

SEÇÃO III - BIOLOGIA DO SOLO

DIVERSIDADE GENÉTICA E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE RIZÓBIOS NODULADORES DE ACÁCIA-NEGRA DE SOLOS DO RIO GRANDE DO SUL⁽¹⁾

Luciano Kayser Vargas⁽²⁾, Bruno Brito Lisboa⁽²⁾, Dércio Scholles⁽³⁾, José Ricardo Pfeifer Silveira⁽²⁾, Gabriela Cardoso Jung⁽⁴⁾, Camille Eichelberger Granada⁽⁵⁾, Andrei Gibbon Neves⁽⁶⁾, Marcos Martins Braga⁽⁶⁾ & Tatiana Negreiros⁽⁶⁾

RESUMO

A acácia-negra é a terceira espécie florestal mais cultivada no Brasil. Além de sua importância econômica, é utilizada na recuperação de áreas degradadas, nas quais o solo geralmente apresenta pH baixo e altos teores de Al. O presente trabalho objetivou avaliar a diversidade genética de rizóbios naturais de solos do Rio Grande do Sul e selecionar isolados eficientes na fixação de N₂ em condições de pH baixo. Um total de 50 isolados de *Bradyrhizobium* sp. foi obtido, os quais, juntamente com as estirpes recomendadas BR 3067 e BR 3068, foram caracterizados com o marcador BOX A 1-R. O padrão de bandas dos isolados foi utilizado na construção de um dendrograma, a partir do qual se calculou o índice de diversidade de Shannon. Dez isolados foram testados quanto à tolerância a pH baixo e à presença de Al, selecionando-se oito para o teste de eficiência simbiótica em casa de vegetação. Observou-se diversidade genética elevada entre os isolados, com a formação de 10 grupos, a partir do ponto de corte de 70 % de similaridade e com o índice de diversidade de 4,30. A presença de Al não afetou os isolados avaliados, que tiveram seu crescimento reduzido em pH 4,5. Quanto à eficiência simbiótica, os isolados T6-16 e V-7 foram os mais eficientes, assemelhando-se à estirpe recomendada BR 3068.

Termos de indexação: fixação biológica de nitrogênio, PCR, *Rhizobium*, *Acacia mearnsii*.

⁽¹⁾ Trabalho realizado com o apoio financeiro da FAPERGS. Recebido para publicação em agosto de 2006 e aprovado em março de 2007.

⁽²⁾ Pesquisador da FEPAGRO. Rua Gonçalves Dias 570, CEP 90130-060 Porto Alegre (RS). E-mail: luciano-kayser@fepagro.rs.gov.br

⁽³⁾ Professor Adjunto do Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Av. Bento Gonçalves 7712, CEP 97105-400 Porto Alegre (RS). E-mail: scholles@ufrgs.br

⁽⁴⁾ Acadêmica de Biologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUC-RS. Av. Ipiranga 6681, CEP 90619-900 Porto Alegre (RS). E-mail: gabriela_jung@yahoo.com.br

⁽⁵⁾ Acadêmica de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, UERGS. Bolsista da FAPERGS. E-mail: camillegranada@hotmail.com

⁽⁶⁾ Acadêmico de Biologia, UFRGS. E-mail: marcosmb@portoweb.com.br

SUMMARY: GENETIC DIVERSITY AND SYMBIOTIC EFFICIENCY OF BLACK WATTLE-NODULATING RHIZOBIA IN SOILS OF RIO GRANDE DO SUL STATE, BRAZIL

Black wattle is the third most cultivated forest species in Brazil. Besides its economic importance, black wattle is also used to restore degraded areas, where soils are generally acid and Al levels high. This study intended to investigate the genetic diversity of indigenous rhizobia in soils in Rio Grande do Sul and to select isolates that fix N₂ efficiently at low pH. Fifty Bradyrhizobium sp. isolates were obtained, which, along with the recommended strains BR 3067 and BR 3068, were molecularly characterized by PCR with primer BOX A 1-R. DNA band patterns of the isolates were used to construct a dendrogram by which the Shannon diversity index was calculated. Ten isolates were further tested for low pH tolerance and Al presence. Eight isolates were selected for a nitrogen-fixing greenhouse trial. High genetic diversity was observed among the isolates. Ten clusters were formed based on a 70 % similarity cut-off level and a diversity index of 4.3. The presence of Al did not affect the tested isolates, while growth decreased at pH 4.5. With respect to the symbiotic efficiency, T6-16 and V-7 were the most effective isolates, similar to the recommended strain BR 3068.

Index terms: biological nitrogen fixation, PCR, Rhizobium, Acacia mearnsii.

INTRODUÇÃO

O gênero *Acacia* é representado por mais de 800 espécies, a maioria árvores e arbustos que ocorrem naturalmente na Austrália, Índia, África e América do Sul (Caldeira et al., 2001; Lafay & Burdon, 2001). No Estado do Rio Grande do Sul, a espécie *Acacia mearnsii*, popularmente conhecida como acácia-negra, é a mais cultivada. O Estado é o maior produtor de acácia-negra no Brasil, tornando-a a terceira espécie florestal mais cultivada, com uma área inferior apenas às ocupadas pelos gêneros *Eucalyptus* e *Pinus* (Santos & Ferreira, 2002). A importância econômica da espécie decorre do aproveitamento da madeira – para produção de celulose, aglomerados, lenha e carvão – e da casca – para extração de tanino, utilizado pela indústria coureira (Caldeira et al., 2001).

Por se tratar de uma leguminosa capaz de fixar N₂ atmosférico em simbiose com rizóbios, a acácia-negra dispensa o aporte de N mineral para seu cultivo, além de melhorar a qualidade do solo mediante o aumento dos seus teores de N total (Vezzani et al., 2001). Associadas ao processo de fixação biológica de N₂, a rusticidade da planta e a formação de simbioses com fungos micorrízicos arbusculares (Udaiyan et al., 1997) permitem a utilização da acácia-negra na recuperação de solos degradados, como as áreas de mineração, onde há escassez de nutrientes, pH baixo e teores elevados de Al (Campos et al., 2003).

Embora a acácia-negra apresente elevado potencial de fixação de N₂ (Schumacher et al., 2003), a quantidade de N₂ fixado e o conseqüente sucesso na implantação da floresta dependem da eficiência da estirpe de rizóbio que esteja atuando no processo. Sabe-se que

as espécies do gênero *Acacia* são noduladas por rizóbios pertencentes aos gêneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* e *Bradyrhizobium* (Lafay & Burdon, 2001), além de uma bactéria do gênero *Ochrobactrum* (Ngom et al., 2004), que nodula *A. mangium*. Com relação a *A. mearnsii*, acreditava-se que a espécie estabelecia relações simbióticas apenas com estirpes de *Bradyrhizobium*, as quais apresentariam elevado grau de especificidade (Leitão, 1997). Contudo, mais recentemente, constatou-se que, apesar de as estirpes de *Bradyrhizobium* serem predominantes, *A. mearnsii* também é nodulada por *Rhizobium tropici* (Lafay & Burdon, 2001). Esse resultado mostra o pouco que ainda se conhece sobre os rizóbios que nodulam acácia-negra e demonstra, ainda, o grande potencial para seleção de novas estirpes de rizóbios mais eficientes do que as atualmente recomendadas.

O presente trabalho teve como objetivos a avaliação da diversidade genética de rizóbios noduladores de acácia-negra de ocorrência natural em solos do Rio Grande do Sul e a seleção de isolados eficientes na fixação biológica de N₂ em condições de pH baixo.

MATERIAL E MÉTODOS

Para obtenção dos isolados de rizóbios noduladores de acácia-negra, foram coletados nódulos de plantas desta espécie nos municípios de Cristal, São Lourenço, Portão, Triunfo e Viamão, no Estado do Rio Grande do Sul. O isolamento dos rizóbios foi realizado de acordo com o procedimento descrito por Somasegaram & Hoben (1985). Os isolados obtidos foram observados quanto a suas características de crescimento em meio

extrato de levedura, manitol e ágar (LMA) corado com vermelho congo e em LMA com azul de bromotimol.

Para caracterização molecular, todos os isolados e as estirpes recomendadas BR 3067 e BR 3068 foram mantidos por 48 h em meio extrato de levedura e manitol (LM). Posteriormente, efetuou-se a extração e purificação do DNA das culturas bacterianas, de acordo com o método proposto por Moreira (1998). Em seguida, foi realizada a amplificação dos fragmentos de DNA, utilizando-se o oligonucleotídeo iniciador BOX A1-R (Versalovic et al., 1994). A reação de amplificação utilizada continha: 2 µL de DNA molde; 2,5 µL de tampão de PCR 10x; 0,25 µL de uma solução com 0,25 mmol L⁻¹ de cada DNTP; 0,75 µL de MgCl₂ 50 mmol L⁻¹; 1,25 µL do oligonucleotídeo BOX A1-R 20 mmol L⁻¹; 1 unidade de polimerase; e água ultrapura estéril para o volume final de 25 µL. A amplificação foi realizada com um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por sete min, seguido por 34 ciclos de amplificação, sendo cada ciclo composto por uma fase com duração de um min a 94 °C, uma fase de um min a 53 °C e uma fase de oito min a 65 °C. Para extensão final de produtos incompletos, procedeu-se a um ciclo extra a 65 °C, por 15 min.

Os produtos da amplificação foram carregados em gel de agarose 1,5 % e submetidos à eletroforese em voltagem constante (50 V) por 90 min. Após ser corado em brometo de etídeo, o gel foi fotografado e analisado quanto à presença de fragmentos de DNA. O padrão de bandas dos isolados foi convertido em uma matriz binária e os resultados, analisados por meio do programa Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System - NTSYS-pc v.1.7. A matriz de similaridade foi estimada por coincidência simples e, na construção do dendrograma, foram empregados o método da média aritmética não ponderada (UPGMA) e o agrupamento seqüencial, aglomerativo, hierárquico e exclusivo (SAHN).

Na formação de grupos e de subgrupos, foram considerados os pontos de corte de 70 e 80 % de similaridade, respectivamente. O agrupamento (70 % de similaridade) foi utilizado para cálculo do índice de diversidade de Shannon (Dilly et al., 2004).

A partir do agrupamento, 10 isolados (V-10, P4-3, P3-3, C-3, V-2, T4-3, V-7, T6-12, T6-16 e T6-13) foram testados quanto à tolerância a pH baixo e à toxidez por Al. Para isso, os isolados foram mantidos por 72 h a 28 °C, sob agitação constante a 100 rpm, em meio líquido (Wood & Cooper, 1985) com pH 4,5 ou 5,5, acrescido ou não de 50 µmol L⁻¹ de Al. A avaliação da tolerância ao pH baixo e à presença de Al foi feita visualmente, pela observação de turbidez ou não do meio e pela leitura, em espectrofotômetro, da absorbância a 540 nm.

Para avaliar a eficiência simbiótica dos isolados, foi instalado um experimento, em casa de vegetação, com os oito isolados de maior tolerância ao pH baixo, além das estirpes recomendadas BR 3067 e BR 3068.

O experimento foi realizado em vasos Leonard, que continham, na parte superior, uma mistura de vermiculita e areia na proporção de 1:1, onde foram mantidas duas mudas de acácia-negra por vaso, e solução nutritiva (Sarruge, 1975) com pH 4,5 na parte inferior. Os tratamentos consistiram da inoculação de cada isolado ou de uma estirpe recomendada em mudas de acácia-negra com 10 dias após a emergência, com quatro repetições, em um delineamento inteiramente casualizado. Foram incluídos ainda dois tratamentos controle, sendo um fertilizado com N e outro não. No início do experimento, todos os tratamentos receberam uma dose de 9 mg/vaso de N, na forma de nitrato de amônio. Um tratamento controle recebeu ainda duas doses adicionais de N, de 36 mg cada, aos 21 dias e aos 90 dias após a emergência das mudas. O experimento foi conduzido por um período de 140 dias, ao final do qual foi realizada a coleta da parte aérea e do sistema radicular das plantas. Foram avaliados a matéria seca de nódulos, a altura das plantas, o diâmetro ao nível do colo, a matéria seca da parte aérea e a quantidade de N acumulado na parte aérea, por meio do procedimento descrito por Tedesco et al. (1995).

Os dados obtidos nos testes de tolerância a pH e Al e de eficiência simbiótica foram submetidos à análise de variância. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan a 5 %.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 50 isolados bacterianos, com características coloniais típicas de rizóbios, foi obtido em meio LMA com vermelho congo (colônias com formato regular e sem absorção de corante). Todos os isolados apresentaram crescimento lento e produção de álcali em meio LMA com azul de bromotimol, características que distinguem o gênero *Bradyrhizobium*. Esse resultado reforça a ideia de que *Bradyrhizobium* sp. é o gênero predominante em *A. mearnsii*. Lafay & Burdon (2001) também verificaram que *A. mearnsii* associava-se preferencialmente com espécies do gênero *Bradyrhizobium*. Embora tenha sido constatado nodulação de *A. mearnsii* também por *Rhizobium tropici*, esta espécie correspondeu a pouco mais de 3 % dos isolados obtidos por aqueles autores, sendo todos os demais isolados pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium*. A predominância deste gênero se estende a outras espécies do gênero *Acacia* (Lafay & Burdon, 2001).

Contudo, a presença de um único gênero entre os isolados de rizóbios noduladores de acácia-negra não significa, obrigatoriamente, baixa diversidade genética. A análise dos padrões de bandas, formadas a partir da amplificação com BOX A1-R (Figura 1), revelou a inexistência de bandas comuns a todos os 50 isolados de *Bradyrhizobium* noduladores de acácia-negra. As bandas de ocorrência mais freqüente

possuíam 2.800 pb (presente em 29 isolados) e 1.900 pb (presente em 21 isolados).

No dendrograma (Figura 2), observou-se a formação de 10 grupos, a partir do ponto de corte de 70 % de similaridade. Três isolados apresentaram grau de similaridade menor do que 70 % em relação aos demais, formando grupos à parte. Por sua vez, 20 isolados apresentaram grau de similaridade acima de 70 % entre si, reunindo-se no grupo A. Este grupo ainda pode ser dividido em cinco subgrupos, formados por quatro (A1), três (A2), um (A3), dez (A4) e dois (A5) isolados. O grupo B foi formado por cinco isolados, divididos em três subgrupos. As estirpes recomendadas BR 3067 e BR 3068 agruparam-se no subgrupo B2. Não foram encontrados isolados com 100 % de similaridade com qualquer das estirpes recomendadas; o grau máximo de similaridade entre as estirpes recomendadas e um isolado foi de 73 % (isolados P4-3 e P4-4). Esses resultados podem ser indicativos de que o uso de inoculantes não é uma prática comum na cultura da acácia-negra, de que as estirpes recomendadas são menos competitivas do que os rizóbios de ocorrência natural ou que estes possuem baixa sobrevivência no solo. Já o grupo C foi composto por nove isolados, enquanto os grupos D, E, F e H reuniram cinco, quatro, dois e quatro isolados, respectivamente. O grau de similaridade entre os isolados mais distantes foi de 54 %.

A formação dos grupos não esteve ligada diretamente aos locais de origem dos isolados. O grupo C, por exemplo, foi composto por isolados de quatro localidades: Triunfo (T6-7, T6-9, T6-11a e T6-4), Portão (P2-1, P3-3 e P2-3), Viamão (V-11) e São Lourenço (SL-2). Já os isolados de Cristal (C-2 e C-3) apresentaram maior similaridade com isolados de

Portão ou de Triunfo do que com o isolado SL-2, proveniente da localidade geograficamente mais próxima, São Lourenço.

O índice de diversidade de Shannon, calculado a partir do número de grupos e do número de indivíduos por grupo, foi de 4,30. Esse valor foi mais elevado do que os encontrados por Andrade et al. (2002), Borges et al. (2003) e Dilly et al. (2004), que avaliaram a diversidade de isolados de rizóbios noduladores de feijão, de *Escherichia coli* em águas ambientais e de populações bacterianas em solos, respectivamente. A inexistência de isolados com padrões de bandas idênticos aos das estirpes recomendadas e o alto índice de Shannon indicam elevada diversidade entre os isolados de *Bradyrhizobium* sp. noduladores de acácia-negra em solos do Rio Grande do Sul, demonstrando ser essa uma fonte potencial de novas estirpes mais eficientes do que as atualmente recomendadas.

Com relação à tolerância dos isolados a pH baixo e à presença de Al, a observação visual da turbidez do meio, indicativa de crescimento bacteriano em meio líquido, sugeria que os isolados não haviam sido afetados pela presença de 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de Al no meio, ao contrário do verificado por Wood & Cooper (1985), que trabalharam com rizóbios noduladores de *Lotus*. Essa observação foi confirmada pela análise da densidade ótica das culturas, revelando, ainda, que a redução do pH de 5,5 para 4,5 causou redução no crescimento de todos os isolados (Quadro 1). A redução do pH de 5,5 para 4,5 levou à redução do crescimento de todos os isolados. No entanto, o comportamento de alguns isolados foi distinto em cada pH. O isolado T6-16, por exemplo, apresentou crescimento reduzido em pH 5,5. Já em pH 4,5, este isolado foi o que apresentou o maior crescimento, avaliado por meio

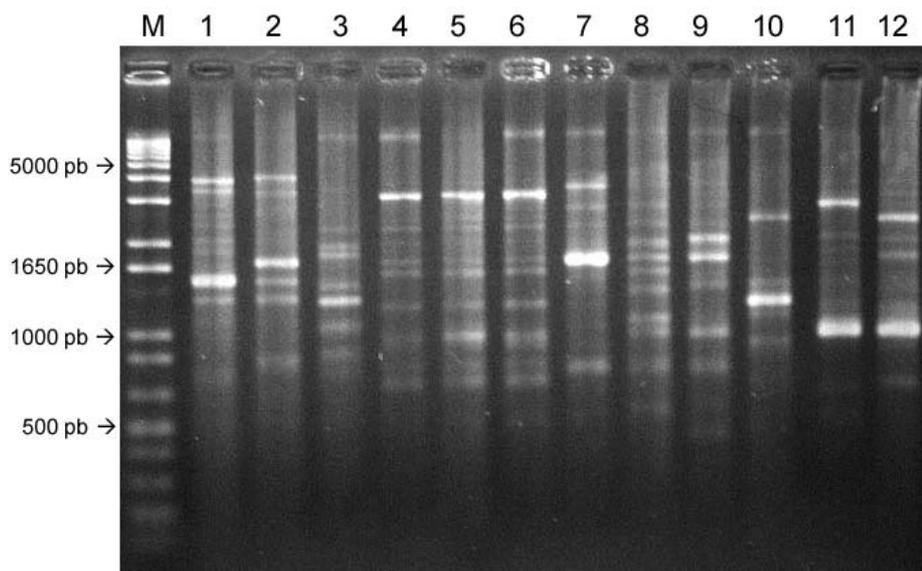


Figura 1. Padrão de bandas de PCR-BOX de isolados de *Bradyrhizobium* sp. noduladores de acácia-negra. (M = marcador de peso molecular Kb Plus; 1 = BR 3067; 2 = BR 3068; 3 = C2; 4 = V-1a; 5 = V-1b; 6 = V-2; 7 = V-3; 8 = V-7; 9 = V-10; 10 = V-11; 11 = T6-6; 12 = T6-10).

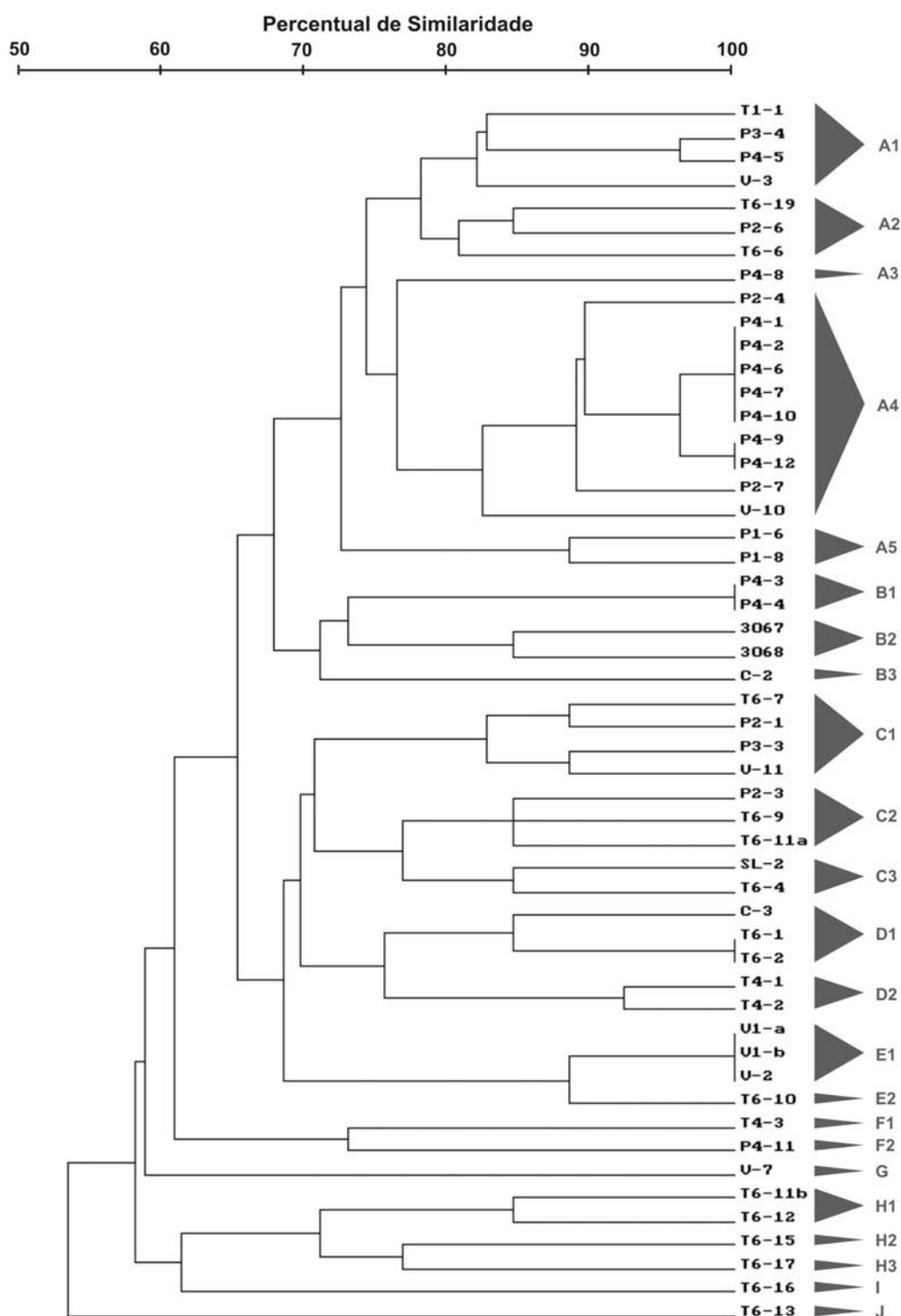


Figura 2. Dendrograma para BOX-PCR de isolados de *Bradyrhizobium* sp. noduladores de acácia-negra, estimado pelo coeficiente de coincidência simples e pela média aritmética não ponderada.

da densidade ótica, embora menor do que o crescimento em pH 5,5. Os isolados C-3 e T6-13 também apresentaram comportamento semelhante, demonstrando tolerância ao pH baixo. Por sua vez, o isolado P4-3 foi o que apresentou menor crescimento

em pH 4,5, sendo o menos tolerante à diminuição do pH. Em razão dessa sensibilidade ao pH baixo, este isolado, juntamente com T6-12, foi descartado do teste de eficiência simbiótica. A tolerância de rizóbios ao pH baixo está associada à capacidade de o isolado

manter seu pH interno estável e próximo à neutralidade, independentemente do pH externo. Em estudos com *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* (Chen et al., 1993) e com *Sinorhizobium meliloti* (O'hara et al., 1989; Dilworth et al., 1999), constatou-se que as estirpes tolerantes à acidez mantêm seu pH interno neutro ou levemente alcalino mesmo quando cultivadas em pH 4,5. Já as estirpes sensíveis reduzem seu pH interno quando cultivadas em meio ácido.

No experimento em casa de vegetação, foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos em todas as variáveis analisadas (Quadro 2). Não foi observada nodulação nos tratamentos controle sem inoculação, e o tratamento controle que recebeu adubação nitrogenada foi estatisticamente superior a todos os demais com relação ao diâmetro e à altura das mudas, bem como à matéria seca da parte aérea. Já o tratamento controle

Quadro 1. Densidade ótica (DO), avaliada pela absorvância a 540 nm, de culturas de *Bradyrhizobium* sp. em pH 4,5 e 5,5

| Isolado | pH | |
|---------|------------|----------|
| | 4,5 | 5,5 |
| | DO | |
| V-10 | 0,10 bcdB | 0,64 cdA |
| P4-3 | 0,04 dB | 0,46 dA |
| P3-3 | 0,26 abcB | 1,36 aA |
| C-3 | 0,31 abB | 0,81 cA |
| V-2 | 0,15 bcdB | 0,57 dA |
| T4-3 | 0,20 abcdB | 0,64 cdA |
| V-7 | 0,24 abcdB | 1,03 bA |
| T6-12 | 0,07 cdB | 0,59 dA |
| T6-16 | 0,37 aB | 0,64 cdA |
| T6-13 | 0,30 abB | 0,83 cA |

Médias seguidas por letras distintas, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Duncan a 5 %.

Quadro 2. Diâmetro da muda ao nível do colo, altura da muda, massa de nódulos, matéria seca da parte aérea e quantidade de nitrogênio acumulado em mudas de acácia-negra inoculadas com diferentes isolados de *Bradyrhizobium* sp., após 140 dias de cultivo

| Tratamento ⁽¹⁾ | Diâmetro do caule | Altura da planta | Massa de nódulos | Matéria da parte aérea | N na parte aérea |
|---------------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------------|------------------|
| | mm | cm | mg/2 plantas | g/2 plantas | mg/2 plantas |
| BR 3067 | 1,36 cd | 13,04 bcd | 148,3 bcd | 0,89 cde | 45,7 abc |
| BR 3068 | 1,87 abcd | 18,99 bc | 266,0 a | 2,23 ab | 68,7 ab |
| V-10 | 1,80 abcd | 17,99 bc | 96,3 cde | 0,93 cde | 22,9 cde |
| P3-3 | 1,44 bcd | 11,60 cd | 150,3 bcd | 1,03 bcde | 31,4 bcde |
| C-3 | 1,70 bcd | 16,81 bc | 266,0 a | 1,69 abcd | 49,9 abc |
| V-2 | 1,57 bcd | 12,24 cd | 26,0 e | 0,23 e | 4,0 de |
| T4-3 | 1,70 bcd | 16,85 bc | 58,7 de | 0,55 de | 17,2 cde |
| V-7 | 2,07 ab | 22,46 ab | 202,7 ab | 2,35 a | 55,3 abc |
| T6-16 | 1,96 abc | 21,61 bc | 225,7 ab | 2,81 a | 77,8 a |
| T6-13 | 1,85 abcd | 18,83 bc | 188,3 abc | 1,95 abc | 65,5 ab |
| N+ | 2,38 a | 30,81 a | - | 2,88 a | 41,2 abcd |
| N- | 1,28 d | 6,92 d | - | 0,16 e | 2,3 e |

⁽¹⁾ Isolados e tratamentos com a adição ou exclusão de N. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si pelo teste de Duncan a 5 %.

sem adubação nitrogenada foi significativamente inferior aos demais em todas as variáveis analisadas. Os tratamentos com plantas inoculadas com rizóbios também diferiram entre si, mesmo entre as estirpes recomendadas. A estirpe BR-3068 mostrou-se eficiente, apresentando nodulação abundante e resultando em mudas vigorosas, ao contrário da outra estirpe recomendada, BR-3067.

Da mesma forma, entre os isolados ocorreram variações na eficiência simbiótica, as quais podem estar associadas à tolerância ao pH baixo. O crescimento dos isolados em pH 4,5 esteve correlacionado positivamente com a matéria seca de nódulos ($r = 0,81$; $p = 0,0145$), com a produção de matéria seca ($r = 0,77$; $p = 0,0243$) e com a quantidade de N acumulado na parte aérea das mudas ($r = 0,85$; $p = 0,0076$). Assim, o isolado V-2 esteve entre os mais sensíveis ao pH baixo e foi o menos eficiente, com resultados muito próximos aos do controle sem adubação nitrogenada. Ao contrário do observado por Del Papa et al. (1999), que constataram que todos os isolados de *Sinorhizobium meliloti* tolerantes à acidez eram ineficientes, no presente trabalho o isolado mais tolerante à acidez, T6-16, revelou-se também altamente eficiente. Este isolado apresentou quantidade de N acumulado na parte aérea superior à de todos os demais tratamentos, além de uma produção de matéria seca semelhante à do controle com adubação nitrogenada. Além do isolado T6-16, o isolado V-7 também apresentou resultados semelhantes aos da estirpe recomendada BR-3068, indicando que esses isolados têm potencial para ser recomendados na produção de inoculantes.

CONCLUSÕES

1. Há diversidade elevada de isolados de *Bradyrhizobium* sp. noduladores de acácia-negra em solos do Rio Grande do Sul.

2. Os isolados avaliados não são afetados pela presença de Al em meio de cultura, mas têm seu crescimento prejudicado pela redução do pH de 5,5 para 4,5. No entanto, os isolados T6-16, C-3 e T6-13 são mais tolerantes ao pH mais baixo.

3. Os isolados T6-16 e V-7 são eficientes, assemelhando-se à estirpe recomendada BR-3068.

LITERATURA CITADA

- ANDRADE, D.S.; MURPHY, P.J. & GILLER, K.E. The diversity of phaseolus-nodulating rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:4025-4034, 2002.
- BORGES, L.G.D.A.; VECHIA, V.D. & CORÇÃO, G. Characterisation and genetic diversity via REP-PCR of *Escherichia coli* isolates from polluted waters in southern Brazil. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 45:173-180, 2003.
- CALDEIRA, M.V.W.; SCHUMACHER, M.V.; RONDON NETO, R.M.; WATZLAWICK, L.F. & SANTOS, E.M. Quantificação de biomassa acima do solo de *Acacia mearnsii* De Wild., procedência Batemans Bay – Austrália. *Ci. Flor.*, 11:79-91, 2001.
- CAMPOS, M.L.; ALMEIDA, J.A. & SOUZA, L.S. Avaliação de três áreas de solo construído após mineração de carvão a céu aberto em Lauro Müller, Santa Catarina. *R. Bras. Ci. Solo*, 27:1123-1137, 2003.
- CHEN, H.; RICHARDSON, A.E. & ROLFE, B.G. Studies of the physiological and genetic basis of acid tolerance in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59:1798-1804, 1993.
- DEL PAPA, M.F.; BALAGUE, L.J.; SOWINSKI, S.C.; WEGENER, C.; SEGUNDO, E.; ABARCA, F.M.; TORO, N.; NIEHAUS, K.; PUHLER, A.; AGUILAR, O.M.; MARTINEZ-DRETS, G. & LAGARES, A. Isolation and characterization of alfalfa-nodulating rhizobia present in acidic soils of central Argentina and Uruguay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:1420-1427, 1999.
- DILLY, O.; BLOEM, J.; VOS, A. & MUNCH, J.C. Bacterial diversity in agricultural soils during litter decomposition. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70:468-474, 2004.
- DILWORTH, M.; RYNNE, F.; CASTELLI, J.; VIVAS-MARFISI, A. & GLENN, A. Survival and exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti* WSM419 are affected by calcium and low pH. *Microbiology*, 145:1585-1593, 1999.
- LAFAY, B. & BURDON, J.J. Small-subunit rRNA genotyping of rhizobia nodulating Australian *Acacia* spp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67:396-402, 2001.
- LEITÃO, M.R.S.M.M. Fixação biológica do nitrogênio por espécies arbóreas. In: VARGAS, M.A.T. & HUNGRIA, M., eds. *Biologia dos solos dos cerrados*. Planaltina, Embrapa, 1997. p.153-186.
- MOREIRA, D. Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. *Nucleic Acids Res.*, 26:3309-3310, 1998.
- NGOM, A.; NAKAGAWA, Y.; SAWADA, H.; TSUKAHARA, J.; WAKABAYASHI, S.; UCHIUMI, T.; NUNTAGIJ, A.; KOTEPONG, S.; SUZUKI, A.; HIGASHI, S. & ABE, M. A novel symbiotic nitrogen-fixing member of the *Ochrobactrum* clade isolated from root nodules of *Acacia mangium*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 50:17-27, 2004.
- O'HARA, G.W.; GOSS, T.J.; DILWORTH, M.J. & GLENN, A.R. Maintenance of intracellular pH and acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55:1870-1876, 1989.
- SANTOS, A.F. & FERREIRA, F.A. Uma ferrugem da acácia-negra no Brasil. *Fitopatol. Bras.*, 27:99-100, 2002.
- SARRUGE, J.R. Soluções nutritivas para crescimento de plantas. *Summa Phytopathol.*, 1:231-234, 1975.
- SCHUMACHER, M.V.; BRUN, E.J.; RODRIGUES, L.M. & SANTOS, E.M.D. Retorno de nutrientes via deposição de serapilheira em um povoamento de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.) no Estado do Rio Grande do Sul. *R. Árvore*, 27:791-798, 2003.

- SOMASEGARAM, P. & HOBEN, M.J. Handbook for Rhizobia: Methods in legume-Rhizobium technology. New York, Springer-Verlag, 1994; Hawai, NIFTAL, 1985. 450p.
- TEDESCO, J.M.; GIANELO, C.; BISSANI, C.A.; BOHNEN, H. & VOLKWEISS, S.J. Análises de solo, plantas e outros materiais. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995. 174 p. (Boletim Técnico, 5)
- UDAIYAN, K.; SUGAVANAM, V. & MANIAN, S. Growth response of wattle (*Acacia mearnsii*) seedlings to phosphorus fertilisation and inoculations with *Glomus deserticola* and *Rhizobium* sp. in non-sterile soil. J. Trop. For. Sci., 10:212-224, 1997.
- VERSALOVIC, J.; SCHNEIDER, M.; DE BRUIJN, F.J. & LUPSKI, J.R. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Methods Molec. Cel. Biol., 5:25-40, 1994.
- VEZZANI, F.M.; TEDESCO, M.J. & BARROS, N.F. Alterações dos nutrientes no solo e nas plantas em consórcio de eucalipto e acácia negra. R. Bras. Ci. Solo, 25:225-231, 2001.
- WOOD, M. & COOPER, J.E. Screening clover and *Lotus* rhizobia for tolerance of acidity and aluminium. Soil Biol. Biochem., 17:493-497, 1985.