup>T</sup> de *A. doebereïnerae* apresentaram nódulos inefectivos. Resultados semelhantes foram encontrados trabalhos em que mostram que o *P. vulgaris*

forma nódulos inefectivos quando inoculado com a estirpe BR 5401<sup>T</sup> (Gonçalves & Moreira, 2004) e ORS 571<sup>T</sup> (Gonçalves & Moreira, 2004 e Michiels et al., 1998).

Dos doze isolados inoculados em plantas de *P. vulgaris*, cinco não formaram nódulos em seu hospedeiro de origem, dentre os quais, três apresentaram tempo de crescimento rápido, reação alcalina em meio de cultura e produção de goma superior a *A. doebereineriae*. Dos isolados que nodularam o *P. vulgaris*, nenhum foi capaz de proporcionar desenvolvimento da MSPA semelhante aos tratamentos em que foi adicionado N mineral e inoculado com a estirpe CIAT 899<sup>T</sup> (Tabela 12).

Anyango et al. (1995), estudando a efetividade simbiótica de isolados de BFNNL oriundos de solos de diferentes pHs (4,5 e 6,8), por meio da inoculação destes em seu hospedeiro de origem, *P. vulgaris*, verificaram que os isolados obtidos de ambos os solos apresentaram efetividade variada. Alguns isolados apresentaram efetividade igual e até superior ao tratamento inoculado com a estirpe CIAT 899<sup>T</sup>.

TABELA 12 Resultados de matéria seca da parte aérea (MSPA), número (NN), peso fresco (PFN) e seco dos nódulos (PSN) e massa seca de raiz (MSR) de plantas de *P. vulgaris* inoculadas com BFNNL obtidas do próprio hospedeiro.

Tratamentos	MSPA (g.planta <sup>-1</sup> )	NN (nódulos. planta <sup>-1</sup> )	PFN (mg.planta <sup>-1</sup> )	PSN	MSR (g.planta <sup>-1</sup> )
Sem N mineral e inoculação	0,24 e	0,00 h	0,00 g	0,00 c	0,201 c
N mineral (28mg.kg <sup>-1</sup> )	0,49 a	0,00 h	0,00 g	0,00 c	0,283 a
CIAT 899 <sup>T</sup> (BR 322 <sup>T</sup> )	0,47 a	119,50 c	0,322 d	0,056 a	0,215 b
BR 5401 <sup>T</sup>	0,24 e	106,25 c	0,039 f	0,033 b	0,221 b
ORS 571 <sup>T</sup> (BR 5410 <sup>T</sup> )	0,24 e	18,50 f	0,061 f	0,008 c	0,245 b
FA0III3b	0,31 c	109,75 c	0,347 d	0,062 a	0,138 d
FB0III1	0,28 d	146,00 b	0,388 c	0,365 b	0,197 c
FB0IV1	0,26 e	205,25 a	0,591 a	0,058 a	0,204 c
FC0II4	0,25 e	0,00 h	0,00 g	0,00 c	0,221 b
FC0III2	0,29 d	0,00 h	0,00 g	0,00 c	0,259 a
FC0III3a	0,22 e	0,00 h	0,00 g	0,00 c	0,191 c
FC0III3b	0,35 b	0,00 h	0,00 g	0,00 c	0,231 b
FD0IVb	0,19 f	0,00 h	0,00 g	0,00 c	0,227 b
FD0II4	0,24 e	9,00 g	0,027 g	0,028 b	0,236 b
FD0IV4b	0,27 d	54,50 e	0,100 e	0,027 b	0,228 b
FE10I4	0,21 f	116,00 c	0,439 b	0,041 b	0,172 c
FE10III1	0,28 d	85,25 d	0,560 a	0,056 a	0,211 b
CV(%)	8,31	23,69	17,59	59,27	7,86

Médias seguidas por uma mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

#### 4.4.4 *Vigna unguiculata*

Dos treze isolados de *V. unguiculata*, somente três não formaram nódulos em seu hospedeiro de origem. Entre os isolados que nodularam *V.*

*unguiculata*, somente os tratamentos inoculados com os isolados VuC10I4 e VuE10IV4 apresentaram valores de MSPA inferior aos tratamentos em que foi adicionado N mineral e inoculado com as estirpes recomendadas pela RELARE. Os outros tratamentos inoculados com os isolados VuB0I1, VuB10I4, VuC0II1, VuC0IV3, VuC0IV4, VuC10I2, VuC10I3 e VuE10IV3 apresentaram valores de MSPA iguais ou superiores aos dos tratamentos inoculados com as estirpes UFLA 03-84 e INPA 03-11B, indicadas pela RELARE como inoculantes para o *V. unguiculata*, indicando a necessidade de novos estudos, uma vez que estes isolados apresentaram grande potencial em fixar N<sub>2</sub> (Tabela 13).

TABELA 13 Resultados de matéria seca da parte aérea (MSPA), número (NN), peso fresco (PFN) e seco dos nódulos (PSN) e massa seca de raiz (MSR) de plantas de *V. unguiculata* inoculadas com BFNNL obtidas do próprio hospedeiro.

Tratamentos	MSPA (g.planta <sup>-1</sup> )	NN (número. planta <sup>-1</sup> )	PFN (mg.planta <sup>-1</sup> )	PSN	MSR (g.planta <sup>-1</sup> )
Sem N mineral e sem inoculação	0,051 g	0,00 h	0,00 g	0,00 d	0,076 g
N mineral (28mg.kg <sup>-1</sup> )	0,364 c	0,00 h	0,00 g	0,00 d	0,134 d
UFLA 03-84	0,348 c	37,25 d	0,263 e	0,060 b	0,124 e
INPA 03-11B	0,393 c	51,00 b	0,385 a	0,077 a	0,129 d
BR 5401 <sup>T</sup>	0,053 g	17,75 g	0,032 g	0,001 d	0,100 f
ORS 571 <sup>T</sup> (BR 5410 <sup>T</sup> )	0,068 g	17,00 g	0,029 g	0,001 d	0,103 f
VuB0I1	0,468 a	52,75 b	0,356 b	0,064 b	0,189 a
VuB0I2	0,095 f	0,00 h	0,00 g	0,00 d	0,105 f
VuB10I4	0,467 a	36,75 d	0,353 b	0,062 b	0,164 b
VuB10IV1	0,097 f	0,00 h	0,00 g	0,00 d	0,114 e
VuB10IV2	0,061 g	0,00 h	0,00 g	0,00 d	0,095 f
VuC0II1	0,384 c	39,00 d	0,323 c	0,056 b	0,165 b
VuC0IV3	0,494 a	77,50 a	0,415 a	0,084 a	0,154 c
VuC0IV4	0,443 b	34,50 d	0,289 d	0,073 a	0,139 d
VuC10I2	0,456 a	35,00 d	0,314 c	0,073 a	0,147 c
VuC10I3	0,477 a	35,00 d	0,294 d	0,065 b	0,151 c
VuC10I4	0,266 e	23,25 f	0,184 f	0,046 c	0,098 f
VuE10IV3	0,417 b	45,25 c	0,339 c	0,066 b	0,148 c
VuE10IV4	0,307 d	30,75 e	0,212 f	0,049 c	0,092 f
CV(%)	8,46	11,56	12,18	17,43	9,85

Médias seguidas por uma mesma letra, na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade.

#### 4.5 Simbiose entre *S. virgata* e isolados de diferentes espécies hospedeiras que apresentaram características culturais semelhantes à *A. doebereineriae*

Os isolados das quatro espécies leguminosas que apresentaram características culturais, como tempo de crescimento rápido e reação alcalina em meio de cultura, não foram capazes de nodular *S. virgata*. Destes, os isolados LeE10I1, MaB10III4 e FB0III1 foram autenticados e nodularam seus hospedeiros de origem, respectivamente, *L. leucocephala*, *M. atropurpureum* e *P. vulgaris*.

Todos os isolados obtidos de *S. virgata* nodularam *S. virgata*.

TABELA 14 Nodulação de *S. virgata* inoculada com isolados obtidos de diferentes espécies hospedeiras que apresentaram tempo de crescimento rápido e reação alcalina em meio de cultura.

<i>Isolados</i>	<i>Hospedeiro de origem</i>	<i>Nodulação</i>
SVC0II4, SVD0III1, SVB0I4, SVB0II2, SVC0III3, SVC0I1, SVD0I2	<i>S. virgata</i>	+
LeE10I1, LeB0IV3, LeB0III3, LeD0III1	<i>L. leucocephala</i>	-
MaA0III2, MaA10II2 MaB10III4	<i>M. atropurpureum</i>	-
FC0III3b, FB0IV2, FB0III2a, FB0III1	<i>P. vulgaris</i>	-
Vu D0II4	<i>V. unguiculata</i>	-

## 4.6 Caracterização fenotípica (SDS-PAGE) e sequenciamento do gene 16SrDNA

### 4.6.1 Perfil de proteínas

Os isolados de *S. virgata* são altamente similares entre si e com a estirpe BR 5401<sup>T</sup> de *A. doebereinae*. Estes resultados concordam com os resultados obtidos por Moreira et al. (2006).

Os isolados de *L. leucocephala*, *P. vulgaris*, *V. unguiculata* e *M. atropurpureum* apresentaram perfis distintos dos isolados de *S. virgata*.

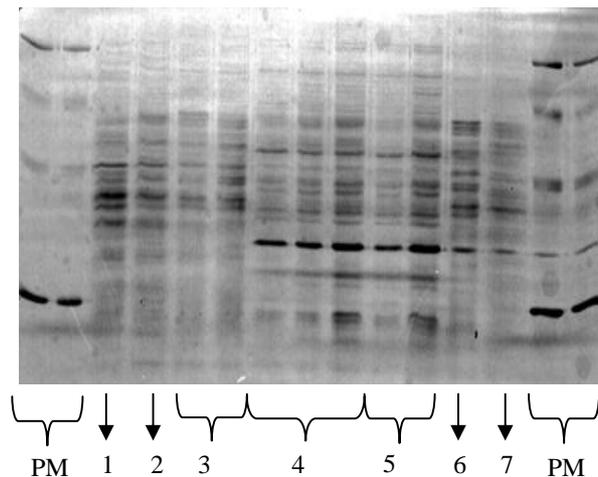


FIGURA 4 Perfis de proteína celular total das estirpes *A. caulinodans*, ORS 571T (1), *A. doebereinae*, BR 5401T (2) e de isolados de *S. virgata*, SVB0II2 e SVD0I2 (3), *L. leucocephala*, LeB0III3, LeB0IV3 e LeE10I1 (4), *P. vulgaris*, FB0IV2 e FB0III2 (5), *V. unguiculata*, VuE0II4 (6) e *M. atropurpureum*, MaA0III2 (7) obtidas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). PM: padrão de peso molecular LMWM.

#### 4.6.2 Sequenciamento do gene 16S rDNA

Os resultados do sequenciamento do gene 16S rDNA dos isolados das diferentes espécies hospedeiras encontram-se na Tabela 15. Somente um isolado de *S. virgata* foi identificado como pertencente ao gênero *Azorhizobium* sp. Os isolados de *L. leucocephala*, *M. atropurpureum* e *P. vulgaris* foram identificados como pertencentes ao gênero *Cupriavidus* sp., concordando com os resultados do perfil de proteínas, em que estes isolados apresentaram perfis similares entre si. Barrett & Parker (2006) isolaram pertencentes ao gênero *Cupriavidus* sp. de duas espécies de *Mimosa* sp.

Estes resultados mostram que a grande diversidade de gêneros de bactérias que são capazes de formar simbiose com espécies leguminosas.

TABELA 15 Resultados do Sequenciamento do gene 16S rDNA

<i>Isolados</i>	<i>Espécie hospedeira</i>	<i>BLAST</i>	<i>% similaridade</i>
SVB0II2	<i>Sesbania virgata</i>	<i>Azorhizobium</i> sp.	99
SVC0II4	<i>S. virgata</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	100
SVD0I2	<i>S. virgata</i>	<i>Cupriavidus</i> sp.	94
LeB0III3	<i>Leucaena leucocephala</i>	<i>Cupriavidus</i> sp.	93
LeB0IV3	<i>L. leucocephala</i>	<i>Cupriavidus</i> sp.	93
LeE10I1	<i>L. leucocephala</i>	<i>Cupriavidus</i> sp.	94
MaA0III2	<i>Macroptilium atropurpureum</i>	<i>Cupriavidus</i> sp.	94
MaA10II2	<i>M. atropurpureum</i>	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	97
FB0III1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Uncultured Actinobacteria	98
FB0III2	<i>P. vulgaris</i>	<i>Cupriavidus</i> sp.	92
FC0III3b	<i>P. vulgaris</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	99
FB0IV2	<i>P. vulgaris</i>	<i>Cupriavidus</i> sp.	89
VuE0II4	<i>Vigna unguiculata</i>	<i>Azorhizobium</i> sp.	99

## 5 CONCLUSÕES

A nodulação em *Sesbania virgata* ocorreu, preferencialmente, quando esta foi inoculada com solos coletados próximo ao caule de *S. virgata*. *Macropitilium atropurpureum* foi a espécie que formou simbiose com BFNNL presente em todos os solos, seguido de *Phaseolus vulgaris*, *Vigna unguiculata* e *Leucaena leucocephala* igual a *S. virgata*. As espécies hospedeiras promíscuas formaram simbiose com isolados que apresentaram características culturais similares ao gênero *Azorhizobium* e com outras espécies de bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> atmosférico (BFNNL) com solos coletados a 0 e a 10 metros do caule de *S. virgata*.

A maioria dos isolados de *S. virgata* apresentou características culturais de *Azorhizobium doebereinae*. As populações de bactérias fixadoras de N<sub>2</sub> atmosférico obtidas de nódulos das quatro espécies hospedeiras *L. leucocephala*, *M. atropurpureum*, *P. vulgaris* e *V. unguiculata* apresentaram grande diversidade cultural.

Setenta e três por cento dos isolados com diferentes características culturais, inclusive alguns isolados que apresentaram alguma similaridade cultural com gênero *Azorhizobium*, obtidos das quatro espécies hospedeiras promíscuas formaram nódulos em seu hospedeiro de origem, tendo, em alguns, a simbiose sido considerada altamente eficiente.

Não foi observada nodulação em *S. virgata* quando esta foi inoculada com os isolados que apresentaram características similares ao gênero *Azorhizobium* obtidos de todas as espécies vegetais.

Os isolados de *S. virgata* apresentaram alta similaridade no padrão do perfil de proteínas e com *A. doebereinae* e perfis distintos dos isolados das outras espécies hospedeiras.

O sequenciamento do gene 16S rDNA mostrou que a maioria dos isolados que apresentaram características culturais similares à *A. doebereineri* foi identificada como pertencente ao gênero *Cupriavidus* sp.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, O. N.; ALLEN, E. K. **The Leguminosae**. a source book of characteristics, uses and nodulation. Wisconsin: University of Madison, 1981. p. 604-607.

ANYANGO, B.; WILSON, K. J.; BEYNON, J. L.; GILLER, K. E. Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pHs. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 11, p.4016-4021, Nov. 1995.

BALA, A.; MURPHY, P.; GILLER, K. E. Occurrence and genetic diversity of rhizobia nodulating *Sesbania sesban* in African soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 34, n. 11, p.1759-1768, Nov. 2002.

BALA, A.; MURPHY, P.; GILLER, K. E. Distribution and diversity of rhizobia nodulating agroforestry legumes in soils from three continents in the tropics. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 12, n. 4, p.917-930, Apr. 2003.

BALA, A.; MURPHY, P.J.; OSUNDE, A.O.; GILLER K.E. Nodulation of tree legumes and the ecology of their native rhizobial populations in tropical soils. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 22, n. 3, p. 211-223, Mar. 2003.

BARRETT, C. F.; PARKER, M. A. Coexistence of *Burkholderia*, *Cupriavidus*, and *Rhizobium* sp. Nodule Bacteria on two *Mimosa* spp. in Costa Rica. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 2, p. 1198-1206, Feb. 2006.

BOIVIN, C.; NDOYE, I.; LORTET, G.; NDIAYE, A.; DE LAJUDIE, P.; DREYFUS, B. The *Sesbania* root symbionts *Sinorhizobium saheli* and *S. teranga* bv. *sesbaniae* can form stem nodules on *Sesbania rostrata*, although they are less adapted to stem nodulation than *Azorhizobium caulinodans*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 63, n. 3, p. 1040-1047, Mar. 1997.

BRAGGIO, M. M.; LIMA, M. E. L.; VEASEY, E. A.; HARAGUCHI, M. Atividades farmacológicas das folhas da *sesbania virgata* (cav.) pers. **Arquivo do Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 69, n. 4, p. 49-53, out./dez. 2002.

CAMPELLO, E. F. C. Sucessão vegetal na recuperação de áreas degradadas. In: DIAS, L. E.; MELLO, J. W. V. (Ed.). **Recuperação de áreas degradadas**. Viçosa: SOBRADE/DPS-UFV, 1998. p. 183-196.

DE LAJUDIE, P.; WILLENS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; MAESTROJUAN, G.; NEYRA, M.; COLLINS, M. D.; DREYFUS, B. Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. Nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov. & *Sinorhizobium teranga* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 44, n. 4, p. 715-733, Oct. 1994.

DREYFUS, B.; GARCIA, J. L.; GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. Nov., a stem-nodulating Nitrogen-Fixing Bacterium Isolated from *Sesbania rostrata*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 38, n. 1, p. 89-98, Jan. 1988.

FARIA, S. M.; MELO, R. B. **Obtenção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para espécies florestais**. Seropédica: EMBRAPA Agrobiologia, 1998. p. 1-4. (Recomendação Técnica, n. 3)

FLORENTINO, L. A. **Características da simbiose entre *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. e *Azorhizobium* sp. nov. e dos solos onde estes ocorrem**. 2005. 54 p. Monografia (Graduação em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG.

FRANCO, A. A.; CAMPELO, E. F. C.; DIAS, L. E.; FARIA, S. M. **Uso de leguminosas associadas a microrganismos na revegetação de áreas de mineração de bauxita em Porto-Trombetas-PA**. Embrapa Agrobiologia, 1996. 69 p.

FRANCO, A. A.; FARIA, S. M. The contribution of N<sub>2</sub>-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. **Soil Biochemistry**, Oxford, v. 29, n. 5, p. 897-983, May 1997.

FRED, E.B.; WAKSMAN, S.A. **Laboratory manual of general microbiology - with special reference to the microorganisms of the soil**. New York: McGraw-Hill Book Company, 1928. 145 p.

GERMIDA, J. J. Growth of Indigenous *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium meliloti* in Soils Amended with Organic Nutrients. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 1, p. 257-263, Jan. 1988.

GONÇALVES, M.; MOREIRA, F. M. S. Specificity of the Legume *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. and its Nodule Isolates *Azorhizobium johannae* with other Legume Hostes and Rhizobia. I. **Symbiosis**, Rehovot, v. 36, n. 1, p. 57-68, 2004.

KISSMANN, K. G. **Plantas infestantes e nocivas**. BASF Brasileira, 1992. p. 774-776.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 2. ed. BASF Brasileira, 1999. p. 947-950. TOMO II.

JACKMAN, P. J. H. Bacterial Taxonomy based on Eletrophoretic whole-cell Protein Patterns. In: GOODFELLOW, M.; MINNIKIN, D. (Ed.). **Chemical methods in bacterial systematics**. London: Academic Press, 1985. p. 119-129.

JENSEN, H. L. Nitrogen fixation in legouminous plants. I. General characters of root-nodule bacteria isolated from species of *Medicago* and *Trifolium* in Australia. **Proceedings of the Linnean society of New South Wales**, Sidney, v. 66, p. 98-108, 1942.

JESUS, E. C.; MOREIRA, F. M. S.; FLORENTINO, L. A.; RODRIGUES, M. I. D.; OLIVEIRA, M. S. Diversidade de bactérias que nodulam *M. atropurpureum* em três sistemas de uso da terra da Amazônia Ocidental, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 8, p. 769-776, ago. 2005.

KWESIGA, F. R.; FRANZEL, S.; PLACE, F.; PHIRI, D.; SIMWANZA, C. P. *Sesbania sesban* improved fallows in eastern Zambia: Their inception, development and farmer enthusiasm. **Agroforestry Systems**, Amsterdam, v. 47, n. 1/3, p. 49-66, dez. 1999.

LAEMMIL, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, Aug. 1970.

LAFAY, B.; BURDON, J. J. Molecular Diversity of Rhizobia Occurring on Native Shrubby Legumes in Southeastern Australia. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 64, n. 10, p. 3989-3997, Oct. 1998.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3. ed. Nova Odessa, SP: Instituto plantarum, 2000.

MELLONI, R.; MOREIRA, F. M. S NÓBREGA, R. S. A. & SIQUEIRA, J. O. Eficiência e diversidade fenotípica de bactérias diazotróficas que nodulam caupi (*vigna unguiculata* Walp) e feijoeiro (*phaseolus vulgaris*) em solos de mineração de bauxita em reabilitação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, n. 2, p. 235-246, mar./abr. 2006.

MICHIELS, J.; DOMBRECHT, B.; VERMEIREN, N.; XI, C.; LUYTEN, E. ; VANDERLEYDEN, J. *Phaseolus vulgaris* is a non-selective host for nodulation. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 26, n. 3, p. 193-205, Aug. 1998.

MONTEIRO, R. **Taxonomic studies on Brazilian legumes with forage potential: *Sesbania*, *Lupinus***. 1984. Thesis (PhD.) - St. Andrews, Scotland.

MOREIRA, F. M. S.; HAUKKA, K.; YOUNG, P. W. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil. **Molecular Ecology**, Oxford, v.7, n. 7, p.04-11, July 1998.

MOREIRA, F. M. S.; CRUZ, L.; FARIA, S. M.; MARSH, T.; MARTINEZ-ROMERO, E.; PEDROSA, F. O.; YOUNG, P. P. W. *Azorhizobium doebereineriae* sp. nov. Microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 29, n. 3, p. 197–206, Oct. 2006.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. Lavras: ed. UFLA, 1993. 729 p.

MOAWAD, H.; BOHLOOL, B. B. Characterization of rhizobia from *Leucaena*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, London, v. 8, n. 4, p. 387-392, July 1992.

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do Pantanal**. Corumbá: EMBRAPA/CPAP/SPI, 1994. 320 p.

ROBERTSON, B. K. & ALEXANDER, M. Mode of dispersal of the stem-nodulating bacterium, *Azorhizobium*. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 26, n. 11, p 1535-1540, 1994.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1970. 164 p. (International Biological Programme Handbook, n. 15).

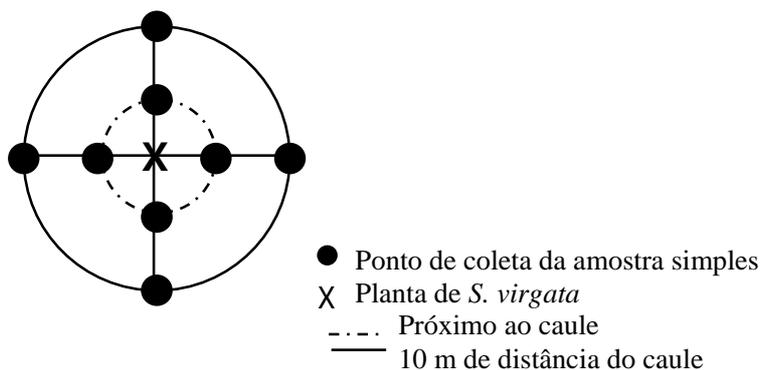
WANG, E. T.; BERKUM, P. van; BEYENE, D.; SUI, X. H.; DORADO, O.; CHEN, W. X.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 48, n. 3, p. 687-699, July 1998.

WANG, E. T.; MATÍNEZ-ROMERO, E. *Sesbania herbacea*-*Rhizobium huautlense* nodulation in flooded soils and comparative characterization of *S. herbacea*-nodulating rhizobia in different environments. **Microbial Ecology**, New York, v. 40, n. 1, p. 25-32, Jan. 2000.

## ANEXOS

ANEXO A	Esquema de coleta das amostras simples de solo em cada planta de <i>S. virgata</i> .....	61
ANEXO B1	Resultados da análise textural das amostras de solos coletadas próximo ao caule e a 10 metros de <i>Sesbania virgata</i> nos municípios de Ribeirão Vermelho (A0, A10, B0 e B10) e Nepomuceno (C0, C10, D0, D10, E0 e E10).....	61.
ANEXO B2	Resultados das análises químicas das amostras de solos coletadas próximo ao caule e a 10 metros de <i>Sesbania virgata</i> nos municípios de Ribeirão Vermelho (A0, A10, B0 e B10).....	62
ANEXO B3	Resultados das análises químicas das amostras de solos coletadas próximo ao caule e a 10 metros de <i>Sesbania virgata</i> nos municípios de Nepomuceno (C0, C10, D0, D10, E0 e B10).....	63

ANEXO A Esquema de coleta das amostras simples de solo em cada planta de *S. virgata*. Os 4 pontos em negrito representam as amostras simples.



ANEXO B1 Resultados da análise textural das amostras de solos coletadas próximo ao caule e a 10 metros de *Sesbania virgata* nos municípios de Ribeirão Vermelho (A0, A10, B0 e B10) e Nepomuceno (C0, C10, D0, D10, E0 e E10).

Solos	Areia	Silte (dag/kg)	Argila	Classe Textural
A0	33	40	27	Textura média
A10	14	43	43	Argilosa
B0	22	11	67	Muito argilosa
B10	34	18	48	Argilosa
C0	20	7	73	Muito argilosa
C10	18	20	62	Muito argilosa
D0	19	11	70	Muito argilosa
D10	14	12	74	Muito argilosa
E0	14	10	76	Muito argilosa
E10	37	7	56	Argilosa

ANEXO B2 Resultados das análises químicas das amostras de solos coletadas próximo ao caule e a 10 metros de *Sesbania virgata* nos municípios de Ribeirão Vermelho (A0, A10, B0 e B10).

Características químicas	A0	B0	Média	A10	B10	Média
pH (H <sub>2</sub> O)	6,8	6,8	6,80	6,0	6,0	6,00
P	5,8	1,7	4,00	0,9	0,4	0,50
K	112	136	124,00	142	6,0	74,00
Ca <sup>+2</sup>	5,8	3,3	4,50	1,0	0,4	0,50
Mg <sup>+2</sup>	1,2	0,7	1,00	0,2	0,2	0,00
Al <sup>+3</sup>	0,0	0,0	0,00	0,0	0,0	0,00
H+Al	1,3	1,3	1,00	2,3	1,9	2,00
SB	7,3	4,3	5,50	1,6	0,6	1,50
(t)	7,3	4,3	5,50	1,6	0,6	1,50
(T)	8,6	5,6	7,50	3,9	2,5	3,50
V	84,9	77,0	81,00	40,4	24,6	32,50
m	0,0	0,0	0,00	0,0	0,0	0,00
MO (dag/kg)	3,4	1,5	2,50	1,3	0,1	0,50
P-rem (mg/L)	20,5	18,8	20,0	3,9	1,0	2,50
Zn	12,0	2,7	7,50	0,5	0,5	1,00
Fe	89,6	129,3	109,50	35,8	49,1	42,50
Mn	51,2	35,4	43,00	17,7	6,1	12,00
Cu	7,3	2,1	4,50	3,1	2,5	3,00
B	0,5	0,5	1,00	0,2	0,2	0,00
S	25,5	24,8	25,50	150,3	30,9	90,50

ANEXO B3 Resultados das análises químicas das amostras de solos coletadas próximo ao caule e a 10 metros de *Sesbania virgata* nos municípios de Nepomuceno (C0, C10, D0, D10, E0 e B10).

Características químicas	C0	D0	E0	Média	C10	D10	E10	Média	
pH (H <sub>2</sub> O)	6,6	7,7	5,8	7,00	5,6	5,6	7,3	6,33	
P	1,2	1,7	0,4	1,0	1,2	0,6	0,9	1,00	
K	(mg/dm <sup>3</sup> )	303	134	92,0	176,33	87,0	151	92,0	110,00
Ca <sup>+2</sup>	2,1	4,8	0,6	2,67	1,7	0,8	3,9	2,33	
Mg <sup>+2</sup>	0,3	0,3	0,2	0,00	0,8	0,2	0,4	0,33	
Al <sup>+3</sup>	0,0	0,0	0,7	0,33	0,3	0,6	0,0	0,33	
H+Al	(cmolc/dm <sup>3</sup> )	2,3	0,9	4,0	2,33	3,6	4,5	1,1	3,33
SB	3,2	5,4	1,0	3,00	2,7	1,4	4,5	3,00	
(t)	3,2	5,4	1,7	3,33	3,0	2,0	4,5	3,33	
(T)	5,5	6,3	5,0	5,67	6,3	5,9	5,6	6,00	
V	58,0	85,8	20,6	55,00	43,0	23,6	80,5	49,33	
m	(%)	0	0	40,0	13,33	10,0	30	0,0	13,33
MO (dag/kg)	2,1	1,9	2,4	2,00	1,8	1,6	1,5	2,00	
P-rem (mg/L)	17,8	7,2	10,2	11,67	17,4	12,5	4,5	11,67	
Zn	7,8	0,9	0,9	3,33	1,5	0,9	9,1	4,00	
Fe	64,8	40,9	40,9	49,67	46,3	49,9	53,9	50,00	
Mn	25,0	1,7	1,7	9,67	6,6	2,3	11,5	7,00	
Cu	(mg/dm <sup>3</sup> )	3,0	1,6	1,6	2,33	1,7	1,4	1,9	1,67
B	0,6	0,4	0,4	0,33	0,4	0,2	0,5	0,33	
S	27,7	28,5	28,5	27,67	29,3	28,5	28,5	29,00	