



**ESPECIFICIDADE DE ESTIRPES DE
AZORHIZOBIUM SP NOV. NA SIMBIOSE COM
SESBANIA VIRGATA (CAZ.) PERS.**

MARCOS GONÇALVES

2000

49264

MEN 34578

MARCOS GONÇALVES

**ESPECIFICIDADE DE ESTIRPES DE *AZORHIZOBIUM* SP NOV. NA
SIMBIOSE COM *SESBANIA VIRGATA* (CAZ.) PERS.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Agronomia, Área de Concentração em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de "Mestre".

Orientadora:

Prof. PhD. Fátima M. S. Moreira

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2000

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

Gonçalves, Marcos

Especificidade de estirpes de *Azorhizobium* sp nov. na simbiose com *Sesbania virgata* (Caz.) Pers / Gonçalves Marcos. -- Lavras : UFLA, 2000.

43 p. : il.

Orientador: Fátima M. S. Moreira.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Rizobio. 2. Leguminosa. 3. Inovação cruzada. 4. Fixação biológica de nitrogênio. 5. Eficiência. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-631.46

-633.3

-581.52482

MARCOS GONÇALVES

**ESPECIFICIDADE DE ESTIRPES DE *AZORHIZOBIUM* SP NOV. NA
SIMBIOSE COM *SESBANIA VIRGATA* (CAZ.) PERS..**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós Graduação em Agronomia, área de concentração em Solos e Nutrição de Plantas, para obtenção do título de "Mestre".

APROVADA em 13 de Março de 2000

Prof. PhD. José Oswaldo Siqueira

DCS-UFLA

Dr. Sergio Miana de Faria

EMBRAPA-RJ



Prof. PhD. Fátima M. S. Moreira

UFLA

(Orientadora)

**LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2000**

A DEUS, criador do céu e da terra,

DEDICO.

*Aos meus pais , Oduvaldo Gonçalves e Júlia Machado
Gonçalves, pelo amor, dedicação, fé, carinho,
exemplo de vida e trabalho transmitidos.*

*Aos meus irmãos Marcelo e Mauro, pelos incentivos.
A minha querida esposa Carla e a nosso querido
filho Gabriel, pela abnegação, compreensão e amor,*

OFEREÇO.

AGRADECIMENTO

A DEUS, por tudo.

À Universidade Federal de Lavras, através do Departamento de Ciência do Solo (Setor Microbiologia do Solo), pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

A professora e colega PhD Fátima M.S. Moreira, pela orientação, incentivo, amizade, apoio e confiança na realização desse trabalho.

Ao professor PhD. José Oswaldo Siqueira e ao pesquisador da EMBRAPA Dr. Sergio Miana de Faria pelas sugestões e participação na banca examinadora.

Aos técnicos do Laboratório de Microbiologia do Solo Manuel e Marlene pela valiosa ajuda e agradável convívio.

Aos companheiros de Laboratório de Microbiologia do Solo, Adão, Anderson, Rafacla, Adriana, Valdeci, Andrezinho e Zé, pela ajuda e agradável convívio.

Aos colegas do curso Alexandre, Divino, Adriana, Diércules, Cláudio, Enrique, Eliane, Isabel, Yanê, Marco, Rogério, Waldo e Wagner pela força e agradável convívio.

Aos funcionários do Departamento de Ciência do Solos em especial a secretária Adriana, pela atenção dispensada.

Enfim a todos que, sem saber, me proporcionaram alegria por um simples sorriso ou por pequenas frases que serviram como grande incentivo para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 O Gênero <i>Sesbania</i>	3
2.2 Simbiose de Rizóbio com Leguminosas Florestais.....	4
2.3 Taxonomia de Rizóbio.....	5
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	10
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
5 CONCLUSÕES.....	31
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
ANEXOS.....	38

RESUMO

GONÇALVES, Marcos. Especificidade de estirpes de *Azorhizobium* sp nov. na simbiose com *Sesbania Virgata* (Caz.) Pers. Lavras:UFLA, 2000 43p. (Dissertação – Mestrado em Agronomia/Solos e Nutrição de Planta)¹.

A capacidade de bactérias de formar nódulos em leguminosas hospedeiras é uma característica simbiótica importante na descrição de novos gêneros e espécies de rizóbios. Com o objetivo de verificar a especificidade de estirpes de *Azorhizobium* sp nov. na simbiose com *Sesbania virgata*, e com outras espécies de leguminosas, hospedeiras de origem de espécies de rizóbio atualmente reconhecidas, foram realizados três experimentos, em vasos de Leonard, em casa de vegetação do DCS/UFLA. No primeiro experimento, observou-se que as sete estirpes de *Azorhizobium* sp nov. (BR 5420, UFLA 01-602, UFLA 01-54B, BR 5416, BR 5414, BR 5426, BR 5401) testadas, separadamente, em dez espécies de leguminosas, nodularam eficientemente apenas a *S. virgata*. Em *Sesbania rostrata*, *Phaseolus vulgaris* e *Macroptilium atropurpureum*, houve nodulação, porém ineficiente. Nas espécies *Acacia mangium*, *Glycine max*, *Leucaena leucocephala*, *Lupinus spp*, *Medicago sativa* e *Vigna unguiculata*, não houve nodulação. A nodulação da *S. rostrata* se deve à similaridade de *Azorhizobium caulinodans* a *Azorhizobium* sp nov. A nodulação de *P. vulgaris* e *M. atropurpureum* por *Azorhizobium* sp nov. comprova a promiscuidade destas espécies. No segundo experimento foram testadas dez

1 – Comitê Orientador: Fátima M.S. Moreira – UFLA (Orientadora)

estirpes ten (BR 29, NZP 5549^T, BR 2001, USDA 205^T, CIAT 899^T, CFN 42^T, UFLA 04-74B, NZP 2213^T, BR 5401^T, ORS 571^T)tipo^(T) ou referência de espécies de rizóbio conhecidas, em *S. virgata*. Constatou-se que as únicas estirpes capazes de nodular a *S. virgata* foram ORS 571 *Azorhizobium caulinodans*, BR 5401 *Azorhizobium sp nov* e BR 29 *Bradyrhizobium elkanii*. No último experimento testou se a nodulação caulinar na *S. rostrata* com sete estirpes de *Azorhizobium sp nov*. (BR 5420, UFLA 01-602, UFLA 01-54B, BR 5416, BR 5414, BR 5426, BR 5401) e a (ORS 571). Observou-se que nenhuma das estirpes de *Azorhizobium sp nov*. nodulou o caule, que foi nodulado apenas por sua estirpe homóloga a ORS 571. Esta especificidade de estirpes de *Azorhizobium sp nov*. na simbiose com *Sesbania virgata* e sua capacidade de nodular apenas as raízes de *S. rostrata* corrobora a proposição de rizóbio isolado de *S. virgata* como uma nova espécie do gênero *Azorhizobium*.

ABSTRACT

GONÇALVES, Marcos. Specificity of *Azorhizobium* sp nov. strains on the symbiosis with *Sesbania Virgata* (Caz.) Pers. Lavras:UFLA, 2000 43p. (Dissertation – Master's degree in Agronomy/ Soil and Nutrition in plant)¹.

The capacity of bacteria to establishing nodules in host legumes is an important symbiotic characteristic in the description of new rhizobia genera and species. With the objective of verifying the especificity of *Azorhizobium* sp nov strains in symbiosis with *Sesbania virgata*, and other legume species, origin hosts of currently recognized rhizobia species, three experiments were carried out in Leonard jars, in the greenhouse of the DCS/UFLA. In the first experiment, it was observed that the seven *Azorhizobium* sp nov strains. (BR 5420, UFLA 01-602, UFLA 01-54B, BR 5416, BR 5414, BR 5426, BR 5401) tested separately, in ten legume species, nodulated efficiently only *Sesbania virgata*. In *Sesbania rostrata*, *Phaseolus vulgaris* and *Macroptilium atropurpureum*, there was nodulation but inefficient. In the species *Acacia mangium*, *Glycine max*, *Leucaena leucocephala*, *Lupinus spp*, *Medicago sativa* and *Vigna unguiculata*, nodulation did not occur. *S. rostrata* nodulation is due to the similarity between *Azorhizobium caulinodans* and *Azorhizobium* sp nov. *P. vulgaris* and *M. atropurpureum* nodulation by *Azorhizobium* sp nov. supports the promiscuity of those species. In the second experiment ten (BR 29, NZP 5549^T, BR 2001, USDA 205^T, CIAT 899^T, CFN 42^T, UFLA 04-74B, NZP 2213^T, BR 5401^T, ORS 571^T) type on reference strains of rhizobia know species, were tested, in *S. virgata*. It was verified that only strains ORS 571^T (*Azorhizobium caulinodans*), BR 5401 (*Azorhizobium* sp nov) and BR 29

1-Guidance Committe: Fátima M.S. Moreira – UFLA (Major Professor)

(*Bradyrhizobium elkanii*) were capable to nodulate *S. virgata*. In the last experiment seven strains of *Azorhizobium sp nov.* (BR 5420, UFLA 01-602, UFLA 01-54B, BR 5416, BR 5414, BR 5426, BR 5401) and the ORS 571 were tested for stem nodulation of *S. rostrata*. It was observed that none of *Azorhizobium sp nov.* strains nodulated the stem, which was nodulated only by (ORS 571)^T its homologous strain. This specificity of *Azorhizobium sp nov.* strains on the symbiosis with *S. virgata* corroborates the proposition of *S. virgata* isolates as a new species of *Azorhizobium*.

I INTRODUÇÃO

Uma maneira eficaz de aumentar a produtividade das culturas, de uma forma econômica e ecologicamente correta, seria através da fixação biológica do nitrogênio, um método usado para recuperar solos esgotados de nitrogênio (Niner e Hicher, 1997). A capacidade de espécies florestais que nodulam e fixam nitrogênio em associação com bactérias é um atributo que pode aumentar o potencial de uso das espécies tanto para o fornecimento de produtos próprios quanto para a sua inserção em sistemas agrosilvopastoris, conservação de áreas degradadas e também de manejo (Faria et al., 1998). Uma espécie de grande potencial é a *Sesbania virgata* usada para revegetação de áreas degradadas sujeitas a inundações periódicas, devido a sua alta tolerância a condições de baixa oxigenação e deficiência minerais do solo e capacidade de fixar N_2 através da simbiose com rizóbio. Ela tem sido usada no reflorestamento da mata ciliar, na recuperação de solos depauperados e no controle da erosão.

Os rizóbios são bactérias Gram negativas de solo capazes de formar nódulos na raiz, e em alguns casos, nódulos no caule de plantas da família Leguminosae, nas quais eles podem fixar simbioticamente nitrogênio atmosférico. O fato de uma estirpe de rizóbio ser infectiva não implica em que seja eficiente. Para isso ela necessita, além de se multiplicar dentro das células do córtex da raiz durante a formação do nódulo, induzir também a formação da leg-hemoglobina e da nitrogenase para que se inicie a fixação do N_2 . Entretanto, uma série de fatores envolvendo a planta, a bactéria, o ambiente e a interação dos três pode influir decisivamente sobre a eficiência desta simbiose e, conseqüentemente, sobre a quantidade de nitrogênio fixado.

Até o momento, foram descritos seis gêneros e vinte e seis espécies de rizóbio, apesar de haver quase vinte mil espécies de leguminosas e a maioria serem capazes de formação de nódulos (Allen e Allen, 1981; Doyle 1994;

Sprent 1995). Com o avanço de técnicas da biologia molecular, em pouco mais que uma década, 22 espécies novas foram somadas às quatro descritas na 1ª edição do Manual de Bergey de Bacteriologia Sistemática. Entre as cerca de vinte mil espécies de Leguminosae, um número significativo é de árvores tropicais cuja relação com rizóbio começou a ser investigada recentemente (Moreira et al., 1998). Moreira et al. (1993, 1998) forneceram evidências de que as estirpes BR 5401 e BR 5404 microsimbiontes da *Sesbania virgata* representam uma nova espécie, provavelmente do gênero *Azorhizobium*. A habilidade dos organismos para formar nódulos em leguminosas hospedeiras ainda é uma característica prática importante para a descrição do rizóbio e deve ser detalhada (Graham et al., 1991). Além disso, o grau de especificidade da espécie vegetal com o rizóbio é muito importante para selecionar o inoculante apropriado para um plantio, e a escolha errada de inoculante ainda é uma causa comum de fracasso da inoculação.

Tendo em vista que a especificidade complementa a caracterização, ou seja, faria parte do padrão mínimo para a descrição de uma novo gênero ou espécie de rizóbio, este trabalho teve como objetivo: Verificar a especificidade de estirpes de *Azorhizobium* sp nov. na simbiose com *Sesbania virgata* e com outras espécies de leguminosas, hospedeiras de origem das espécies de rizóbio atualmente conhecidas.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O gênero *Sesbania*.

O gênero *Sesbania*, pertencente a família Leguminosae, sub-família Papilionoideae e tribo Robinieae, compreende aproximadamente 70 espécies comumente encontradas em cursos de água ou locais alagados (Allen e Allen, 1981). Os arbustos ou ervas pertencentes a este gênero apresentam uma diversidade de utilização, sendo alguns deles de interesse econômico (D'Orey e Liberato, 1971). Muitas espécies estão 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, através da simbiose com o rizóbio. Outras espécies podem ser utilizadas na formação de cercas vivas, barreiras contra o vento e, em alguns casos, como fornecedores de fibras de boa qualidade (Allen e Allen, 1981).

Sesbania virgata (Caz.) Pers., conhecida popularmente como cambai (Eisinger, 1989), sarazinho, mãe-josé e feijãozinho (Pott e Pott, 1994), caracteriza-se por ser um arbusto de aproximadamente dois metros de altura, possuindo folhas alternas paripenadas, fruto marginado e flores amarelas. Apresenta floração mais intensa nos meses de janeiro, abril, setembro e outubro, e frutificação nos meses de janeiro, outubro e novembro (Eisinger, 1989). Pode ser encontrada em campos alagáveis, solos arenosos ou argilosos, distribuindo-se pelas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, Paraguai, Argentina e Uruguai (Pott e Pott, 1994). Esta espécie tem sido amplamente usada no reflorestamento da mata ciliar, na recuperação de solos depauperados e no controle da erosão.

Apesar de seu grande potencial para revegetação de áreas degradadas sujeitas a inundações periódicas, devido à sua alta tolerância a condições de baixa oxigenação e deficiência minerais do solo, poucas informações existem a

seu respeito, principalmente no que se refere ao uso de inoculação de mudas com rizóbio, para reflorestamento de matas ciliares.

Simbiose de rizóbio com leguminosas florestais.

A capacidade de espécies florestais de nodularem e fixarem nitrogênio em associação com bactérias é um atributo que pode crescer sobre o potencial de uso das espécies em sistemas de plantio, agrosilvopastoris, recuperação de áreas degradadas e adubação verde. (Faria, et al., 1998).

Os rizóbio são bactérias Gram negativas de solo capazes de formar nódulos na raiz, e em alguns casos, nódulos no caule de espécies da família Leguminosae, nas quais eles podem fixar simbioticamente nitrogênio atmosférico. Estima-se que 88% das cerca de 19.000 espécies de Leguminosae sejam capazes de nodular. Destas, uma parcela significativa, ou seja, a maioria das Caesalpinoideae e Mimosoideae e 4-5.000 Papilionoideae, são arbóreas, cuja capacidade de nodulação começou a ser intensivamente investigada recentemente (Allen e Allen, 1981; Faria et al, 1989; Moreira et al, 1992). Moreira (1991) caracterizou culturalmente por volta de 700 estirpes de rizóbio isoladas da Amazônia de Florestas da mata Atlântica brasileira e áreas secas provenientes destes levantamentos. Depois desta caracterização fenotípica inicial, foram selecionadas 171 estirpes para estudos adicionais através de padrões de proteína total por eletroforese em gel de poliacrilamida, as quais foram comparadas às estirpes tipo das espécies de rizóbio conhecidas (Moreira et al., 1993). Neste trabalho, vários grupos não apresentaram similaridade significativa com as espécies de rizóbio descritas. Dentre estes, incluía-se o das estirpes BR 5401 e BR 5404 isoladas de *Sesbania virgata*. Estes estudos, junto com outros recentes em espécies de árvores tropicais (Zhang et al. 1991; Barnett e Catt 1991; Oyaizu et al. 1993; de Lajudie et al.1994; Dupuy et al.1994; Odee et al.1995; Haukka et al.1996), mostraram que em leguminosas arbóreas existe uma grande fonte de Biodiversidade de rizóbio.

Taxonomia de rizóbio

É considerado que o rRNA é o mais útil das seqüências altamente conservadas no presente, disponível para a medida de relações filogenéticas (Woese 1987). Moreira et al., (1998), utilizando a técnica de sequenciamento parcial do gene 16S rRNA para estudar a diversidade filogenética de 44 estirpes isoladas de espécies florestais, verificou que a única estirpe com taxa de crescimento intermediário, BR 5401, teve seqüência diferente das espécies descritas e mais próxima à estirpe tipo *Azorhizobium caulinodans* ORS 571, porém com oito bases diferentes. Com isso, foi concluído que a BR 5401 representava, provavelmente, uma nova espécie dentro do gênero *Azorhizobium*.

A descrição de uma nova espécie deve ser baseada num isolado selecionado como o tipo da espécie e em outras estirpes isoladas, preferencialmente de diferentes locais que servirão de referência. Até 1993, apenas as estirpes BR 5401 e BR 5404 da *Sesbania Virgata* haviam sido caracterizadas. Desde então vários isolamentos têm sido realizados, em diferentes regiões do sudeste brasileiro, de nódulos desta espécie (Tabela 1).

TABELA 1. Local de origem de estirpes isoladas de *Sesbania virgata* (homólogas) em diferentes regiões do sudeste brasileiro.

LOCAL DE ORIGEM	CÓDIGO DAS ESTIRPES ISOLADAS
CAMPO GRANDE /R.J	BR5422, BR5423, BR5424, BR5425, BR5426, BR5427, BR5428
VOI.TA REDONDA/R.J	BR 5419, BR 5420, BR 5421
LAVRAS / MG	UFLA01-601, UFLA01-602, UFLA01-608, UFLA01-609, UFLA01-610, UFLA01-611
ITUTINGA / MG	UFLA01-48B, UFLA01-49B, UFLA01-50B, UFLA01-51B, UFLA01-54B
ITAGUAI / R.J	BR 5416, BR 5417, BR 5418
PARACAMBI / MG	BR 5413, BR 5414, BR 5415

Todos os isolados das diferentes regiões do sudeste brasileiro têm apresentado características culturais semelhantes em meio YMA, ou seja, crescimento intermediário, alcalinização e pouca produção de goma, características semelhantes às de *A. caulinodans*. Além disso, a BR 5401 tem o mesmo gênero do hospedeiro, do *A. caulinodans*, *Sesbania*, porém não forma nódulos no caule de seu hospedeiro (Moreira et al., 1998). Por outro lado, a BR 5401, como a BR 5404, são recomendadas como inoculantes para *Sesbania virgata* pela EMBRAPA Agrobiologia, por terem apresentado eficiência superior em fixar N₂ quando comparadas a outras estirpes (Faria et al., 1984).

A habilidade dos organismos para formar nódulos em leguminosas hospedeiras é uma característica prática importante para a descrição do rizóbio e deveria ser muito bem detalhada (Graham et al., 1991). Esta habilidade para formar nódulos é devida a genes de rizóbio importantes para a nodulação. No rizóbio, os genes de nodulação (nod/nol/noe) estão envolvidos nos primeiros eventos de interação bactéria e hospedeiro, incluindo a produção de sinais do fator Nod. Mutações nesses genes impedem ou retardam a infecção da planta pela bactéria (Niner e Hicher 1997). Os genes necessários para a fixação de nitrogênio (nif e fix) são expressos no nódulo maturo. Estes genes são necessários para a síntese da nitrogenase, que converte N₂ para amônio, e para exportar o nitrogênio fixado no espaço peribacteroide. (Niner e Hicher 1997). Dentro do aspecto de determinação de um novo gênero ou espécie de rizóbio, o que se tem visto em trabalhos de caracterização de novas espécies mais recentes (Wang et al., 1998; Van Berkun., 1998; Wang et al., 1999; Rome et al., 1996; Chen et al., 1997; Amarger et al., 1997; Jarvis et al., 1997) é que os estudos genéticos são predominantes na caracterização e as propriedades simbióticas são relegadas a segundo plano. Esse maior desenvolvimento se deve, em grande parte, ao alto grau de precisão de características genéticas, para a determinação de um novo gênero ou espécie de microrganismo. Porém, por mais precisa que

seja a técnica de biologia molecular, ela nunca irá substituir a suma importância da caracterização simbiótica, não só pela importância econômica e ecológica desta informação, mas como possível ferramenta para identificação de espécies de rizóbio em laboratórios com poucos recursos técnicos.

As plantas hospedeiras testadas, para uma caracterização simbiótica adequada, devem incluir hospedeiros das vinte e seis espécies de rizóbio descritas na (Tabela 2).

Phaseolus vulgaris, *Macroptilium atropurpureum* e *Leucaena leucocephala* são hospedeiros de várias espécies de rizóbio. Por outro lado, *Glycine max* é nodulada por espécies de três gêneros: *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium*. *Medicago* e *Lupinus* parecem ser gêneros mais específicos: o primeiro é nodulado por *Rhizobium* e *Sinorhizobium* e o segundo por *Sinorhizobium* e *Allorhizobium*. Nos trabalhos de descrição de novos gêneros e/ou espécies, *Vigna* só é mencionado como hospedeiro de *Bradyrhizobium*, sem denominação de espécie (Jordam, 1984). No entanto, Lewin et al., (1987) demonstraram ser este gênero bastante promíscuo, nodulando não só com rizóbio de crescimento lento, mas também com rizóbio de crescimento rápido. Lieberman et al. (1985) compilaram resultados de 14.000 testes de inoculação cruzada envolvendo 165 gêneros de leguminosas em um dendograma de similaridade estabelecido no nível de 70 %, que resultou em dezoito grupos. *Vigna*, *Macroptilium*, *Phaseolus*, *Medicago*, *Lupinus*, *Glycine*, *Leucaena*, *Sesbania* e *Acacia* pertenceram a grupos distintos de inoculação cruzada. Por suas propriedades simbióticas e também pela boa disponibilidade de sementes, estas espécies devem ser incluídas em testes de caracterização de novas espécies de rizóbio.

TABELA 2. Espécies de rizóbio descritas e seus respectivos hospedeiros de origem.

Espécies de rizóbio	Hospedeiros	Referências
<i>Rhizobium leguminosarum</i> biovars <i>phaseoli</i> , <i>trifolii</i> , <i>viceae</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>P. multiflorus</i> , <i>P.</i> <i>angustifolius</i> , <i>Trifolium spp.</i> , <i>Pisum</i> <i>spp.</i> , <i>Vicia spp.</i> , <i>Lens spp.</i> , <i>Macroptilium atropurpureum</i> , <i>Lathyrus</i>	Frank, 1889; Jordan, 1984
<i>R. tropici</i> , biovars <i>mimosae</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Leucaena spp.</i> , <i>P.</i> <i>vulgaris</i> , <i>L. leucocephala</i>	Martinez-Romero <i>et al.</i> , 1991
<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Segovia <i>et al.</i> , 1993
<i>R. galegae</i>	<i>Galega spp.</i>	Lindström, 1989
<i>R. giardinii</i> biovars <i>phaseoli</i> , <i>giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>P.spp.</i> , <i>Macroptilium atropurpureum</i> , <i>L.</i> <i>leucocephala</i> .	Amarger <i>et al.</i> , 1997
<i>R. gallicum</i> biovars <i>phaseoli</i> , <i>gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>P.spp</i> <i>Macroptilium atropurpureum</i> , <i>L.</i> <i>leucocephala</i> , <i>Onobrycis vicifolia</i>	Amarger <i>et al.</i> , 1997
<i>R. hainanense</i>	<i>Macroptilium lathyroides</i> , <i>Zornia</i> <i>diphila</i> , <i>Uraria crinita</i> , <i>Desmodium</i> <i>sinuatum</i> , <i>Stylosanthes guianensis</i> , <i>desmodium gyroides</i> , <i>Acacia sinuata</i> , <i>tephrosia candida</i> , <i>Arachis hypogea</i> , <i>Centrosema pubescens</i> , <i>Desmodium</i> <i>triquetrum</i> , <i>Desmodium heterophyllum</i>	Chen <i>et al.</i> , 1997
<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica</i> , <i>M. Sativa</i> , <i>P.</i> <i>vulgaris</i> , <i>V. angulares</i>	Van Berkum <i>et al.</i> , 1998
<i>R. huautlense</i>	<i>Sesbania herbaceae</i> , <i>Leucaena</i> <i>leucocephala</i> , <i>Sesbania rostrata</i> , <i>Trifolium repens</i>	Wang <i>et al.</i> , 1998
<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>Wisteria frutescens</i> , <i>Caragana spp.</i> , <i>Lotus spp.</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>M.</i> <i>atropurpureum</i>	Jarvis <i>et al.</i> , 1982
<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza spp.</i> , <i>Halimodendron</i> <i>spp.</i> , <i>Sophora spp.</i> , <i>Caragana spp.</i> , <i>Glycine spp.</i> , <i>Swainsonia spp.</i>	Chen <i>et al.</i> , 1995
<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Nour <i>et al.</i> , 1995
<i>M. plurifarum</i>	<i>Prosopis juliflora</i> , <i>Neptunia oleraceae</i> , <i>Acacia spp.</i> , <i>L. leucocephala</i> , <i>Chamaecrista ensiformis</i>	De Lajudie <i>et al.</i> , 1998
<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i> , <i>Vicia villosa</i> , <i>P.</i> <i>vulgaris</i> , <i>Sesbania spp.</i> , <i>A.alignoses</i> , <i>A. adsurgens</i>	Chen <i>et al.</i> , 1991

Continua⇒...

⇒...Continua

Espécies de rizóbio	Hospedeiros	Referências
<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>	Nour <i>et al.</i> , 1994
<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>	Wang <i>et al.</i> , 1999
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	<i>Melilotus spp.</i> , <i>Medicago spp.</i> , <i>Trigonella spp.</i>	Dangeard, 1926; De Lajudie <i>et al.</i> , 1994
<i>S. fredii</i>	<i>Glicine max</i> , <i>G. soja</i> , <i>P. vulgaris</i>	Scholla e Elkan, 1984; De Lajudie <i>et al.</i> , 1994
<i>S. saheli</i>	<i>Sesbania spp.</i> , <i>Acacia seyal</i> , <i>L. leucocephala</i> , <i>N. oleraceae</i>	De Lajudie <i>et al.</i> , 1994
<i>S. teranga</i>	<i>Sesbania spp.</i> , <i>Acacia spp.</i> , <i>N. oleraceae</i> , <i>L. leucocephala</i>	De Lajudie <i>et al.</i> , 1994
<i>S. medicae</i>	<i>Medicago spp.</i>	Rome <i>et al.</i> , 1996
<i>Allorhizobium undicola</i>	<i>Neptunia natans</i> , <i>Lotus arabicus</i> , <i>Acacia seyal</i> , <i>Faidherbia albida</i> , <i>Acacia tortilis</i> , <i>Medicago sativa</i> , <i>Acacia senegal</i>	De Lajudie <i>et al.</i> , 1998
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Macroptilium atropurpureum</i> , <i>Ornithopus sativus</i> , <i>Glycine max</i> , <i>Lupinus spp.</i>	Jordan, 1982
<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine soja</i> , <i>G. max</i>	Kuykendall <i>et al.</i> , 1992
<i>B. liaoningense</i>	<i>G. soja</i> , <i>G. max</i> , <i>Phaseolus aureus</i>	Xu <i>et al.</i> , 1995
<i>B. spp.</i>	<i>Lotus</i> , <i>Vigna spp.</i> , <i>Vigna</i> , <i>Lupinus</i> , <i>Ornithopus</i> , <i>Cicer</i> , <i>Sesbania</i> , <i>Leucaena</i> , <i>Mimosa</i> , <i>Lab-lab</i> , <i>Acacia</i> , <i>Macroptilium</i> , <i>Glycine</i> .	Jordan, 1984
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Dreyfus <i>et al.</i> , 1988

II MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados três experimentos, sendo que todos foram conduzidos em vasos de Leonard e em casa de vegetação do DCS/UFLA (Fotos 1 e 2).



Foto 1: Visão geral do experimento com trezentos vasos de Leonard esterilizados, colocados em casa de vegetação



Foto 2: Visão geral do experimento, mostrando em primeiro plano a espécie *Lupinus albus*

Na parte superior, os vasos de Leonard continham a mistura de uma parte de areia (250 ml) e uma parte de vermiculita (250 ml), na inferior, continham 300 ml de solução de Jensen modificada, diluída quatro vezes, com a seguinte composição:

SOLUÇÃO DE JENSEN MODIFICADA

$K_2HPO_4(0,12M)^1$	10 ml*
$MgSO_4 \cdot 7H_2O(0,81M)+NaCl(0,34M)^1$	10ml*
$CaHPO_4(0,035M)^1$	10ml*
$FeCl_3 \cdot 6H_2O(0,052M)^1$	10ml*
**Solução de micro nutrientes.....	1ml*
Água destilada.....	1000ml

PH=6,7;ajustar com NaOH. ¹Solução estoque

*Volume retirado da solução estoque para o preparo de 1 litro de solução de Jensen modificada.

**SOLUÇÃO DE MICRONUTRIENTES PARA UM LITRO DE ÁGUA

H_3BO_3	2,86g
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	2,03g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,22g
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,08g
$Na_2MoO_4 \cdot H_2O$	0,09g
$CoCl_2$	0,03g

Após o preparo dos vasos, estes foram autoclavados por duas horas a uma pressão de 1,5 Kg/cm² e a 127°C. Após a semeadura de sementes esterilizadas e posteriormente inoculadas, foi colocada, sobre a superfície do vaso, uma camada fina da mistura areia, benzeno e parafina, na proporção 5:1:0,015, respectivamente. Esta mistura esterilizada teve finalidade de evitar prováveis contaminações. Para a obtenção do inóculo, as estirpes testadas de *Azorhizobium* sp nov. e as estirpes recomendadas foram cultivadas em meio YMA sólido (Vincent, 1970), em seguida, colônias isoladas foram repicadas para o meio YMA semi - sólido. Um ml destas culturas na fase log, considerando três a quatro dias após a repicagem para estirpes de crescimento rápido, cinco a seis dias para estirpes de crescimento intermediário, sete a oito dias para estirpes de crescimento lento, foi inoculado por planta. Para cada estirpe testada, foram realizadas três repetições e os níveis de solução nutritiva, nos vasos, foram reabastecidos periodicamente com solução autoclavada.

No primeiro experimento conduzido em março de 1998, pesquisou-se a capacidade de nodular e fixar N₂ de sete estirpes de *Azorhizobium* sp nov., em dez espécies hospedeiras de origem de espécies de rizóbio atualmente descritas: (*Sesbania virgata*, *Sesbania rostrata*, *Macroptilium atropurpureum*, *Leucaena leucocephala*, *Vigna unguiculata*, *Glycine max*, *Medicago sativa*, *Phaseolus vulgaris*, *Lupinus albus* e *Acacia mangium*). Assim sendo cada espécie foi inoculada com as estirpes (BR 5420, UFLA 01-602, UFLA 01-54B, BR 5416, BR 5414, BR 5426, BR 5401) de *Azorhizobium* sp nov., separadamente, além das respectivas estirpes recomendadas como inoculantes destes hospedeiros, como é descrito na tabela 3:

TABELA 3. Estirpes recomendadas como inoculantes para as espécies de leguminosas testadas.

ESPÉCIES DE LEGUMINOSAS	ESTIRPES INOCULANTES*
<i>Acacia mangium</i>	BR 3617 <i>Bradyrhizobium sp</i> **
<i>Glycine max</i>	BR 29 <i>Bradyrhizobium elkani</i>
<i>Leucaena leucocephala</i>	BR 827 <i>Sinorhizobium sp</i> **
<i>Lupinus albus</i>	BR 29 <i>Bradyrhizobium elkani</i>
<i>Macroptilium atropurpureum</i>	BR 1010 <i>Bradyrhizobium sp</i>
<i>Medicago sativa</i>	UFLA 04-74B <i>Sinorhizobium sp</i> ***
<i>Phaseolus vulgaris</i>	CIAT 899 ^T <i>Rhizobium tropici</i>
<i>Sesbania rostrata</i>	ORS 571 ^T <i>Azorhizobium caulinodans</i>
<i>Sesbania virgata</i>	BR 5401 ^T <i>Azorhizobium sp nov.</i> **
<i>Vigna unguiculata</i>	BR 2001 <i>Bradyrhizobium spp</i>

*Estirpe recomendada como inoculante

** De acordo com Moreira et al., 1998

*** Tentativa de classificação pelo hospedeiro de origem, isolada de inoculante em turfa para a espécie.

O experimento constou ainda de dois tratamentos: sem inoculação e com nitrogênio, em que se aplicou NH_4NO_3 , um total de 280 ppm de N por vaso ou 280 mg/l, e outro sem inoculação e sem nitrogênio, este último para verificar se houve ou não contaminação

Foram semeadas, por vaso, seis sementes ; houve a necessidade de quebrar a dormência das sementes de algumas espécies ; a duração em minutos do tratamento com H_2SO_4 concentrado variou de acordo com as espécies: 30 minutos para *Sesbania virgata*, *Leucaena leucocephala* e *Sesbania rostrata*, 4 minutos para *Macroptilium atropurpureum* e 25 minutos para *Acacia mangium*; depois as sementes foram lavadas em água corrente. Todas as sementes das espécies testadas foram desinfetadas superficialmente, após escarificação, com etanol 95 % por cinco minutos e Hipoclorito de sódio por dois minutos. Em seguida, as sementes foram lavadas seis vezes com água destilada esterilizada. Cinco a nove dias após a germinação, fez-se o desbaste deixando-se duas plantas por vaso, as quais foram inoculadas com meio de cultura YMA, semi sólido, na fase log das diferentes estirpes, à razão de um ml por planta.

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com onze tratamentos (BR 5420, UFLA 01-602, UFLA 01-54B, BR 5416, BR 5414, BR 5426, BR 5401, ORS 571, Estirpe recomendada como inoculante da espécie, Testemunha e Nitrogenado) e três repetições. As plantas foram colhidas 65 dias após a semeadura. Foram analisados estatisticamente pelo teste de Duncan a 5%, os pesos de matéria seca da parte aérea, número e peso de nódulos secos. Foram também avaliadas a forma de nódulos e coloração das folhas para verificação do grau de efetividade das estirpes.

No segundo experimento conduzido em setembro de 1999, testou-se a eficiência da nodulação das estirpes tipo ou referência de espécies de rizóbio atualmente descritas, na *Sesbania virgata* (Tabela 4).

TABELA 4. Estirpes tipo ^T e/ou referência de espécies de rizóbio descritas:

ESTIRPES	GÊNERO/ESPÉCIE
BR 5401 ^{T*}	<i>Azorhizobium</i> sp nov.
ORS 571 ^{T*}	<i>Azorhizobium caulinodans</i>
BR 29 *	<i>Bradyrhizobium. elkanii</i>
NZP 5549 ^T	<i>Bradyrhizobium. japonicum</i>
BR 2001	<i>Bradyrhizobium</i> sp
USDA 205 ^T	<i>Sinorhizobium. freedii</i>
CIAT 899 ^{T*}	<i>Rhizobium tropici</i>
CFN 42 ^T	<i>Rhizobium. etli</i>
UFLA 04 -74B	<i>Sinorhizobium</i> sp
NZP 2213 ^T	<i>Mesorhizobium loti</i>

*Também inoculantes respectivamente de *Sesbania virgata*, *Sesbania rostrata*, *Glycine max* e *Phaseolus vulgaris*

Os vasos foram preparados pelo mesmo processo descrito anteriormente, assim como a semeadura e a inoculação. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com doze tratamentos (BR 29, NZP

5549, BR 2001, USDA 205, CIAT 899, CFN 42, UFLA 04-74B, NZP 2213, BR 5401, ORS 571, Testemunha e Nitrogenado) e três repetições. As plantas foram colhidas 70 dias após a semeadura. Foram analisados estatisticamente pelo teste de Duncan a 5%, os pesos de matéria seca da parte aérea, número e peso de nódulos secos. Foram também avaliadas a forma de nódulos e coloração das folhas para verificação do grau de efetividade das estirpes.

No terceiro experimento conduzido em setembro de 1999, verificou-se a capacidade de nodulação caulinar na *Sesbania rostrata* de oito estirpes (BR 5420, UFLA 01-602, UFLA 01-54B, BR 5416, BR 5414, BR 5426, BR 5401) de *Azorhizobium sp* nov. A ORS 571 do *Azorhizobium caulinodans*, foi inoculada separadamente como referência. O preparo dos vasos foi feito pelo mesmo processo descrito anteriormente, diferindo somente na inoculação. A inoculação foi feita no caule com um pincel esterilizado. Para se verificar a eficiência da nodulação caulinar nas plantas pelas estirpe de *Azorhizobium sp* nov. testadas, foram divididos em dois tratamentos, com inoculação mais nitrogênio na solução, com 48 ppm por vaso (dose de arranque uma vez que não houve inoculação na raiz), e sem inoculação com nitrogênio, na mesma concentração, para verificar se houve ou não contaminação.

Em todos os experimentos, a eficiência da inoculação das estirpes nas espécies vegetais foi considerada eficiente, pouco eficiente ou ineficiente quando induziu peso de matéria seca, em relação à testemunha nitrogenada, em respectivamente: > 70%, >40<70% e <40% .

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado, com nove tratamentos (BR 5420, UFLA 01-602, UFLA 01-54B, BR 5416, BR 5414, BR 5426, BR 5401, ORS 571, Testemunha) e três repetições. As plantas foram avaliadas 60 dias após a semeadura, quando se verificou somente se a *Sesbania rostrata* tem a capacidade de nodular no caule com outra espécie de *Azorhizobium*.

III RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro experimento, os dados referentes ao número e peso de nódulos (Tabela 5 e 6) indicam que o desenvolvimento de nódulos foi específico, ou seja, as estirpes inoculantes e homólogas foram as que induziram um maior número de nódulos em suas respectivas hospedeiras (foto 3 a 11), sendo que nenhuma testemunha absoluta ou nitrogenada apresentou nódulos. As estirpes do *Azorhizobium sp* nov. não nodularam a maioria das espécies de leguminosas testadas, com exceção das espécies *Sesbania rostrata*, *Phaseolus vulgaris* e *Macroptilium atropurpureum*, nas quais a nodulação ocorreu na forma de nódulos pequenos, arredondados e em pouca quantidade; além disso, seu interior era pouco rosado, indicando baixos teores de leg-hemoglobina nos nódulos. Assim sendo, sua nodulação foi muito aquém quando comparada com as estirpes inoculantes dessas espécies. Essa ausência ou um número pequeno de nódulos pode estar relacionado com a liberação de exudatos tóxicos pelas plantas (Egeraat, 1972 e Pankhurst e Biggs, 1980), podendo afetar seletivamente a infecção radicular por diferentes estirpes de rizóbio, ou ainda com problemas de especificidade infectiva (Broughton et al., 1980 e Rolfe et al., 1980). Os nódulos pequenos são geralmente ineficientes, pois segundo Bergersen (1978), os nódulos que fixam N₂ em taxas reduzidas geralmente contêm volumes menores de tecidos com bacteróides, devido a um desenvolvimento restrito dos tecidos, ou como ocorre mais comumente, devido à acelerada degeneração de tais nódulos (Basset et al., 1977). Na *Sesbania virgata*, o peso e número de nódulos entre todas as estirpes de *Azorhizobium sp* nov. foi semelhante, inclusive BR 5401, recomendada como inoculante, corroborando a existência de alta similaridade entre estas estirpes. A forma dos nódulos (foto 12) apresentada em todas as plantas de *Sesbania virgata* foi bem semelhante: nódulos grandes,

alongados, de crescimento indeterminado e seu interior estava bem avermelhado, indicando altos teores de leg-hemoglobina.

Análise dos dados referentes aos valores médios de matéria seca (tabela 7) demonstra que a maioria das estirpes recomendadas como inoculantes em espécies de leguminosas induziu a rendimentos próximos ou semelhantes à testemunha nitrogenada, enquanto as estirpes de *Azorhizobium sp* nov. (Fotos 3 a 7 e 9 a 11) tiveram um rendimento bem inferior ao das estirpes inoculantes testadas. A baixa eficiência pode estar relacionada, também, com maior retenção do nitrogênio nos nódulos (Freney e Gibson, 1974), menor capacidade em utilizar a energia proveniente de produtos da fotossíntese por unidade de N₂ fixado (Havelka e Hardy, 1976), maior evolução de H₂ (Shubert e Evans, 1976), ou ainda, baixos teores de leg-hemoglobina nos nódulos (Appleby, 1974). A única espécie que apresentou similaridade entre as estirpes testadas, e todas suas homólogas, na produção da matéria seca da parte aérea, foi a *Sesbania virgata*. Isto é devido ao fato das estirpes testadas serem muito semelhantes entre si, geneticamente, como foi comprovado em estudos de perfil de proteínas totais em gel de poliacrilamida (Moreira et al., 1999).

No segundo experimento, com relação à eficiência das estirpes e à especificidade hospedeira de estirpes de rizóbio (tabela 8), foi observado que a estirpe de *Azorhizobium sp* nov. (BR 5401) (fotos 10 e 11) apresentou maior eficiência em sua hospedeira *Sesbania virgata*. Esta mesma espécie, quando testada com as estirpes de outras espécies de rizóbio (Tabela 8), nodulou apenas com as estirpes ORS 571 *Azorhizobium caulinodans* e BR 29 *Bradyrhizobium elkani* (foto 13), que se apresentaram menos eficientes do que a BR 5401. Estes resultados possivelmente são decorrentes da maior afinidade genética entre *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* (Young, 1996). Porém, outras estirpes de *Bradyrhizobium* não nodularam (NZP 5549 *B. japonicum* e BR 2001 *B. sp*) *S. virgata*. Os outros gêneros *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Rhizobium*

testados também não nodularam a *Sesbania virgata*. Para confirmação de que as estirpes ORS 571 e BR 29 não foram contaminações, procedeu-se ao isolamento dos nódulos formados nestes tratamentos e estes apresentaram características idênticas às estirpes inoculadas, ou seja, a ORS 571 teve crescimento intermediário, alcalinizou o meio e apresentou pequenas colônias bem isoladas e a BR 29 teve crescimento lento, alcalinizou o meio e apresentou colônias maiores, que com o tempo foram se unindo. A tabela 9 nos mostra a eficiência das estirpes testadas, que foi relacionada com coloração interna dos nódulos. Foi constatado que em todas as estirpes que foram eficientes (tabela 9), o interior dos nódulos apresentou uma coloração avermelhada, mais um indicativo de eficiência da fixação do nitrogênio. Ainda com relação à tabela 9, podemos verificar que todas as espécies de leguminosas testadas foram eficientes somente com as estirpes recomendadas e a *Sesbania virgata* é a única espécie que nodulou eficientemente com o *Azorhizobium sp nov.*, mostrando a alta especificidade na simbiose entre estas duas espécies.

No teste de nodulação caulinar na *Sesbania rostrata*, não houve nodulação com nenhuma das oito estirpes de *Azorhizobium sp nov.* testadas. A única estirpe que nodulou o caule foi a estirpe *Azorhizobium caulinodans* (fotos 13 e 14), confirmando o alto grau da especificidade da estirpe ORS 571 com *S. rostrata*.

TABELA 5. Número de nódulos de dez espécies de plantas inoculadas, com diferentes estirpes de *Azorhizobium* sp nov. e suas estirpes homólogas inoculantes em vasos de Leonard com solução nutritiva. Médias de três repetições*.

ESTIRPES	NÚMERO DE NÓDULOS NAS ESPÉCIES TESTADAS EM nº planta ^{1,2}									
	<i>Acacia mangium</i>	<i>Glycine max</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>	<i>Lupinus spp</i>	<i>Macroptilium atropurpureum</i>	<i>Medicago sativa</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Sebania rostrata</i>	<i>Sebania virgata</i>	<i>Vigna unguiculata</i>
ORS 571** <i>A.caulinodans</i>	0	0	0	0	10 C	0	28,5 C	30 A	13,5 AB	0
BR 5401** <i>A. sp nov.</i>	0	0	0	0	12 BC	0	170,5 BC	8,5 B	20 A	0
BR 5420	0	0	0	0	16 B	0	164,5 BC	6,5 BC	15,5 AB	0
UFLA 01-602	0	0	0	0	13,5 BC	0	100,5 BC	5 BC	19 AB	0
UFLA 01-54B	0	0	0	0	15 BC	0	55 BC	7,5 BC	17 AB	0
BR 5416	0	0	0	0	12,5 BC	0	94,5 BC	4,5 BC	15 AB	0
BR 5414	0	0	0	0	12,5 BC	0	220 AB	5,5 BC	18 AB	0
BR 5426	0	0	0	0	15,5 BC	0	170,6 BC	6 BC	13 AB	0
INOCULANTE**	12,5 A (BR 3617)**	95,2 A (BR 29)**	14 A (BR 827)**	21,8 A (BR 29)**	21,5 A (BR 1010)**	75 A (UFLA 04-74 B)**	355 A (CIAT 899)**	-	-	29,2 A (BR 2001)**
N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*As médias com letras iguais nas colunas dentro de cada parâmetro, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5 %.

**Estirpes da espécie vegetal testada, recomendadas como inoculante.

TABELA 6. Peso de nódulos de dez espécies de plantas inoculadas, com diferentes estirpes de *Azorhizobium sp nov.* e suas estirpes homólogas inoculantes em vasos de Leonard com solução nutritiva. Médias de três repetições *.

ESTIRPES	PESO DE NÓDULOS NAS ESPÉCIES TESTADAS EM g planta ⁻¹ *									
	<i>Acacia mangium</i>	<i>Glycine. max</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>	<i>Lupinus spp</i>	<i>Macroptilium atropurpureum</i>	<i>Medicago sativa</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	<i>Sesbania virgata</i>	<i>Vigna unguiculata</i>
ORS 571** <i>A. caulinodans</i>	0	0	0	0	4,2 C	0	6,3 C	33,9 A	25,2 B	0
BR 5401** <i>A. sp nov.</i>	0	0	0	0	5,3 BC	0	40,9 BC	9,1 B	42,7 A	0
BR 5420	0	0	0	0	7,4 BC	0	37,9 BC	7,7 B	31,4 B	0
UFLA 01-602	0	0	0	0	6,4 BC	0	23,6 BC	6,1 B	35,4 B	0
UFLA 01-54B	0	0	0	0	7,5 BC	0	12,2 BC	5,4 B	35,1 B	0
BR 5416	0	0	0	0	4,9 BC	0	15,3 BC	4,8 B	37,6 B	0
BR 5414	0	0	0	0	5,4 BC	0	60,6 AB	4,4 B	36,9 B	0
BR 5426	0	0	0	0	6,8 BC	0	40,2 BC	6,4 B	27,6 B	0
INOCULANTE**	6,4 A (BR3617)**	135,5 A (BR 29)**	13,5 A (BR 827)**	14 A (BR 29)**	9,2 A (BR 1010)**	217 A (UFLA04-74B)**	85,1 A (CIAT899)**	-	-	7,9 A (BR2001)**
N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
T	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*As médias com letras iguais nas colunas dentro de cada parâmetro, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5 %.

**Estirpes da espécie vegetal testada, recomendadas como inoculante.

TABELA 7. Matéria seca da parte aérea de dez espécies de plantas inoculadas, com diferentes estirpes de *Azorhizobium sp nov.* e suas estirpes homólogas inoculantes em vasos de Leonard com solução nutritiva. Médias de três repetições *.

ESTIRPES	MATÉRIA SECA DAS ESPÉCIES TESTADAS EM g planta ⁻¹ *									
	<i>Acacia mangium</i>	<i>Glycine. max</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>	<i>Lupinus spp</i>	<i>Macroptilium atropurpureum</i>	<i>Medicago sativa</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	<i>Sesbania virgata</i>	<i>Vigna unguiculata</i>
ORS 571** <i>A. caulinodans</i>	0,06 C	0,47 C	0,16 C	0,69 E	0,47 B	0,11 D	0,36 B	6,2 A	1,20 BCD	0,25 C
BR 5401** <i>A. sp nov.</i>	0,07 C	0,59 C	0,15 C	1,11 C	0,67 B	0,20 C	0,64 B	0,49C	2,25 A	0,33 C
BR 5420	0,07 C	0,56 C	0,20 C	1,04 C	0,35 B	0,12 D	0,67 B	0,06 C	2,07 AB	0,22 CD
UFLA 01-602	0,08 C	0,45 C	0,15 C	0,87 D	0,70 B	0,12 D	1,12 AB	0,06 C	1,75ABC	0,22 CD
UFLA 01-54B	0,06 C	0,53 C	0,17 C	0,72 E	0,42 B	0,11 D	0,57 B	0,45 C	1,69 ABC	0,20 CD
BR 5416	0,07 C	0,55 C	0,18 C	1,05 C	0,86 B	0,18 C	0,45 B	0,06 C	1,76 ABC	0,29 C
BR 5414	0,06 C	0,45 C	0,16 C	0,61 D	0,62 B	0,17 C	1,24 AB	0,05 C	1,49 ABC	0,19 CD
BR 5426	0,06 C	0,43 C	0,15 C	1,03 C	0,93 B	0,11 D	1,19 AB	0,45 C	1,75 ABC	0,22 CD
INOCULANTE**	0,7 B (BR3617)**	3,32 B (BR 29)**	1,84 B (BR 827)**	1,27 B (BR 29)**	1,88 A (BR 1010)**	0,60 B (BR 04-74B)**	1,80 A (CIAT899)**	-	-	2,03 B (BR2001)**
N	0,85 A	4,01 A	2,10 A	1,54 A	2,33 A	0,73 A	2,15 A	4,7 B	2,4 A	2,88 A
T	0,06 C	0,40 C	0,13 C	0,55 F	0,25 B	0,12 D	0,30 B	0,04 C	0,47 D	0,08 D

*As médias com letras iguais nas colunas dentro de cada parâmetro, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5 %.

**Estirpes da espécie vegetal testada, recomendadas como inoculante.

TABELA 8. Número e peso de nódulos e matéria seca da *Sesbania virgata* inoculadas com estirpes homólogas e estirpes tipo ou referência das espécies de rizóbio conhecidas e testadas em vasos de Leonard com solução nutritiva. Médias de três repetições*.

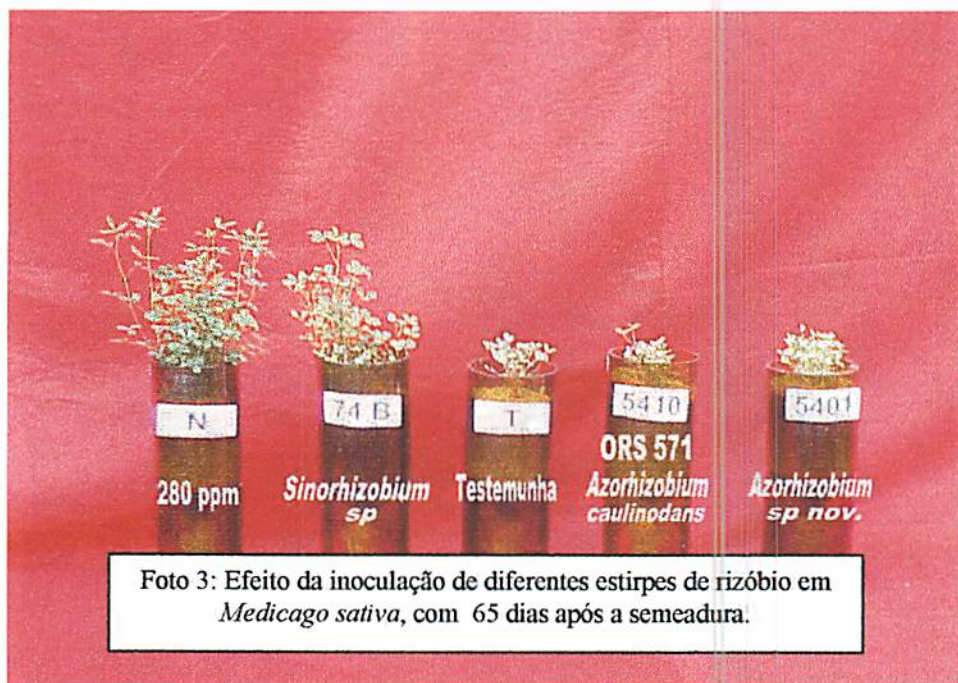
ESTIRPES	Espécie testada <i>Sesbania virgata</i>		
	NÚMERO DE NÓDULOS NA PLANTA TESTADA EM n° planta ⁻¹ *	PESO DE NÓDULOS NAS PLANTA TESTADA EM g planta ⁻¹ *	PESO DE MATÉRIA SECA NA PLANTA TESTADA EM g planta ⁻¹ *
BR 6401 ^T <i>A. sp. nov.</i>	91,9 A	0,55 A	2,85 A
BR 6410(ORS 571) ¹ <i>A. caulimodens</i>	55,5 B	0,25 B	1,66 B
BR 29 <i>B. elkanii</i>	42,6 B	0,16 C	1,05 BC
NZP 5549 ^T <i>B. japonicum</i>	0 C	0 D	0,20 D
BR 2001 <i>Bradyrhizobium sp.</i>	0 C	0 D	0,20 D
USDA 205 ^T <i>S. freedi</i>	0 C	0 D	0,19 D
CIAT 899 ^T <i>R. tropici</i>	0 C	0 D	0,42 CD
CFN 42 ^T <i>R. etli</i>	0 C	0 D	0,24 CD
UFLA 04-74 B <i>Sinorhizobium sp</i>	0 C	0 D	0,18 D
NZP 2213 ^T <i>M. loti</i>	0 C	0 D	0,33 CD
N (280 ppm)	0 C	0 D	3,37 A
T	0 C	0 D	0,18 D

*As médias com letras iguais nas colunas dentro de cada parâmetro, não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%. ¹ Estirpes tipo.

TABELA 9. Especificidade estirpes tipo e referência das espécies de rizóbio descritas e espécies de leguminosas testadas.

Estirpe	Hospedeiro de origem	ESPÉCIES TESTADAS EM VASOS ESTÉREIS												
		Mimosoideae					Papilionoideae							
		<i>Acacia mangium</i>	<i>Leucaena leucocephala</i>	<i>Glycine max</i>	<i>Lupinus spp</i>	<i>Macropitium atropurpureum</i>	<i>Medicago sativa</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	<i>Sesbania virgata</i>	<i>Vigna unguiculata</i>			
BR 3617	<i>Acacia mangium</i>	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BR 29	<i>Glycine max</i>	-	-	E	E	-	-	-	-	-	-	-	e	-
BR 827	<i>L. leucocephala</i>	-	E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BR 1010	<i>M. atropurpureum</i>	-	-	-	-	E	-	-	-	-	-	-	-	-
UFLA-04-74B	<i>Medicago sativa</i>	-	-	-	-	-	E	-	-	-	-	-	-	-
CIAT699	<i>Phaseolus vulgaris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	E	-	-	-	-
ORSS71	<i>Sesbania rostrata</i>	NN	NN	NN	NN	e	NN	NN	e	e	E	e	e	NN
BR 5401	<i>Sesbania virgata</i>	NN	NN	NN	NN	e	NN	NN	e	e	e	e	e	NN
BR 2001	<i>Crotalaria juncea</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	NN	-	-	-	E

Legenda: NN não nodulou, E nodula, eficientemente maior que 70%, e nodula, pouco eficiente menor que 70% e - não foi testado.



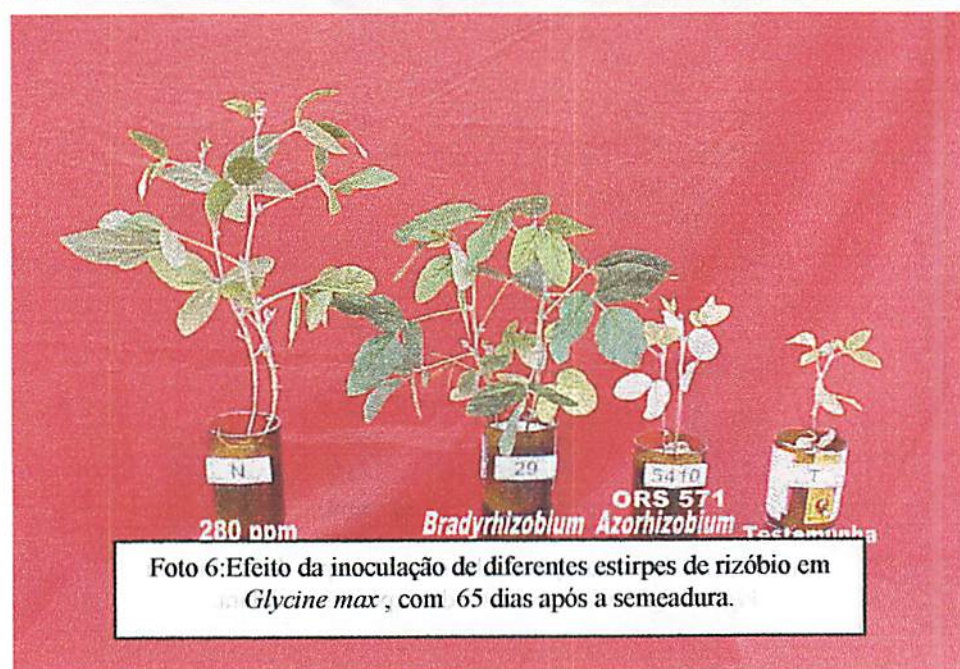
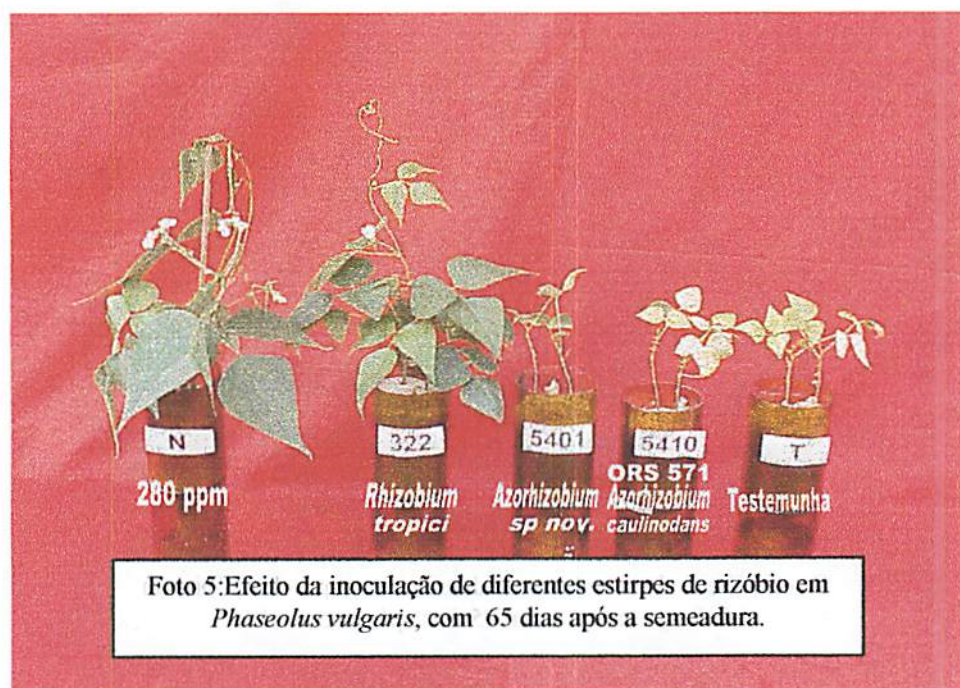




Foto 7: Efeito da inoculação de diferentes estirpes de rizóbio em *Acacia mangium*, com 65 dias após a semeadura.



Foto 8: Efeito da inoculação de diferentes estirpes de rizóbio em *Leucaena leucocephala*, com 65 dias após a semeadura.

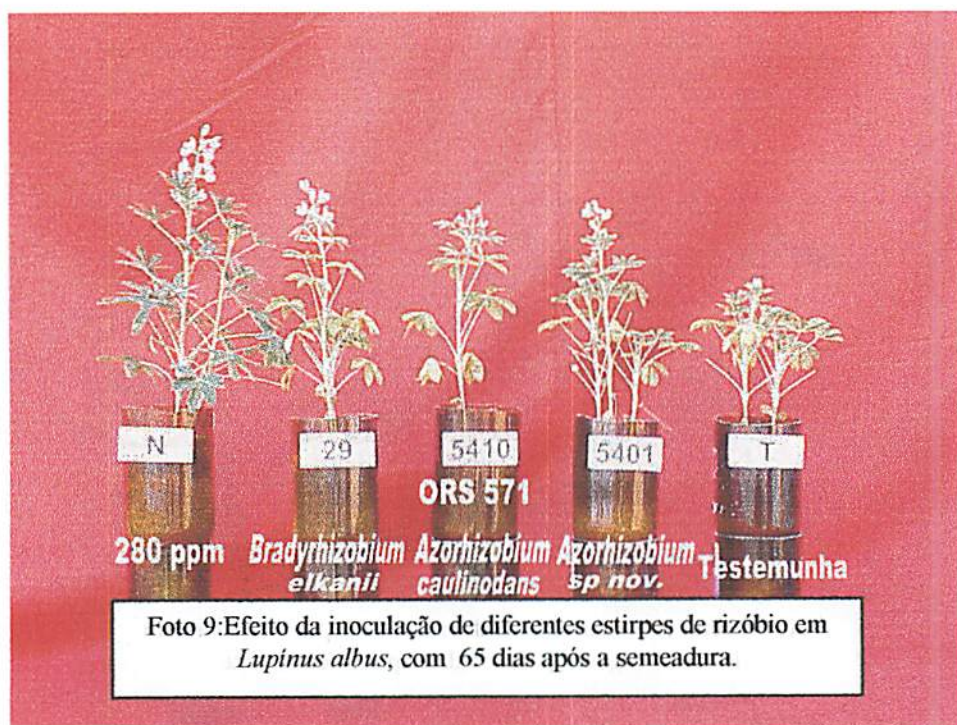


Foto 9: Efeito da inoculação de diferentes estirpes de rizóbio em *Lupinus albus*, com 65 dias após a semeadura.

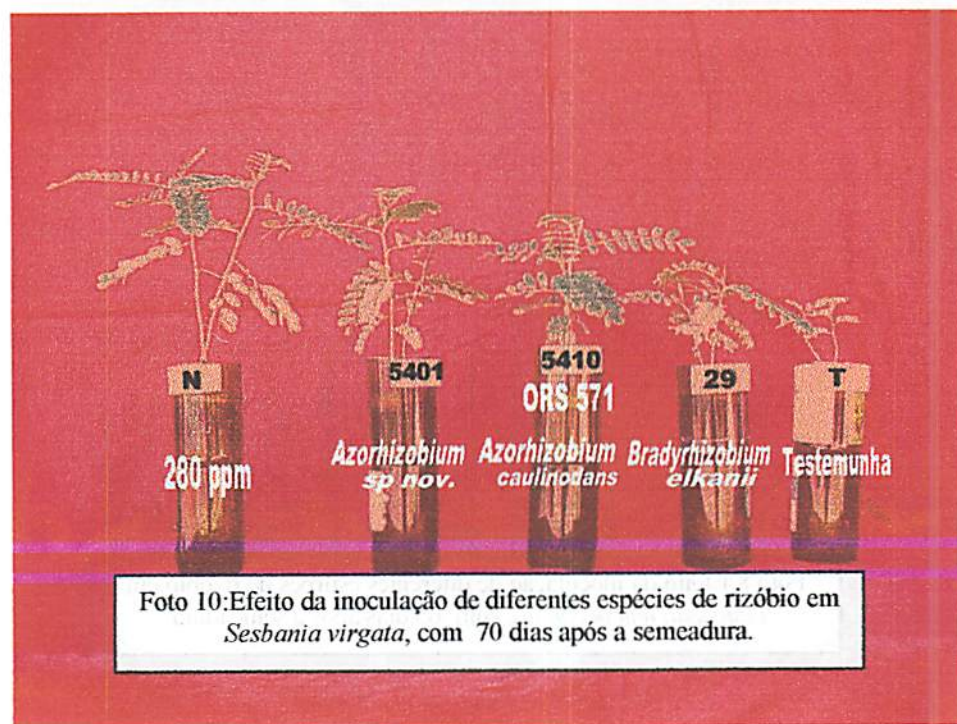


Foto 10: Efeito da inoculação de diferentes espécies de rizóbio em *Sesbania virgata*, com 70 dias após a semeadura.

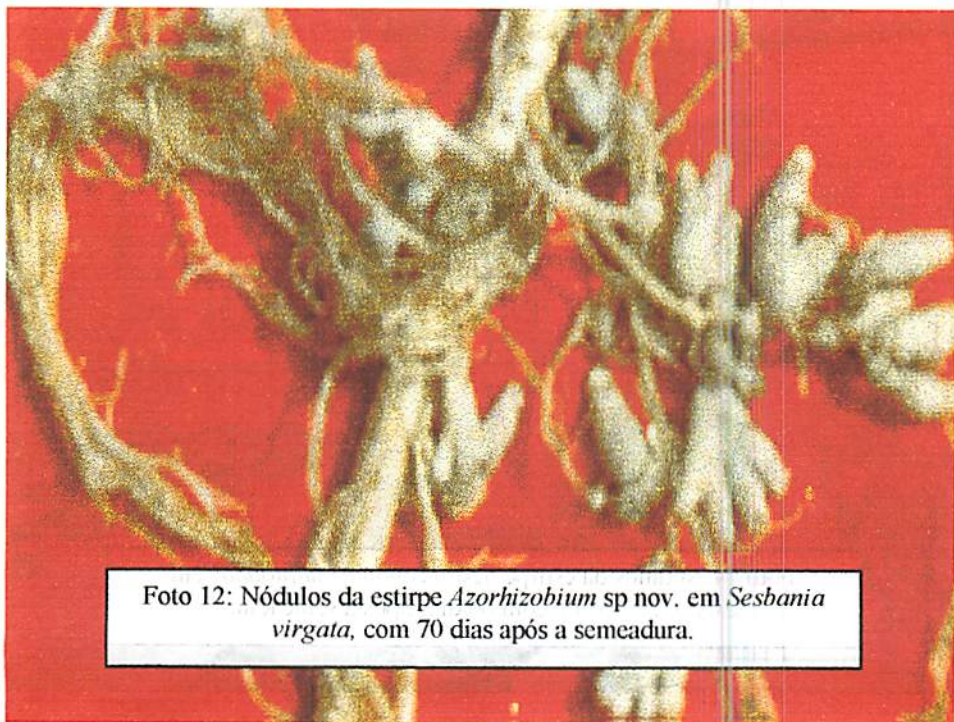
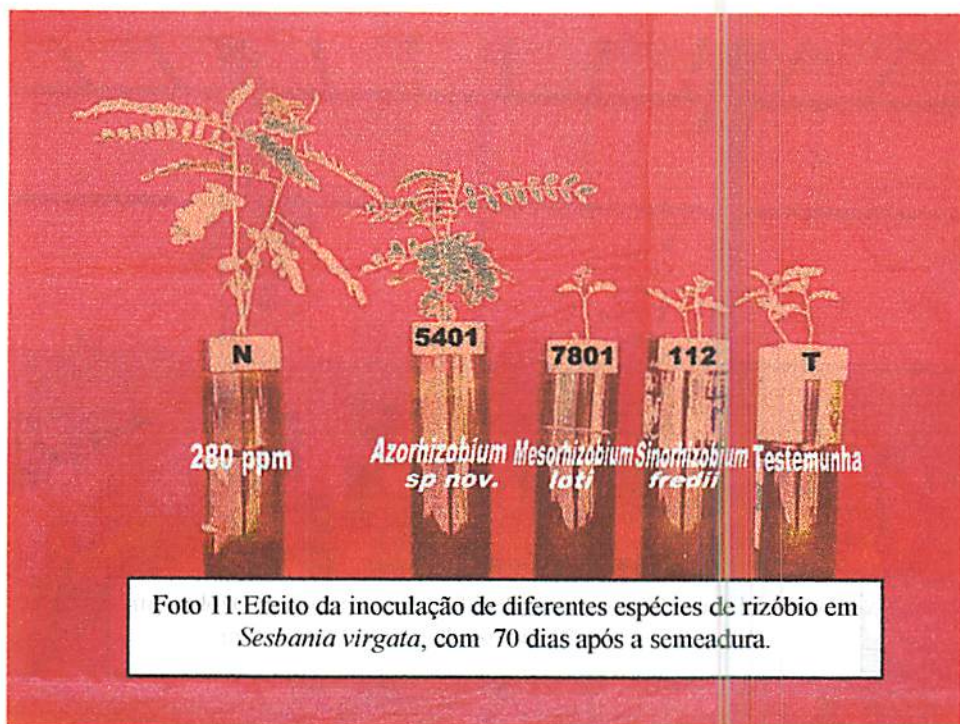




Foto 13: Efeito da inoculação de diferentes espécies de rizóbio em *Sesbania rostrata*, com 60 dias após a semeadura.



Foto 14: Nódulos da estirpe *Azorhizobium caulinodans* em *Sesbania rostrata*, com 60 dias após a semeadura.

V CONCLUSÕES

1. *Azorhizobium* sp nov. nodula eficientemente apenas a *Sesbania virgata*.
2. *Azorhizobium* sp nov. nodula também, mas com pouca eficiência, *Macroptilium atropurpureum*, *Phaseolus vulgaris* e *Sesbania rostrata*.
3. As estirpes de *Azorhizobium* sp nov. não nodulam o caule de *Sesbania rostrata*.
4. A *Sesbania virgata* é nodulada, porém com menor eficiência pelas estirpes ORS 571 *Azorhizobium caulinodans* e BR 29 *Bradyrhizobium elkani*.
5. As estirpes do gêneros *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* e *Rhizobium* não nodulam a *Sesbania virgata*.
6. A especificidade verificada entre *Sesbania virgata* e *Azorhizobium* sp nov. e as características acima corroboram a proposição desta como uma nova espécie do gênero *Azorhizobium*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, O.N. ; ALLEN,E.K. **The leguminosae. A source book of characteristics, uses and nodulation.** university of Madison: Wisconsin, 1981.p.604-607.
- AMARGER, N.; MACHERET, V.; LANGUERRE, G. *Rhizobium galicum* sp nov. and *Rhizobium giardinii* sp nov., from *Phaseolus vulgaris* Nodules. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, p.996-1006,1998.
- APPLEBY, C. A. Development of root-nodule symbiosis. 5. Leghemoglobin. In: QUISPÉL, A. (ed.). **The biology of nitrogen fixation.** Amsterdam-North-Holland, 1974. p.521-553.
- BARNET, Y.M.; CATT, P.C. Distribution and characteristics of root-nodule bacteria isolated from Australian Acacia spp. **Plant and Soil**, v. 135, p.109-120, 1991.
- BASSETT, B.; GOODMAN, R.N.; NOVACKY, A. UI- Trastructure of soybean nodules. II. Deterioration of symbiosis in infective nodules. **Canadian Journal Microbiology**, v.23, p.873-882, 1977.
- BERGERSEN, F.J. Physiology of legume symbiosis. In: DOMMERGUES, Y.R. ; KRUPA,S.V. (eds.). **Intaractions between non-pathogenic soil microorganisms and plants.** Amsterdam: Elsevier, 1978. p.305-333.
- BROUGHTON, W.J. ; VAN EGERAAT, A. W.S.M. ; LIE,T.A. Dynamics of *Rhizobium* competition for nodulation of *Pisum sativum* cv Afghanistan. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 26, p. 562- 565, 1980.
- CHEN, W.; WANG, E. ; WANG, S. ; LI,Y,CHEN, X.; LI, Y. Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moder-ately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang People's Republic of China. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, p.153-159, 1995.
- CHEN, W.X.; L.L. ; G.S.; QI, Y. L; WANG, E.T.; YUAN, H.L.; LI, J.L. *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.41, p.275-280, 1991.
- CHEN, W. ; TAN, Z.; GAO, J.; LI,Y.; WANG, E. *Rhizobium hainanense* sp nov. isolated from Tropical legumes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.47, p.870-873, 1997.

- D'OREY ; LIBERATO, M.C. **Flora da Guiné Portuguesa- Papilionaceae.** Lisboa: Ministério do Ultramar, 1971. 172p.
- DAKORA, F.D. ; KEYA, S.O. Nitrogen fixation in sustainable agriculture : the African experience . *Soil Biology Biochem.*, v.29, n. 5/6, p. 809-818, 1997.
- DE LAJUDIE, P.; LAURENT-FULELE, E.; WILLENS, A.; TORCK, U.; COOPMAN, R.; COLLINS, M.D.; KESTERS, K.; DREYFUS, B. *Allorhizobium undicola* gen. Nov., sp. nov., nitrogen-fixing bacteria that efficiently nodulate *Neptunia natans* in Senegal *International Journal of Systematic Bacteriology* v.48, p.1277-1290, 1998.
- DE LAJUDIE, P. ; WILLEMS, 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*, v.44, p.715-733, 1994.
- DE LAJUDIE, P. ; WILLENS, A. ; NICK, G. ; MOREIRA, F. ; MOLOUBA, F. ; HOSTE, B. ; TORCK, U. ; NEYRA, M. Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mezorhizobium plurifarum* sp nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.48, p.369- 382, 1998.
- DOYLE, J.J. Phylogeny of the legume family: an approach to understanding the origins of nodulation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v.25, p.325-349, 1994.
- DREYFUS, B. ; GARCIA, J.L. M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen.nov. sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.38, p.89-98, 1988.
- EISINGER, S.M. Levantamento dos gêneros *Sesbania*, *Indigofera* e *Tephrosia* no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: UFRS, 1989. 94p.
- FARIA, S.M. ; LIMA, H.C. ; OLIVARES, F.L. ; MELO, R.B. ; XAVIER, R.P. **Fixação biológica de nitrogênio em florestais - aspectos da nodulação, morfologia e estrutura de nódulos e especificidade hospedeira e as implicações na sistemática de Leguminosae.** Rio de Janeiro: Embrapa Agrobiologia, 1998. 22p.
- FARIA, S. M. de ; FRANCO, A. ; JESUS, R.M. ; MENANDRO, M.S.; BAÍTELLO, J.B.; MUCCI, E.S.F.; DOBEREINER, J.; SPRENT, J.I. New

- nodulating legume trees from South-East Brazil. *New Phytologist*, v.98, p.317-328, 1984.
- FRANCO, A.A. ; FARIA, S.M. de. The contribution of nitrogen fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. *Soil Biology Biochem.* v. 29, n.5/6, p. 897-904, 1997.
- FRENEY, J. R. ; GIBSON, A. H. Non-Protein nitrogen accumulation in legume nodules. *Mechan. regul. Plant growth B.*, Wellington, v.12, p.35-49, 1974.
- GRAHAM, P. H. ; SADOWSKY, M.J. ; KEYSER, H.H. ; BARNET, Y.M. ; BRADLEY, R. S. ; COOPER, J. E. ; DE LEY, D. J. ; JARVIS, B.D.W. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root-and stem nodulating bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology.* v.41, p.582-587, 1991.
- HAUKKA, K. ; LINDSTROM, K. ; YOUNG, J.P.W. Diversity of partial 16S rRNA sequences among and within strains of African rhizobia isolated from Acacia and prosopis. *Systematic and Applied Microbiology*, v.19, p.352-359, 1996.
- HAVELKA, U.D. ; HARDY, R.W.F. Photosynthate as a major factor limiting nitrogen fixation by field grown legumes with emphasis on soybeans. In: NUTMAN, P.S. (ed.). *Symbiotic nitrogen fixation in plants*. Cambridge: Cambridge University, 1976. p.421-429.
- JARVIS, B.D.W. ; PANKHURST, C.E. ; PATEL, J.J. *Rhizobium loti*, a new species of legume root nodule bacteria. *International Journal System Bacteriology*, v.32, p. 378-380, 1982.
- JARVIS, B.D.W. ; VAN BERKUN, P. ; CHEN, W.X. ; NOUR, S.M. ; FERNANDEZ, M.P. ; CEYET-MAREL, J. M. ; GILLIS, M. P. Transfer of *Rhizobium loti*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium mediterraneum*, and *Rhizobium tianshanense* to *Mesohizobium* gen. nov. *International Journal System Bacteriology*, v.47, p 895-898, 1997.
- JORDAN, D.C. Rhizobiaceae. In: KREIG N.R.(ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984, v. 1, p. 234-256.
- KUYKENDALL, L.D. ; SAXENA, B. ; DEVINE, T.E. ; UDELL, S. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology*, v.38, p.501-505, 1992.
- LEWIN, A. ; ROSENBERG, C. ; MEYER, H. Multiple host-specificity loci of the broad host-range *Rhizobium* sp. NGR234 selected using the widely

- compatible legume *Vigna unguiculata*. *Plant Molecular Biology*, V.8, p.447-459, 1987.
- LIEBERMAN, M.T. ; MALLORY, L.M. ; SINIKINS, S. ; ALEXANDER, M. Numerical taxonomic analysis of cross-inoculation patterns of legumes and *Rhizobium*. *Plant and Soil*, v.84, p. 225-244, 1985.
- LINDSTROM, K. *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.39, 365-367, 1989.
- MARTINEZ-ROMERO, E. ; SEGOVIA, L. ; MERCANTE, F.B.; FRANCO, A.A. ; GRAHAM, P.H. ; PARDO, M.A. *Rhizobium Tropici*, a new species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena spp.* Trees. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.41, p.417-426, 1991.
- MOREIRA, F.M.S. **Caracterização de estirpes de rizóbio isoladas de espécies florestais pertencentes a diversos grupos de divergência de leguminosae introduzidas ou nativas da Amazônia e Mata Atlântica.** Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1991. 136p. (Tese-Doutorado)
- MOREIRA, F.M.S.; GILLIS, M.; POT, B.; KERSTERS, K.; FRANCO, A. A. Characterization of rhizobia isolated from different diver-gence groups of tropical Leguminosae by comparative poly-acrylamide gel electrophoresis of their total proteins. *Systematic and Applied Microbiology*, v.16, p.135-146, 1993.
- MOREIRA, F.M.S.; GONÇALVES, M.; CARVALHO, Y.; HAUKKA, K.; YOUNG, P.J.W.; FARIA, S.M.; FRANCO, A. A. ; CRUZ, L.M. *Azorhizobium johannense* sp nov. and *Sesbania virgata* Caz. Pers.: a highly specific symbiosis. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON NITROGEN FIXATION, 12, Foz do Iguaçu, 1999. *Anais...* Foz do Iguaçu, 1999. p 117.
- MOREIRA, F.M.S. ; HAUKKA, K.; YOUNG, J.P.W. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest Legumes in Brazil *Molecular Ecology*, v.7, p.889-855, 1998.
- MOREIRA, F.M.S. ; SILVA, M.F; FARIA, S.M. Occurrence of nodulation in legume species in the Amazon region of Brazil. *New Phytologist*, v.121, p.563-570, 1992.
- NINER, M.B.; HIRSH, A. M. How Many *Rhizobium* Genes, in Addition to *nod*, *nif/fix*, and *exo*, are Needed for Nodule. Development and Fuction? *Symbiosis*, v.24 p.51-102, 1997.

- NOUR, S.M. ; CLEYET-MAREL, J.C.; NORMAND, P.; FERNANDEZ, M. Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.45, p.640-648, 1995.
- NOUR, S.M. ; FERNANDEZ, M.P. ; NORMAND, P. ; CLEYET-MAREL, J.C. *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.) . **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.44, p.511-522, 1994.
- ODEE, D.W.; SUTHERLAND, J.M.; KIMITI, J. M.; SPRENT, J.I. Natural rhizobial populations and nodulation status of woody legumes growing in diverse Kenyan conditions. **Plant and Soil**, v.173, p.211-224, 1995.
- OYAIZU, H. ; MATSUMOTO, S. ; MINAMISAWA, K. ; GAMOU, T. distribution of rhizobia in leguminous plants surveyed by phylogenetic identification. **Journal of General and Applied Microbiology**, v.39, p.339-354, 1993.
- PANKHURST, C. E. ; BIGGS, D. R. Sensitivity of *Rhizobium* to selected isoflavonoids. **Canadian Journal Microbiology**, v.26, p.542-545, 1980.
- POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do Pantanal. Corumbá: EMBRAPA/CPAP/SPL, 1994. 320p.**
- ROLFE, R. G.; GRESSHOFF, P. M.; SHINE, J.; VINCENT, J.M. Interaction between a non-nodulation and an ineffective mutant of *Rhizobium Trifolii* resulting in effective (nitrogen-fixing) nodulation. **Applied Env. Microbiology**, Baltimore, v.39, p.449-452, 1980.
- ROME, S.; FERNANDEZ, M.P.; BRUNEL, B.; NORMAND, P.; CLEYET-MAREL, J.C. *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.46, p.972-980, 1996.
- SCHOLLA, M. H.; ELKAN, G.H. *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast-growing species effectively nodulates soybeans. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.34, p.484-486, 1984.
- SCHUBERT, K.R. ; EVANS, H. Hydrogen evolution: a major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodule symbionts. **Proc. Natl. Acad. Science**, Washington, v.4, p.1207-1211, 1976.
- SEGOVIA, L.; YOUNG, J.P.W.; MARTINEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type 1 strains as *Rhizobium elii* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.43, p.374-377, 1993.

- SPRENT, J.I. Legume trees and shrubs in the tropics: N₂ fixation in perspective. In: SPRENT, J.I. *Soil biology and biochemistry*. 1995. v.27, p.401-407. (Tese-Doutorado em Botânica)
- VAN BERKUM, P.; BEYENE, D.; BAO, G.; CAMPBELL, T.^a; EARDLY, B.D. *Rhizobium mongolense* sp. nov is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and form nitrogen fixing symbiosis with *Medicago ruthenica* [(L.) Lebedour]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.48, p.13-22, 1998.
- VICENT, J.M. *A Manual for the practical study of root-nodule bacteria*. Oxford-UK: Blackwell Scientific, 1970.p.73-104
- WANG, E.T. ; VAN BERKUM, P. ; BEYENE, D. ; SUI, H.X.; CHEN, W.N. ; MARTINEZ-ROMERO, E. *Rhizobium hautlense* sp nov. a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 48, p.687- 699, 1998.
- WANG, E.T. ; VAN BERKUM, P. ; BEYENE, D. ; SUI, H.X. ; CHEN, W.N. ; MARTINEZ-ROMERO, E.. Diversity of rhizobia associated with *Amorpha fruticosa* isolated from Chinese soils and description of *Mesorhizobium amorphae* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.49, p. 51-65, 1999.
- XU, L.M.; GE, C.; CUI, Z.; LI, J.; FAN, H. *Bradyrhizobium liaoningensis* sp. nov. isolated from the root nodules of soybean. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.45, p.706-711, 1995.
- YOUNG, J.P.W. Phylogeny and taxonomy of rhizobia. *Plant and Soil*. v. 186, p. 45-52, 1996.
- ZHANG, X.; HARPER, R.; KARSISTO, M.; LINDSTROM, K. Diversity of *Rhizobium* bacteria isolated & on the root nodules of leguminous trees. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.41, p.104-113, 1991.

ANEXOS

ANEXO A	Página
TABELA 1A	Resumo da ANAVA para mat. seca da parte aérea de plantas de <i>Medicago sativa</i> cultivadas com diferentes estirpes..... 40
TABELA 2A	Resumo da ANAVA para mat. seca da parte aérea de plantas de <i>V. unguiculata</i> cultivadas com diferentes estirpes..... 40
TABELA 3A	Resumo da ANAVA para mat. seca da parte aérea de plantas de <i>P. vulgaris</i> cultivadas com diferentes estirpes..... 40
TABELA 4A	Resumo da ANAVA para número de nódulos de plantas de <i>P. vulgaris</i> cultivadas com diferentes estirpes..... 40
TABELA 5A	Resumo da ANAVA para peso de nódulos de plantas de <i>P. vulgaris</i> cultivadas com diferentes estirpes..... 40
TABELA 6A	Resumo da ANAVA para mat. seca da parte aérea de plantas de <i>Glycine max</i> cultivadas com diferentes estirpes..... 41
TABELA 7A	Resumo da ANAVA para mat. seca da parte aérea de plantas de <i>L. leucocephala</i> cultivadas com diferentes estirpes..... 41
TABELA 8A	Resumo da ANAVA para mat. seca da parte aérea de plantas de <i>A. mangium</i> cultivadas com diferentes estirpes..... 41
TABELA 9A	Resumo da ANAVA para mat. seca da parte aérea de plantas de <i>Lupinus</i> sp cultivadas com diferentes estirpes..... 41
TABELA 10A	Resumo da ANAVA para número de nódulos de plantas de <i>S. virgata</i> cultivadas com estirpes homólogas e estirpes tipo..... 41
TABELA 11A	Resumo da ANAVA para peso de nódulos de plantas de <i>S. virgata</i> cultivadas com estirpes homólogas e estirpes tipo..... 42
TABELA 12A	Resumo da ANAVA para mat. seca da parte aérea de plantas de <i>S. virgata</i> cultivadas com estirpes homólogas e estirpes tipo..... 42

TABELA 13A	Resumo da ANAVA para número de nódulos de plantas de <i>S. rostrata</i> cultivadas com diferentes estirpes.....	42
TABELA 14A	Resumo da ANAVA para peso de nódulos de plantas de <i>S. rostrata</i> cultivadas com diferentes estirpes.....	42
TABELA 15A	Resumo da ANAVA para mat. seca da parte aérea de plantas de <i>S. rostrata</i> cultivadas com diferentes estirpes.....	42
TABELA 16A	Resumo da ANAVA para número de nódulos de plantas de <i>M. atroporpureum</i> cultivadas com diferentes estirpes.....	43
TABELA 17A	Resumo da ANAVA para peso de nódulos de plantas de <i>M. atroporpureum</i> cultivadas com diferentes estirpes.....	43
TABELA 18A	Resumo da ANAVA para mat. seca da parte aérea de plantas de <i>M. atroporpureum</i> cultivadas com diferentes estirpes.....	43
TABELA 19A	Resumo da ANAVA para número de nódulos de plantas de <i>S. virgata</i> cultivadas com diferentes estirpes.....	43
TABELA 20A	Resumo da ANAVA para mat. seca da parte aérea de plantas de <i>S. virgata</i> cultivadas com diferentes estirpes.....	43

TABELA 1A. Resumo da ANAVA para mat. seca da parte aérea de plantas de *Medicago sativa* cultivadas com diferentes estirpes.

Fonte de Variação	GL	QM	Valor F	P > F
Estirpe	9	0,47	66,13	0,00000
Repetição	2	0,008	1,09	0,35849
Resíduo	18	0,007		

CV = 19,63 %

TABELA 2A. Resumo da ANAVA para mat. seca da parte aérea de plantas de *V. unguiculata* cultivadas com diferentes estirpes.

Fonte de Variação	GL	QM	Valor F	P > F
Estirpe	9	8,65	322,10	0,00000
Repetição	2	0,0061	0,23	*****
Resíduo	18	0,027		

CV = 14,99 %

TABELA 3A. Resumo da ANAVA para mat. seca da parte aérea de plantas de *P. vulgaris* cultivadas com diferentes estirpes.

Fonte de Variação	GL	QM	Valor F	P > F
Estirpe	9	3,67	2,93	0,02688
Repetição	2	0,59	0,47	*****
Resíduo	18	1,25		

CV = 59,56 %

TABELA 4A. Resumo da ANAVA para número de nódulos de plantas de *P. vulgaris* cultivadas com diferentes estirpes.

Fonte de Variação	GL	QM	Valor F	P > F
Estirpe	9	148010,9	4,26	0,00499
Repetição	2	60024,9	1,73	0,20779
Resíduo	18	34780,03		

CV = 78,85 %

TABELA 5A. Resumo da ANAVA para peso de nódulos de plantas de *P. vulgaris* cultivadas com diferentes estirpes.

Fonte de Variação	GL	QM	Valor F	P > F
Estirpe	9	0,77	2,96	0,05
Repetição	2	48,80	185,53	0,00001
Resíduo	18	0,26		

CV = 11,62 %

TABELA 6A. Resumo da ANAVA para mat. seca da parte aérea de plantas de *Glycine max* cultivadas com diferentes estirpes.

Fonte de Variação	GL	QM	Valor F	P > F
Estirpe	9	17,25	290,66	0,00000
Repetição	2	0,0068	0,115	*****
Resíduo	18	0,059		

CV = 11,95 %

TABELA 7A. Resumo da ANAVA para mat. seca da parte aérea de plantas de *L. leucocephala* cultivadas com diferentes estirpes.

Fonte de Variação	GL	QM	Valor F	P > F
Estirpe	9	0,914	59,98	0,00000
Repetição	2	0,014	0,92	*****
Resíduo	18	0,015		

CV = 32,70 %

TABELA 8A. Resumo da ANAVA para mat. seca da parte aérea de plantas de *A. mangium* cultivadas com diferentes estirpes.

Fonte de Variação	GL	QM	Valor F	P > F
Estirpe	9	4,879	343,55	0,00000
Repetição	2	0,021	1,44	0,26210
Resíduo	18	0,014		

CV = 14,15 %

TABELA 9A. Resumo da ANAVA para mat. seca da parte aérea de plantas de *Lupinus sp* cultivadas com diferentes estirpes.

Fonte de Variação	GL	QM	Valor F	P > F
Estirpe	9	1,04	71,52	0,00000
Repetição	2	0,018	1,28	0,30215
Resíduo	18	0,015		

CV = 6,24 %

TABELA 10A. Resumo da ANAVA para número de nódulos de plantas de *S. virgata* cultivadas com estirpes homólogas e estirpes tipo.

Fonte de Variação	GL	QM	Valor F	P > F
Estirpe	9	12965,41	47,91	0,0000
Repetição	2	52,3	0,19	*****
Resíduo	18	270,59		

CV = 43,28 %

TABELA 11A. Resumo da ANAVA para peso de nódulos de plantas de *S. virgata* cultivadas com estirpes homólogas e estirpes tipo.

Fonte de Variação	GL	QM	Valor F	P > F
Estirpe/Isolado (EI)	9	0,39	123,13	0,0000
Repetição	2	0,002	0,54	*****
Resíduo	18	0,003		

CV = 29,71 %

TABELA 12A. Resumo da ANAVA para mat. seca da parte aérea de plantas de *S. virgata* cultivadas com estirpes homólogas e estirpes tipo.

Fonte de Variação	GL	QM	Valor F	P > F
Estirpe	9	17,09	22,16	0,0000
Repetição	2	1,09	1,42	0,26819
Resíduo	18	0,77		

CV = 41,92 %

TABELA 13A. Resumo da ANAVA para número de nódulos de plantas de *S. rostrata* cultivadas com diferentes estirpes .

Fonte de Variação	GL	QM	Valor F	P > F
Estirpe	11	724,14	11,07	0,00000
Repetição	2	6,86	0,11	*****
Resíduo	22	65,44		

CV = 60,17 %

TABELA 14A. Resumo da ANAVA para peso de nódulos de plantas de *S. rostrata* cultivadas com diferentes estirpes.

Fonte de Variação	GL	QM	Valor F	P > F
Estirpe	11	16,86	11,88	0,00045
Repetição	2	7,23	5,09	0,01400
Resíduo	22	1,42		

CV = 16,04 %

TABELA 15A. Resumo da ANAVA para mat. seca da parte aérea de plantas de *S. rostrata* cultivadas com diferentes estirpes .

Fonte de Variação	GL	QM	Valor F	P > F
Estirpe	11	53,44	254,67	0,00000
Repetição	2	0,08	0,39	*****
Resíduo	22	0,21		

CV = 24,34 %

TABELA 16A. Resumo da ANAVA para número de nódulos de plantas de *M. atroporpureum* cultivadas com diferentes estirpes.

Fonte de Variação	GL	QM	Valor F	P > F
Estirpe	11	472,67	12,47	0,00000
Repetição	2	1463,58	38,6	0,00000
Resíduo	22	37,91		

CV = 25,74 %

TABELA 17A. Resumo da ANAVA para número de nódulos de plantas de *M. atroporpureum* cultivadas com diferentes estirpes

Fonte de Variação	GL	QM	Valor F	P > F
Estirpe	11	0,77	2,96	0,05
Repetição	2	48,80	185,53	0,00001
Resíduo	22	0,26		

CV = 11,62 %

TABELA 18A. Resumo da ANAVA para mat. seca da parte aérea de plantas de *M. atroporpureum* cultivadas com diferentes estirpes.

Fonte de Variação	GL	QM	Valor F	P > F
Estirpe	11	4,63	9,36	0,00000
Repetição	2	0,42	0,86	*****
Resíduo	22	0,49		

CV = 42,24 %

TABELA 19A. Resumo da ANAVA para número de nódulos de plantas de *S. virgata* cultivadas com diferentes estirpes

Fonte de Variação	GL	QM	Valor F	P > F
Estirpe	11	522,47	6,26	0,00014
Repetição	2	1837,69	22,01	0,00000
Resíduo	22	83,51		

CV = 35,23 %

TABELA 20A. Resumo da ANAVA para mat. seca da parte aérea de plantas de *S. virgata* cultivadas com diferentes estirpes.

Fonte de Variação	GL	QM	Valor F	P > F
Estirpe	11	3,62	3,67	0,00454
Repetição	2	0,12	0,12	*****
Resíduo	22	0,98		

CV = 32,4 %