

Caracterização e Especificidade de *Rhizobium* spp.
de Leguminosas Florestais

TESE
apresentada à
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
para o grau de Magister Scientiae

Examinadores:

Johanna Döbereiner
Manlio Silvestre Fernandes
Adam Drozdowicz

ADALÍS BEZERRA CAMPÊLO
Agosto de 1976

AGRADECIMENTOS

Desejamos expressar os nossos sinceros agradecimentos:
à Dra. Johanna Döbereiner, pela valiosa orientação e inestimável dedicação, sem as quais, não teria sido possível a realização desta Tese;

ao Conselho Nacional de Pesquisas, pela subvenção inicial;

ao Ministério da Agricultura, através da Diretoria do IPEACS e, posteriormente, EMBRAPA-RJ, pela oportunidade que nos ofereceu de realizar o Curso de Pós-Graduação;

aos Professores Manlio Silvestre Fernandes, do Instituto de Agronomia, Dirce P. P. de Souza Britto, do Instituto de Ciências Exatas da U.F.R.R.J., e Dra. Laura Vasconcellos do Instituto de Microbiologia da U.F.R.J. pela colaboração.

ao meu esposo, Prof. Cornélio Ramalho Campêlo, pelo incentivo e pela determinação das espécies botânicas, e finalmente,

a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração do nosso trabalho.

BIOGRAFIA DA AUTORA

Natural do Estado de Pernambuco, Engenheira Agrônoma diplomada pela Escola Superior de Agricultura da Universidade Rural de Pernambuco no ano de 1959.

Durante os anos de 1960 e 1966 trabalhou no Setor de Microbiologia da Seção de Solos do IPEANE (Recife), onde fez pesquisas sobre Microbiologia de Solos da Região Nordeste e foi responsável pelo referido Setor, tendo oportunidade de fazer alguns cursos de aperfeiçoamento, patrocinados pelos CAEE na Universidade Rural de Pernambuco.

Em 1965 foi contemplada com uma bolsa de Pesquisador-Assistente do C.N.P.q, a qual foi prorrogada por várias vezes até 1974.

Em 1967 foi transferida para o IPEACS, atual EMBRAPA-RJ., onde trabalhou até maio de 1975, em fixação de Nitrogênio, tendo publicado alguns trabalhos sobre o assunto.

Aos meus pais,

Prof. Lauro Ramos Bezerra

e

Maria Soares Bezerra

ÍNDICE

	Página
1- INTRODUÇÃO	1
2- REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1. Importância da Simbiose	5
2.2. Origem da Simbiose	6
2.3. Ocorrência de Nódulos	9
2.4. Forma dos Nódulos	12
2.5. Coloração das Raízes e Falta de Nodulação	13
2.6. Razões para a Falta de Simbiose	13
2.6.1. Incapacidade de Nodular	14
2.6.2. Razões que Provocam a Falta de Nódulos.....	14
2.7. Inoculação Cruzada	15
2.7.1. Mecanismo da Infecção	22
2.8. Características Culturais e Morfológicas do <i>Rhizobium</i>	23
2.9. Atividade Específica da N ₂ -ase.....	27
2.10. Taxonomia	27
3- MATERIAL E MÉTODOS	31

	Página Nº
3.1. Procedência do Material	31
3.2. Local	31
3.3. Experimentos	32
3.3.1. Ocorrência de Nodulação	32
3.3.1.1. Espécies de Leguminosas usadas.....	32-33
3.3.1.2. Estirpes de <i>Rhizobium</i> usadas.....	36
3.3.1.3. Pré-tratamento das Sementes	36
3.3.1.4. Adubação	37
3.3.1.5. Sementeiras	37
3.3.1.6. Inoculantes	37
3.3.1.7. Colheita e Observações	38
3.3.2. Inoculação Cruzada	40
3.3.2.1. Sementeiras e latas	40
3.3.2.2. Transplante e Inoculação	40
3.3.2.3. Espécies leguminosas e Estirpes de <i>Rhizobium</i> usadas.....	41
3.3.2.4. Colheita e Análise	41
3.3.3. Ensaio de Laboratório	43
3.3.3.1. Fontes de C para o Crescimento do <i>Rhizobium</i>	43
3.3.3.2. Aspecto e Tempo de Aparecimento das Colônias	45
3.3.3.3. Comportamento das Estirpes em Leite-Litmus	45
3.3.3.4. Característica flagelar	46

	Página
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1. Ocorrência de Nodulação	49
4.2. Inoculação Cruzada	52
4.3. Análise Estatística do Experimento 3.3.2	55
4.4. Experimentos de Laboratório	62
4.4.1. Fontes de C para o crescimento do <i>Rhizo-</i> <i>bium</i>	62
4.4.2. Característica Flagelar	67
5- CONCLUSÕES.....	69
5.1. Quadro 1	69
5.2. Quadro 2,3	69
5.3. Quadro 4	72
5.4. Quadro 5	72
6 - RESUMO	73
7 - ABSTRACT	79
8 - BIBLIOGRAFIA	83

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro N°	Página N°
1 - Ocorrência de Nodulação em 43 Espécies Florestais com 3 Tratamentos de Inoculação	98
1a- Comparação da Nodulação entre Leguminosas Florestais e outras Espécies Leguminosas Pesquisadas por Allen & Allen	99
1b- Ocorrência de Nodulação em 17 Espécies Florestais Examinadas no Campo	100
1c- Ocorrência da Nodulação em Leguminosas Florestais	101
2 - Avaliação da Atividade Específica da N ₂ -ase em Nódulos de 11 Espécies Florestais e uma Forrageira, em Inoculação Cruzada com 19 Estirpes de <i>Rhizobium</i>	102
2a- Valores de F Obtidos das Análises Estatísticas Realizadas em 10 Leguminosas Florestais e uma Espécie Forrageira	107
3 - Inoculação Cruzada entre 19 Estirpes de <i>Rhizobium</i> e 11 Espécies Florestais e uma Forrageira	108
4 - Características Culturais e Morfológicas de 54 Estirpes de <i>Rhizobium</i> com o uso de 8 fontes de C e	

Quadro. N°		Página
	Reação em Leite-Litmus	109
5 -	Característica Flagelares de 9 Estirpes de <i>Rhizo-</i> <i>bium</i> de Florestais e uma Forrageira	111

ÍNDICE DAS FIGURAS

Figura	Página
1 - Casa de Vegetação onde foram desenvolvidos os experimentos 1 e 2	112
2 - Tipos de vasos usados no experimento 1.....	112
3 - Tipos de sementeiras usados nos experimentos 1 e 2.....	113
4 - Tipos de latas usados no experimento 2	113
5 - Forma de nódulos das espécies Mimosoideae	114
6 - Forma de nódulos das espécies Mimosoideae	114
7 - Forma de nódulos das espécies Mimosoideae	115
8 - Forma de nódulos das espécies Mimosoideae	115
9 - Forma de nódulos das espécies Faboideae	116
10 - Distribuição de nódulos nas raízes de Acácia	116
11 - Crescimento das estirpes de <i>Rhizobium</i> Sm-1, M1-2 (I grupo) em meio 79 com várias fontes de C	117
12 - Crescimento da estirpe de <i>Rhizobium</i> BR-23 em meio 79 com várias fontes de C.	117
13 - Crescimento das estirpes de <i>Rhizobium</i> Pd-2, Cc-1, Vr-4 (II grupo) em meio 79 com várias fontes de C.	118

Figura Nº		Página Nº
14	- Crescimento das estirpes de <i>Rhizobium</i> F-310, Al-3 (II grupo), em meio 79 com várias fontes de C	118
15	- Crescimento das estirpes de <i>Rhizobium</i> Pr-3, Ep-2 (III grupo), em meio 79 com várias fontes de C.....	119
16	- Crescimento das estirpes L1-7, F-310 comparado com o da estirpe M1-1, em várias fontes de C.....	119
17	- Crescimento da estirpe Pp-2 comparado com o da estirpe Dm-1, em várias fontes de C.....	120
18	- Crescimento das estirpes Dm-3, L1-7, Sm-1 e reação em Leite-Litmus.....	120
19	- Flagelação monotríquia da estirpe Sm-1 do I grupo	121
20	- Flagelação monotríquia da estirpe Al-2 do II grupo	121
21	- Flagelação lofotríquia da estirpe X-13 do III grupo	122

1 - INTRODUÇÃO

Desde os tempos mais remotos, as leguminosas vem sendo usadas para melhorar a fertilidade dos solos e a maior parte do suprimento de N em sistemas naturais pode ser atribuída à fixação biológica do N_2 . Aumentos de 2,6 kg de N/ha/ano em florestas de *Eucalyptus* e de 31 a 150 kg/ha/ano, em florestas tropicais, são dados apresentados por Coaldrake (1962). No entanto, grandes quantidades de N são retiradas do solo, por ano, pela lixiviação e erosão e um dos objetivos das práticas do plantio de leguminosas noduladas é manter o equilíbrio entre o suprimento e a demanda de N no solo, permitindo sua utilização intensiva, sem risco de degradação ou de retorno ao estado natural (Bonnier & Brakel, 1970). Nas regiões tropicais sob pastagens, as perdas de N são estimadas em 78 a 570 kg/ha/ano (Jacobson et al., 1948).

Devido à simbiose planta-*Rhizobium* que é peculiar à grande maioria das espécies, as leguminosas desempenham um papel importante na economia de nitrogênio nos solos tropicais, castigados pela erosão, ocasionada muitas vezes pelo lamentável processo de devastação das matas de inigualáveis ri-

quezas naturais. Como resultado dessa associação que é um dos melhores exemplos de cooperação mútua na natureza, o nitrogênio molecular do ar é combinado com outros elementos químicos, formando compostos nitrogenados, os quais a planta assimila para o seu crescimento. Assim, o cultivo de leguminosas que não nodulam perde sua finalidade.

À família Leguminosae, com cerca de 13.000 espécies, pertence a maioria das árvores gigantes (*Parkia gigantocarpa* Benth., *Parkia pendula* Benth., *Dinizia excelsa* Ducke), árvores de notável beleza, como *Delonix regia* Raf., *Parkia purpurea* (Ducke, 1939) e um grande número de espécies que tem largo emprego na agricultura, com várias utilidades, inclusive como florestais. As essências florestais pertencentes à essa família são inúmeras e podem substituir satisfatoriamente o *Eucaliptus*, pois muitas delas são de crescimento rápido. Por outro lado, reflorestar com leguminosas, não significa que se deva abandonar as florestas naturais, pois o impulso no reflorestamento terá que crescer na mesma proporção em que cresce a necessidade mundial.

O uso de espécies leguminosas florestais inoculadas, ainda é muito negligenciado. Não há interesse da parte dos serviços de reflorestamento que dão muita ênfase ao cultivo do *Eucaliptus* e de outras espécies não leguminosas. No entanto, o papel das leguminosas noduladas para trabalhos de reflorestamento, na recuperação de solos erodidos, poderá vir a ser maior do que se possa imaginar. Os resultados positivos, obtidos com o uso da inoculação com estirpes de *Rhizobium* se-

leccionadas e de técnicas apropriadas às condições ecológicas, trarão uma influência favorável à evolução desses trabalhos nos trópicos, resolvendo em parte um grave problema que é a manutenção da fertilidade dos solos. O assunto tem despertado interesse apenas recentemente, e no que se refere à economia de N nos solos tropicais, utilizando espécies florestais noduladas, nada se sabe. As pesquisas sobre nodulação, normalmente incluem leguminosas cultivadas e raramente silvestres, de interesse agrícola.

Numa visão geral do revestimento florístico brasileiro, avalia-se que cerca de 40% do território é coberto por florestas equatoriais que representam o maior maciço florestal do mundo e na região amazônica, a família melhor representada em número de espécies e indivíduos é a Leguminosae (Ducke & Black, 1953). Presentemente, o panorama florestal brasileiro, relacionado com o gradual exaurimento das matas, começa a apresentar alterações que justificam, de certo modo, impressões menos sombrias, acerca de uma problemática verdadeiramente alarmante que evoluiu no país há alguns anos atrás.

As florestas tropicais tem a principal função de manter o equilíbrio climático sobre grandes áreas além de serem também a principal fonte de tanino, corantes, saponinas, etc.

O planalto brasileiro assiste a um surto de renovação florestal. Pequenos plantios de algumas espécies como *Centrolobium tomentosum* Benth. (Araribá) e de *Dalbergia ni-*

gra Fr. All. (Jacarandá preto da Bahia), estão sendo realizados em caráter experimental. Algumas espécies de *Acacia* são de grande importância para a recuperação de solos erodidos, fixando quantidades significantes de nitrogênio. *Acacia mollissima* Humb. é uma das essências mais promissoras para reflorestamento, e atualmente, no sul do país, grandes áreas estão sendo plantadas com essa espécie, em substituição ao plantio de *Pinus*, com a finalidade principal de produção rápida de cortiça tanante.

Esta Tese diz respeito a um estudo sobre bactérias dos nódulos de leguminosas florestais, nativas ou exóticas, com as seguintes finalidades: a) investigar as formas do nódulo e da simbiose; b) estudar a flora tropical, cujas características de nodulação são pouco conhecidas; c) observar as características culturais e morfológicas da bactéria; d) estabelecer a posição das leguminosas florestais, dentro dos principais grupos de inoculação cruzada, de acordo com a especificidade hospedeira, mostrando as afinidades entre as subfamílias.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Importância da simbiose

A fixação do N_2 por leguminosas noduladas é a interação de um número de processos biológicos (Gibson, 1974) que podem ser considerados sob vários aspectos: fisiológico, por sua interação com o metabolismo da planta; químico, pelas reações que ocorrem nos nódulos; anatômico, pelas estruturas peculiares que os nódulos apresentam; bacteriológico, pelo comportamento do microorganismo e edafológico, por tratar-se de um fenômeno próprio do solo (Rothschild, 1963).

Para se ter uma idéia melhor da importância da simbiose, calcula-se que a fixação biológica contribui com cerca de 10^8 a 10^9 t/ ano do nitrogênio fixado na superfície terrestre (Postgate, 1974), mas pouca atenção tem sido dada ao papel que desempenham as leguminosas florestais nessa relação.

A região do Cerrado oferece condições muito amplas para a experimentação de folhosas de crescimento mais rápido. As árvores leguminosas mais encontradas nessa região pertencem aos gêneros *Bowdichia*, *Machaerium*, *Dalbergia*, *Stryphnodendron*, *Dimorphandra* e *Enterolobium*, as quais são de grande

importância para o balanço do N nesses solos (Murad et al., 1968; Oliveira, 1969). Essências como *Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit. e *Cassia grandis* L. f. foram utilizadas em experimentos de ecologia florestal para reflorestamento de savanas equatoriais, sendo a última espécie considerada como prioritária (Ledoux & Lobato, 1968). *Dimorphandra mollis* Benth. é outra espécie florestal que apresenta propriedades farmacológicas, além de ser comum nos Cerrados e de ser capaz de nodular quando inoculada com *Rhizobium* específico (Döbereiner & Campêlo, 1975). *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. pode produzir 20 kg de frutos/árvore, os quais são usados como forragem (Foury, 1950). Dados de fixação de N_2 de até 515/kg/ha/ano foram conseguidos com *Leucaena leucocephala* (Henzell & Norris, 1962). Esses dados, abrem perspectivas encorajadoras para maior competição dessa fonte de N com a dos fertilizantes nitrogenados. O potencial existente em muitas leguminosas tropicais, como leucena, é enorme, apesar do seu emprego achar-se limitado à seleção de ecotipos (Rocha et al., 1970).

2.2 - Origem da simbiose

A relação entre grupos de leguminosas e seus *Rhizobium* pode ser interpretada como uma associação evolucionária, desde os hospedeiros mais primitivos (Caesalpinioideae e Mimosoideae), passando pelas tribos mais primitivas das Faboideae, até as espécies mais especializadas, noduladas por bactérias de crescimento rápido e produtoras de ácido (Norris, 1956; Nutman, 1965). As leguminosas, segundo Vincent (1974),

parecem ser basicamente uma família tropical. Em 1958, Norris admitiu o conceito sugerido por Gundersen (1950) de que as leguminosas primitivas eram árvores e arbustos que surgiram nas regiões tropicais e subtropicais do Período Cretáceo Superior e daí se dispersaram para as regiões temperadas. Os climas naquele Período eram distribuídos na terra, da mesma maneira que essas formas primitivas, mas com a revolução do Paleoceno os climas tropicais tornaram-se restritos e a vegetação tropical também se retraiu. A evolução teria se dado então, através de uma adaptação às condições temperadas, sendo a forma original que ainda hoje é conservada por um grande número de espécies tropicais, uma grande árvore de folhas macias e sempre verdes, típica de um ambiente sempre úmido. A sequência da evolução seria então, grandes árvores lenhosas → arbustos e cipós **lenhosos** → **ervas** perenes → **ervas** anuais (Norris, 1958). Dessa maneira, as ervas anuais leguminosas das regiões temperadas seriam espécies altamente evoluídas. As subfamílias Mimosoideae e Caesalpinioideae tem se adaptado pouco às mudanças e são quase completamente restritas aos trópicos e subtropicais, enquanto as Faboideae suportaram bem as modificações, desenvolvendo um grande número de gêneros e espécies que invadiram as zonas temperadas, embora a maioria das tribos da Faboideae ainda mostre suas afinidades com os trópicos. A tribo Dalbergieae é ainda totalmente tropical, enquanto as tribos Triplarieae, Vicieae e Loteae são inteiramente de clima temperado, sendo ainda mais tolerantes às condições de solos pobres (Norris, 1967). Outros autores (Parker, 1968; Senn, 1938; Axel-

rod, 1958) no entanto, apresentam argumentos que as leguminosas poderiam ter tido sua origem em regiões subúmidas tropicais, subtropicais ou mesmo temperadas. Senn (1938) comentou que considerar as Mimosoideae como primitivas, por serem os seus gêneros predominantemente lenhosos, é uma questão aberta à sérias discussões. As leguminosas devem ter sido simbioticamente promíscuas (Norris, 1967), e as bactérias ancestrais, dos nódulos, eram provavelmente livres e capazes de fixar N_2 no solo (Parker, 1968). A demonstração recente de que *Rhizobium* do grupo promiscuo pode fixar N_2 em meio de cultura, vem comprovar essa hipótese (Pagan et al. 1975; Dilworth & McComb, 1975).

A composição botânica dos seis principais grupos de inoculação cruzada com as tribos hospedeiras, arrançadas filogeneticamente, foi apresentada por Nutman (1965), mostrando que a taxonomia da hospedeira e os grupos de inoculação cruzada, tem uma relação muito ampla. Atualmente, um grau mais elevado de promiscuidade de inoculação, predomina entre as espécies tropicais, associadas ao tipo "cowpea" de *Rhizobium* de crescimento lento, o qual seria, segundo Norris (1958), a forma típica e ancestral do organismo, e do qual, todas as outras formas se derivaram. Por outro lado, os resultados obtidos por Graham (1964a) sugerem como organismo ancestral do *Rhizobium* de crescimento rápido, uma forma semelhante à *Agrobacterium radiobacter* ou *Agrobacterium tumefaciens*. A perda progressiva da promiscuidade, ou seja, o desenvolvimento da especificidade da bactéria, tem ocorrido em muitos gêneros. No decorrer da evolução, a família Leguminosae desenvolveu uma especialização fisiológica, tornando-se

seletiva em seus requerimentos (Norris, 1958, 1967).

Parker (1968) criticando a idéia da evolução defendida por Norris (1956), segundo a qual, a bactéria do nódulo evoluiu de um protótipo simbiote, ou seja, que as linhas genéticas das 3 subfamílias tiveram as suas origens no mesmo Período, concluiu que, ou as bactérias de crescimento rápido são idênticas às de crescimento lento, mais primitivas, ou alternativamente surgiram associações simbióticas (leguminosa-bactéria) separadas, em diferentes locais e tempos e assim, dois ou mais gêneros de bactérias seriam envolvidos. O grupo de inoculação *Pisum-Trifolium*, com uma faixa simbiótica muito estreita, é considerado por Norris (1958) como uma condição "degenerativa-avançada" de especialização simbiótica.

2.3 - Ocorrência de nódulos

O fato de uma espécie não apresentar nódulos num dado momento, não deve ser uma conclusão definitiva de que a espécie não nodula. É preciso que se façam várias coletas e em vários locais para confirmar se o solo tem condições favoráveis, ou não, para a nodulação (Beadle, 1964). Observações sobre o "status" de nodulação de espécies da Amazônia foram feitas por Norris (1969) em seedlings de algumas espécies, plantas novas e adultas, coletadas em geral em solos arenosos e muito ácidos (pH 4,5-6,0) ou em solos argilosos. Apenas 33% das Caesalpinioideae apresentaram nódulos, mesmo quando coletadas em locais onde existiam outras espécies bem noduladas, enquanto mais de 70% das Faboideae e Mimosoideae estavam noduladas. A nodulação vari-

ava com o solo, pois algumas espécies coletadas em solos argilosos não apresentavam nódulos, embora em solos arenosos tenham sido encontradas com nódulos. Numa pesquisa mundial, 90% das espécies Mimosoideae observadas por Allen e Allen (1961) apresentaram formas noduladas. Nos gêneros *Albizzia*, *Entada*, *Enterolobium*, *Pithecellobium*, *Leucaena*, *Piptadenia* e *Parkia*, todas as espécies eram noduladas. Entre os gêneros *Inga*, *Calliandra*, *Acacia*, *Mimosa* e *Prosopis*, existiam espécies noduladas e outras não. Das Caesalpinioideae (115 examinadas), apenas 23% eram noduladas, enquanto nas Faboideae (1024 examinadas), a ocorrência de nódulos era de 93%. Em Trinidad, De Souza (1966) observou que dentre as 81 espécies estudadas, 63 eram noduladas, sendo, 40 pertencentes à subfamília Faboideae, 17 à subfamília Mimosoideae e apenas 6 à Caesalpinioideae. Em zonas áridas e semi-áridas da Austrália, 68 espécies pertencentes às subfamílias Mimosoideae e Faboideae apresentavam nódulos, enquanto nenhuma das Caesalpinioideae estava nodulada (Beadle, 1964). Na flora argentina Rothschild (1970) observou a nodulação de espécies pertencentes a 37 gêneros, dos quais 32 apresentavam espécies noduladas. Dos 5 gêneros que não apresentavam nódulos, 4 eram Caesalpinioideae e 1 Mimosoideae (gênero *Desmanthus*). A observação da ocorrência de nódulos entre 538 espécies leguminosas da Rodésia, revelou que 489 nodulavam, sendo que 307 eram espécies herbáceas e 182 eram árvores. Apenas 29% das Caesalpinioideae eram noduladas, enquanto 90% das Mimosoideae e 99% das Faboideae apresentavam nódulos. Das espécies aparentemente não noduladas, 96% eram normalmente lenhosas (Corby, 1974). 14% das leguminosas in-

dígenas da Venezuela não apresentaram nódulos (Barrios & Gonzalez, 1971), o mesmo ocorrendo com as espécies africanas pertencentes à subfamília Caesalpinioideae (Grobbelaar & Clark, 1972).

Na região da Caatinga brasileira, as espécies *Caesalpinia bracteosa* e *Bauhinia forficata* são conhecidas como não noduladas, enquanto espécies de *Mimosa*, *Pithecellobium*, *Piptadenia*, *Parkia* e *Prosopis* apresentam nódulos (Allen & Allen, 1961) e fixam nitrogênio com estirpes de *Rhizobium* específico (Campêlo & Döbereiner, 1969; Campêlo & Campêlo, 1972). Já na região do Cerrado, as principais espécies Faboideae nodulam, com exceção de *Bowdichia* (De Souza, 1966; Allen & Allen, 1947).

Por muito tempo acreditou-se que a formação de nódulos era uma propriedade comum à todas as leguminosas, no entanto, a pesquisa realizada por Allen e Allen (1961), mostrou que 88% das espécies conhecidas (apenas 10 a 12% do total) são noduladas, sendo que a grande maioria pertence à subfamília Faboideae. Os gêneros *Cassia*, *Bauhinia*, *Caesalpinia* (Caesalpinioideae) são tidos como não nodulados (Allen & Baldwin, 1954). O que se sabe atualmente sobre nodulação de florestais tropicais são apenas observações isoladas e o "status" de nodulação pode variar com um certo número de fatores ambientais adversos. Em florestas equatoriais Bonnier (1957, 1960) observou a presença de muito poucas nodosidades. Nas regiões tropicais, a nodulação das leguminosas é um fenômeno cíclico. No Amazonas, espécies de *Acacia* e *Mimosa*, consideradas por Tutin (1958) como noduladas, foram encontradas sem nódulos por Norris (1956, 1969).

2.4 - Formas dos nódulos

A forma do nódulo é determinada inicialmente pela hospedeira (Kidby & Goodchild, 1966) mas pode ser modificada pela eficiência da associação (Vincent, 1974), embora Rothschild (1963), tenha observado que ela é constante em cada hospedeira e dependa do meristema respectivo. De uma maneira geral, nódulos novos são esféricos e brancos, enquanto formas adultas apresentam lóbulos e são de cor preta ou marron escura. (Allen & Allen, 1936; Allen, 1949). Em leguminosas lenhosas os nódulos diferem muito pouco dos encontrados em plantas herbáceas (Allen & Allen, 1936) e a forma tem relação com a tribo a que pertence a espécie botânica, dependendo, de certa forma, da estirpe invasora (Rothschild, 1963). Nódulos formados em *Acacia farnesiana* por *Rhizobium* isolado de *Leucaena* são semelhantes aos da *Leucaena* (ambas Mimosoideae), enquanto que nódulos formados em *Vinnasinsensis*, pela mesma estirpe, são esféricos, semelhantes aos nódulos formados por *Rhizobium* de crescimento lento e nódulos formados em *Mimosa invisa* são típicos dessa espécie (Trinick, 1965a). Em *Glycine*, a forma do nódulo é globosa a oblonga; alongado em *Tephrosia*; coralóide em *Crotalaria* e alongado com lóbulos distribuídos em forma de dedos, em *Acacia*, sendo essas observações feitas em formas adultas (Corby, 1971).

A estrutura anatômica do nódulo de espécies forrageiras tem sido estudada por vários autores (Rothschild, 1963; Lange & Parker, 1960; Bergersen, 1968; Bergersen & Goodchild, 1973) e em leguminosas de grãos foi verificada por Allen e Allen (1940). Em leguminosas lenhosas tropicais, praticamente, nada se tem

feito nesse sentido. Em *Sesbania grandiflora* que nodula bem sob condições naturais, foi feito um estudo morfológico e anatômico, a fim de se observar a estrutura dos nódulos, cuja origem se dá nas células corticais da raiz, sendo portanto, nódulos exógenos que é o tipo mais comum (Harris et al., 1949), ao contrário do amendoim que tem nódulos endógenos (Allen & Allen, 1940).

2.5 - Coloração de raízes e falta de nodulação

As raízes coloridas são mais frequentemente associadas à espécies não nocluladas e porisso, mais encontradas entre as Caesalpinioideae, embora as Mimosoideae e Faboideae também as apresentem (Norris, 1969; Barrios & Gonzalez, 1971). Não foram encontradas raízes coloridas na Tribo Loteae. A cor normal da raiz nodulada é a de tonalidade branca, mas as cores variam do amarelo pálido ao amarelo ouro, do roseo ao vermelho mais escuro, sendo o marrom claro a cor mais comumente encontrada em todas as tribos examinadas. Há, no entanto, raízes coloridas com nódulos e raízes sem coloração que se apresentam noduladas, embora haja uma tendência acentuada para as raízes não noduladas apresentarem-se coloridas (Corby, 1971).

2.6 - Razões para a falta de simbiose

A natureza bioquímica e biológica da simbiose é muito complexa e a capacidade de formar nódulos pode ser uma característica fisiológica, não encontrada sob certas condições (Conklin, 1936).

A falta de nódulos em muitas espécies, pertencentes principalmente à subfamília Caesalpinioideae, tem sido observa-

da por vários outros pesquisadores (Allen & Allen, 1936, 1961; De Souza, 1966; Norris, 1969; Beadle, 1964; Rothschild, 1970; Bañados & Fernandez, 1954) e muitas causas são apontadas como responsáveis pela ausência de nodulação. A questão pode ser considerada sob 2 aspectos, a saber:

2.6.1 - Incapacidade de nodular

Os desvios genéticos na hospedeira ou na bactéria, podem conduzir à perda total ou parcial da capacidade de nodular (Vincent, 1967; Nutman, 1946). Há espécies de trevo vermelho resistentes à inoculação com todas as estirpes de *Rhizobium* testadas e essa resistência é devida a um simples gen recessivo com um componente citoplásmico (Vincent, 1967). As estirpes variam muito em sua capacidade de nodular. Com relação a planta, são apontados como causas principais, responsáveis pela incapacidade de nodular, além dos fatores genéticos (Nutman, 1946), a secreção de substâncias tóxicas pelas raízes (Pochon & Barjac, 1958) e a estrutura do pelo radicular que parece desempenhar um papel importante no funcionamento da simbiose (Allen & Baldwin, 1954). Também Dart (1974) sugeriu que talvez a resistência à infecção esteja associada à presença de taninos ou polifenóis na raiz de determinadas espécies, os quais provocariam a ausência de nódulos. No entanto, parece que a maior limitação biológica, diz respeito aos graus de incompatibilidade entre os dois simbioses (Bonnier & Brakel, 1969, 1970; Nutman, 1952).

2.6.2 - Razões que provocam a falta de nódulos

Segundo Bonnier e Brakel (1969), a falta de nódulos nas florestas tropicais, é atribuída à contínua reciclagem do N. A ausência do *Rhizobium* adequado no solo é apontada como uma das causas responsáveis pela falta de nódulos (Beadle, 1964). Além dos fatores ambientais (pH, temperatura), que afetam a bactéria e as espécies que normalmente nodulam, outros fatores podem interferir na simbiose (Graham & Hubbell, 1974). Vincent (1967) referiu-se ainda a antagonismos entre o *Rhizobium* e outros microorganismos do solo, capazes de inibir a infecção. A perda da capacidade de nodular é relativamente comum e pode ocorrer sem qualquer mudança nas características culturais da estirpe, de acordo com Vincent (1970a).

2.7 - Inoculação cruzada

Os primeiros estudos sobre isolamento de bactérias dos nódulos das leguminosas, ocorreram em 1879 quando Frank deu o nome de *Rhizobium leguminosarum* às bactérias isoladas da ervilha e do feijão. Durante algum tempo, pensou-se que as bactérias dos nódulos pertenciam a uma única espécie. Hellriegel (1886) e Hellriegel e Wilfarth (1888) observaram a ocorrência de nódulos, após a inoculação de algumas leguminosas com extrato de solos não esterilizados, nos quais haviam leguminosas viçosas e bem noduladas. Sem inoculação, as leguminosas plantadas em solos esterilizados mostravam-se amarelas e sem crescimento. Ainda em 1888, Beijerinck conseguiu a formação de nodosidades em *Vicia faba* L., por meio de inoculação artificial, isolando a bactéria e denominando-a de *Bacillus radicicola*. Em 1900,

Hiltner observou que a bactéria de *Trifolium pratense* não nodulava *Medicago sativa* L.. Alguns anos mais tarde, Bergey (1934) admitiu a existência de 6 espécies de *Rhizobium*.

Certas bactérias aparentemente alcançaram um estágio avançado em seu desenvolvimento e tornaram-se específicas para uma determinada espécie, podendo ser benéficas à essa espécie e serem ineficientes em outra. Isto é o que se convencionou chamar de "especificidade hospedeira" (Allen, 1949). Embora a maior parte das leguminosas tropicais formem nódulos quando inoculadas com *Rhizobium* da chamada "miscelânea cowpea", são frequentes as diferenças em eficiência. Este fato será cada vez mais importante à medida que se desenvolvam novas variedades e espécies para uso comercial nos trópicos (Graham & Hubbell, 1974). Assim, pode-se concluir que na associação entre espécies leguminosas e estirpes de *Rhizobium*, existe um marcado grau de especificidade.

Temos um grupo de inoculação cruzada quando um agrupamento intimamente relacionado de espécies leguminosas evoluiu a um estágio de perda da promiscuidade (Norris, 1967). 16 grupos de inoculação cruzada foram citados por Fred et al. (1932), sendo 8 grupos maiores compreendendo: alfafa, trevo, ervilha, feijão, lupinos, soja, cowpea e lotos e seus respectivos *Rhizobium* e 8 grupos de menor importância. Ainda em 1932, Waksman estabeleceu 12 grupos de inoculação cruzada, colocando espécies de *Acacia* e de *Cassia* no grupo "cowpea" e *Phaseolus vulgaris* em um grupo diferente. Em 1934, Carrol estabeleceu 20 grupos de inoculação, incluindo espécies dos gêneros *Aeschynomene*, *Erythrina*,

Acacia e *Mimosa*, no grupo "cowpea" de inoculação cruzada e, como culturas isoladas de *Pithecellobium dulce* Benth. não produzissem nódulos em nenhuma das espécies usadas, ele colocou essa espécie num grupo isolado. Várias espécies, entre elas *Albizia lebbek* L., foram adicionadas ao grupo "cowpea" por Norris (1956) e devido à impossibilidade de se estabelecer limites bem definidos entre as relações *Rhizobium* e um certo grupo de plantas, Wilson (1939) afirmou que sob o ponto de vista científico, esse conceito de grupo de inoculação cruzada não tem validade, embora tenha finalidades práticas. Assim, o estabelecimento desses grupos seria mais um obstáculo do que um auxílio no estudo das relações planta-bactéria. Por outro lado, Allen e Allen (1947) consideraram que a relação bactéria-planta é o único fator disponível para a identificação das bactérias dos nódulos. Os 16 grupos de Fred et al. (1932) foram atualizados por Allen e Baldwin (1954) que os elevaram para 24.

Quanto aos benefícios ou não, de uma inoculação, as leguminosas tropicais lenhosas são divididas em duas classes por Masefield (1958): a grande maioria pertencendo ao grupo "cowpea" e a outra parte incluindo espécies que pertencem a outros grupos de inoculação. Burton (1952) observou uma determinada especificidade no grupo "cowpea", verificando que em geral, as espécies desse grupo não necessitam de inoculação, no entanto, nem sempre fica assegurado o benefício da simbiose, sem ela. Muitos trabalhos foram desenvolvidos nesse sentido, envolvendo leguminosas de interesse para a agricultura, principalmente com referência à leguminosas forrageiras, ou de adubação verde. As

contribuições de Allen e Allen (1936), Allen (1949), Norris (1956), Carrol (1934), Galli (1958), Masefield (1958), Trinick (1965a e b) e muitos outros, permitiram a classificação das leguminosas dentro desses grupos de inoculação cruzada, estabelecendo-se assim, as relações com os diversos grupos de bactérias, associados com outras leguminosas. Norris (1967) e Robinson (1969) sugeriram que geralmente as leguminosas nodulam mais rápido e com mais eficácia quando inoculadas com culturas homólogas.

As razões das preferências de uma bactéria por uma determinada espécie, são desconhecidas (Allen, 1949). O grupo *Trifolium* de inoculação cruzada é bastante restrito, compreendendo apenas espécies desse gênero (Nutman, 1956). Nem sempre leguminosas do mesmo gênero são colocadas no mesmo grupo de inoculação, como é o caso do gênero *Mimosa* (Ishizawa, 1972). Dentro do grupo "cowpea", Nutman (1965) fez uma subdivisão, depois de observar que as estirpes eficientes em *Lotus uliginosus* tendiam a ser ineficientes em *Lotus corniculatus* e vice-versa.

Com leguminosas forrageiras e de adubação verde foram estabelecidos 4 grupos de inoculação cruzada, sendo a *Leucaena* colocada em um grupo à parte, pois só nodulou com estirpe homóloga, mostrando ser altamente específica, quando testada com estirpes pertencentes aos principais grupos de inoculação (Galli, 1958; Trinick, 1963), no entanto, Wilson (1939) conseguiu nodulação de leucaena com *Rhizobium* de algumas espécies usadas por Galli (1958). As 87 espécies, examinadas por Allen e Allen (1936), no Hawaii, enquandram-se dentro do grupo "cowpea".

Entre os inúmeros trabalhos sobre inoculação cruzada (Waksman, 1932; Fred et al., 1932; Allen & Baldwin, 1954; Norris, 1956; Galli, 1958), serão citados apenas os relacionados com leguminosas florestais, ou aqueles que incluem espécies florestais e forrageiras ao mesmo tempo, como é o caso de leucena.

Ishizawa (1955) conseguiu simbiose eficiente de *Leucaena* com *Rhizobium* de *Mimosa invisa* e os *Rhizobium* reisolados da *Mimosa invisa*, *Vigna sinensis* e *Acacia farnesiana* também nodularam eficientemente a *Leucaena*, confirmando a identidade do simbiote. Inoculada com estirpes de *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. e da própria espécie, a leucena nodulou eficientemente, não ocorrendo o mesmo quando inoculada com estirpes de *Mimosa caesalpinifolia* Benth., *Piptadenia peregrina* (L.) Benth. e *Lonchocarpus discolor* Hub., as quais produziram uma nodulação ineficiente (Campêlo & Campêlo, 1972). Com estirpes de crescimento lento, isoladas de 41 leguminosas tropicais, pertencentes aos principais grupos de inoculação, a leucena não nodulou, mas nodulou eficientemente com estirpes de *Mimosa*, *Acacia* e *Sesbania* (de crescimento rápido) e vice-versa. No entanto, a nodulação da *Sesbania* com *Rhizobium* da *Leucaena* foi ineficiente (Trinick, 1965a, 1968). A *Leucaena* nodulou apenas com 5 das 99 estirpes usadas e a *Vigna sinensis* nodulou eficientemente com *Rhizobium* isolado da *Leucaena* e da *Sesbania grandiflora* (Trinick, 1968; Johnson & Allen, 1952). Para conseguir um crescimento vigoroso, a *Leucaena* necessita de inoculação com *Rhizobium* específico (Trinick, 1963; Diatloff, 1973). Tes-

tando 21 estirpes de *Rhizobium* de leguminosas do Sudão, Habish e Khairi (1968) admitiram que a *Acacia* spp. tem sua própria estirpe de *Rhizobium*. Por outro lado, estirpes isoladas de espécies dos gêneros *Leucaena* e *Mimosa*, nodularam uma espécie do gênero *Medicago* (Trinick, 1965a).

Informações sobre nodulação e grupos de inoculação em leguminosas florestais a não ser a leucena, são muito escassas. Praticamente, nada se fez sobre o assunto. Sabe-se no entanto, que muitas espécies florestais não se enquadram dentro dos mais conhecidos grupos de inoculação, devido à sua especificidade, como é o caso da *Mimosa caesalpiniiifolia* que só nodulou quando inoculada com estirpes homólogas, não nodulando com *Rhizobium* de *Clitoria*, *Dolichos*, *Indigofera*, *Centrosema*, *Vicia* e com a estirpe CB-756 (conhecida como altamente promiscua) mostrando, assim, alta especificidade. Já *Piotadenia peregrina*, nodulou eficientemente com *Rhizobium* de *M. caesaloiniifolia* (Döbereiner, 1966, 1967; Campêlo & Döbereiner, 1969; Campêlo & Campêlo, 1970).

Ressaltando a importância das características fisiológicas, como complementação dos métodos culturais, para distinguir os microorganismos de diferentes hospedeiras, dentro de um determinado grupo de inoculação, Conklin (1936) dividiu as espécies por ela usadas em 2 grupos de inoculação cruzada, aos quais chamou de "Cowpea-soja" (grupo 1) e ervilha (grupo 2). Embora observando certas irregularidades, de acordo com essas características, incluiu no grupo 1, estirpes de *Cassia*, por terem produzidos nódulos em "Cowpea". Em 1937, Bushnell e Sar-

les estabeleceram 8 grupos, adicionando ao grupo "Cowpea" de inoculação, uma espécie do gênero *Cassia* pelas características culturais e morfológicas da estirpe isolada dessa espécie, semelhantes a outras pertencentes ao citado grupo. Em leite-litmus, a estirpe apresentou reação muito alcalina e sem zona de soro, características do *Rhizobium* do "Cowpea".

Estirpes de *Rhizobium* de crescimento lento, como *Rhizobium lupini*, nodularam *Lotus corniculatus* L., *Lotus uliginosus* e *Anthyllus vulneraria*, enquanto alguns *Rhizobium* de crescimento rápido isolados de espécies do gênero *Lotus*, nodularam *Ornithopus sativus* Brot. do grupo *Lupini*. Estirpes de *Rhizobium lupini* nodularam espécies do grupo "Cowpea" e por isso, espécies de *Lupinus* e *Ornithopus*, que tem *Rhizobium* de crescimento lento foram incluídas no grupo *Lupini* (Bushnell & Sarles, 1937), juntamente com estirpes de crescimento rápido, isoladas de espécies do gênero *Mimosa* (Jensen, 1967). Leguminosas que anteriormente eram consideradas como noduladas apenas quando inoculadas com *Rhizobium* de crescimento lento, nodularam, algumas vezes eficientemente, com *Rhizobium* de crescimento rápido, (Trinick, 1968). Além disso, Pankhurst (1970) admitiu dois grupos de inoculação dentro de um só gênero (*Lotus*), estirpes produtoras de ácido e estirpes que não produziam ácido.

Sabe-se que algumas leguminosas são mais promiscuas do que outras, nodulando com estirpes isoladas de plantas pertencentes a vários grupos de inoculação cruzada. A nodulação de espécies forrageiras ou de grãos, do grupo "Cowpea" por algumas estirpes de *Rhizobium japonicum* e *Rhizobium phaseoli* é bem

estabelecida (Sears & Carrol, 1927), mas exemplos de estirpes de "Cowpea" nodulando a soja (Conklin, 1936), Leonard, 1923), ou *Phaseolus vulgaris*, não são muito comuns (Habish & Khairi, 1968).

Por outro lado, Graham e Parker (1964) comentaram que é extremamente rara a inoculação cruzada entre *Rhizobium* de trevo, ervilha e feijão e hospedeiras do grupo de crescimento lento e que estirpes isoladas de cowpea, soja e lupinos não nodulam hospedeiras do grupo da ervilha e do trevo. Geralmente, estirpes isoladas de plantas promíscuas não nodulam reciprocamente outras plantas daquele grupo de inoculação (Allen & Allen, 1939). Como as espécies tropicais atuais, conservam seus caracteres ancestrais, é possível investigar o tipo primitivo de nodulação e as formas originárias dos nódulos, hoje conhecidos.

2.7.1 - Mecanismo da infecção

O mecanismo da infecção poderá ser visualizado da seguinte maneira, de acordo com Humphrey e Vincent (1959): a bactéria excretaria substâncias solúveis em água, provavelmente polissacarídeos, altamente específicas, as quais seriam capazes de induzir a produção de poligalacturonase pelas raízes da hospedeira. O princípio ativo atravessaria a parede celular, alcançaria o protoplasma e reagiria com alguns componentes da célula (Vincent, 1967). Ljunggren (1961) sugeriu que tais substâncias extra-celulares poderiam conter também ácido desoxirribonucleico. Embora o envolvimento da poligalacturonase no processo de infecção, seja ainda bastante discutido por vários autores (Nutman, 1970; Solheim & Raa, 1971), Fahraeus e Ljunggren (1959)

e Ljunggren e Fahraeus (1961), observaram relações entre a capacidade de formação de nódulos em variedades de trevos e a presença de estirpes homólogas e concluíram que a produção de poligalacturonase que antecede a invasão do pelo radicular, desempenha, provavelmente, um papel importante na iniciação do cordão de infecção. No entanto, Solheim e Raa (1971) não encontraram diferenças na atividade pectolítica entre seedlings inoculados e não inoculados de *Trifolium repens* L. e de *Medicago sativa* enquanto Lillich e Elkan (1968), observaram que na simbiose soja-*Rhizobium japonicum* a PG não é envolvida no processo de infecção.

Examinando polissacarídeos extracelulares de *Rhizobium*, Bailey et al. (1971), encontraram uma alta concentração de manose em 43 estirpes de crescimento rápido, no entanto, Humphrey et al. (1974), notaram a ausência desse açúcar em exopolissacarídeos de estirpes de *Rhizobium meliloti* e *Rhizobium trifolii*, ambas de crescimento rápido, quando o meio de cultura usado era purificado, então levantaram a possibilidade de que a fonte de manose encontrada por Bailey et al. (1971), seria devido à presença do extrato de levedura impuro, no meio.

2.8 - Características culturais e morfológicas do *Rhizobium*

Em cada grupo de inoculação, geralmente as bactérias tem características morfológicas e culturais semelhantes, no entanto, alguns investigadores (Fred et al., 1932; Graham, 1964a) observaram diferenças na utilização de carboidratos por diversas estirpes de *Rhizobium*. Drets e Arias (1972) encontraram di-

ferenças enzimáticas entre estirpes de *Rhizobium*, classificadas de acordo com a velocidade de crescimento em rápidas e lentas, depois de estudarem comparativamente as mais importantes enzimas das 4 principais vias metabólicas dos carboidratos, chegando à conclusão de que estirpes de crescimento rápido possuem as enzimas correspondentes ao ciclo da hexose monofosfato, enquanto as de crescimento lento apresentam ausência de atividade de NADP-6 fosfogluconato desidrogenase (6PGD). Por outro lado, Graham (1964b) observou que existem afinidades entre estirpes do grupo de crescimento rápido e grandes diferenças entre esse grupo e as de crescimento lento. Em 1974, Drets et al., mostraram também que existem grandes diferenças no crescimento e utilização de sacarose por estirpes de *Rhizobium*. As diferenças metabólicas poderão ser explicadas pela presença de uma invertase, em estirpes de *Rhizobium* de crescimento rápido e *Agrobacterium tumefaciens*, capaz de metabolizar a sacarose e pela ausência dessa enzima e da sacarose fosforilase em estirpes de *Rhizobium* de crescimento lento, tornando assim, inadequado o uso da sacarose para o crescimento de *Rhizobium* desse último grupo. A velocidade de crescimento dependeria assim, da existência de uma falha metabólica. Essa caracterização metabólica é importante do ponto de vista prático, uma vez que fornece um método simples na identificação das espécies de *Rhizobium*.

Burris et al., (1942) observaram que o metabolismo de poliálcoois por *Rhizobium* se processava através de algum mecanismo oxidativo e sugeriram que esta oxidação poderia ser efetuada por enzimas induzidos.

Algumas leguminosas tropicais, incluindo a *Leucaena* e a *M. caesalpinifolia* tem *Rhizobium* de crescimento rápido (Döbereiner, 1966) semelhante ao das leguminosas temperadas, na utilização de carboidratos, e são muito específicas (Trinick, 1965a). Certas estirpes de *Mimosa*, alcalinizaram o meio e outras o acidificaram (Norris, 1969), enquanto estirpes de *Cassia* produziram reação alcalina dentro de 2 semanas, num meio em que foram usados vários carboidratos (açúcares, álcoois e ácidos orgânicos), sendo o melhor crescimento obtido com arabinose, glicose e frutose, variando o pH de 7, 0-7, 4. Um crescimento ligeiramente mais abundante foi observado em algumas estirpes, quando o carboidrato era esterilizado por filtração (Conklin, 1936). Vincent (1970b) comentou que o *Rhizobium* é uma bactéria heterotrófica, capaz de utilizar uma larga faixa de carboidratos e de requerer, de acordo com a estirpe, para um melhor crescimento, um ou mais amino-ácidos e/ ou vitaminas. Muitos *Rhizobium* de crescimento lento, crescem melhor em galactose ou arabinose, embora o manitol seja a fonte de carbono mais usada nos meios de cultura. As de crescimento rápido utilizam uma faixa mais larga de compostos de carbono do que as de crescimento lento (Vincent, 1974). Ácidos orgânicos, álcoois e açúcares, incluindo a sacarose, foram utilizados por estirpes dos vários grupos de inoculação cruzada, sendo a única diferença a produção ou não, de ácido pelos diversos grupos (Galli, 1959), embora a produção de ácido seja uma medida duvidosa e indireta da utilização de carbono pela estirpe (Vincent, 1970b). Para um melhor desenvolvimento, certas estirpes requerem o

uso de biotina, tiamina e ácido pantotênico (Graham, 1963; Wilson, 1939).

Norris (1965) sugeriu que leguminosas que nodulam melhor em condições ácidas são associadas com *Rhizobium* de crescimento lento que não produzem ácido em meio de cultura. As leguminosas adaptadas a pH neutro são associadas com *Rhizobium* de crescimento rápido, os quais necessariamente produzem ácido.

Apesar da existência de numerosas hipóteses em torno do crescimento rápido ou lento e da produção de ácido ou álcali pelo *Rhizobium* de leguminosas temperadas ou tropicais, respectivamente, pouca informação existe a respeito das causas fisiológicas dessas características. Uma divisão entre estirpes que acidificam o meio e estirpes que o alcalinizam foi observada em meio de cultura com manitol. Como fonte energética, esse álcool mostrou-se melhor que a sacarose para ambos os grupos (Norris, 1965).

Através de técnicas de computação, Graham (1964b) observou as relações entre 83 estirpes de *Rhizobium* e 38 estirpes de bactérias pertencentes a outros gêneros, usando 100 diferentes testes que incluíam exigências de vitaminas, carboidratos, sensibilidade a antibióticos, etc. e chegou à conclusão de que as diferenças existentes entre estirpes de crescimento lento e de crescimento rápido, pertencentes aos principais grupos de inoculação, poderão ser usadas na separação dos grupos de *Rhizobium* uma vez que nenhuma afinidade serológica foi encontrada entre os dois grupos. Assim, *Rhizobium trifolii* Dangeard, *Rhizobium leguminosarum* Frank e *Rhizobium phaseoli* Dangeard, se-

riam incluídos numa só espécie e um novo gênero *Phytomyxa*, incluiria estirpes de crescimento lento. O melhor crescimento de estirpes de *Rhizobium* de *Lotononis* foi conseguido com galactose (2%) em substituição ao manitol. Com glucose, sacarose, manitol e lactose, essas estirpes não alcançaram 500×10^6 de células viáveis/ml (considerado como standard mínimo), enquanto com arabinose o standard máximo foi ultrapassado (Vincent & Jancey, 1964).

2.9 - Atividade específica da N_2 -ase.

A nitrogenase, responsável pela fixação do N_2 é uma enzima bastante versátil, capaz de reduzir N_2 a NH_3 , C_2H_2 a C_2H_4 e vários outros substratos, dando uma relação teórica de 1 mol de N_2 para 3 moles de C_2H_4 produzidos.

A análise baseia-se, portanto, na semelhança da taxa de ativação de elétrons e transferência para ambos N_2 ou C_2H_2 como substrato ($N_2 + 6 H^+ \xrightarrow{6e} 2NH_3$ e $C_2H_2 + 2H^+ \xrightarrow{2e} C_2H_4$). Tanto o acetileno como o etileno podem ser facilmente avaliados por cromatografia gasosa com uma precisão 1.000 vezes maior que a conseguida com os métodos de $^{15}N_2$ (Dart et al, 1972). A limitação principal do método de redução de acetileno é sua interpretação correta, pois se trata da avaliação da atividade da N_2 -ase, no momento da amostragem e não de valores absolutos, em termos de nitrogênio fixado (Döbereiner & Day, 1974, Döbereiner et al, 1972).

2.10 - Taxonomia

O *Rhizobium* apresenta um polimorfismo que tem caráter de fases sucessivas de um ciclo vital, podendo apresentar-se sob 3 formas: pequenos bastonetes flagelados, micrococcos e bastonetes maiores sem flagelo que são os bacteróides (Burkart, 1952), forma responsável pela fixação de N_2 (Bergersen, 1968). Quanto à flagelação, a maior parte das estirpes de *Rhizobium* são pouco flageladas, sendo encontrados dois tipos de flagelo: peritríquios, com um comprimento médio na faixa de **1,3** a **1,6 μ** e monotríquios com um comprimento na faixa de 1,9 a **2,2 μ** (Leifson, 1960). As bactérias peritríquias com vários flagelos dispersos, são características de crescimento rápido, enquanto as monotríquias, como a da soja, são características de crescimento lento (Burkart, 1952). Bergey (1934) agrupou os *Rhizobium* em 2 grupos de acordo com o comportamento em leite-litmus e a flagelação: 1) os que tornam o meio alcalino. Neste grupo, encontram-se os que formam zona de soro e são peritríquios e os que não formam zona de soro e cujas células são monotríquias; 2) os que tornam o meio ácido, formam uma zona de soro e as células são peritríquias. De Ley e Rassel (1965) levando em consideração o tipo de flagelo da estirpe, dividiram os *Rhizobium* em dois grupos: o primeiro abrangendo os flagelados peritríquios com uma composição mais baixa de guanina + citosina, na faixa de 58,6 a 63,1% e o segundo grupo, compreendendo os flagelados monotríquios com uma taxa mais alta de guanina + citosina na faixa de 62,8 a 65,5%, estabelecendo, assim, uma correlação entre a composição de bases no DNA e o tipo de flagelo.

A taxonomia dos *Rhizobium* tem sido objeto de muitos

trabalhos. O conceito de os considerar pertencentes a uma única espécie, *Bacillus radicum* Beijerinck, predominou durante muito tempo. Em 1879, Frank estabeleceu a separação de um gênero especial, *Rhizobium leguminosarum*. Atualmente, nos livros de texto, são conhecidos 6 diferentes grupos de inoculação, cada qual com seu *Rhizobium* específico, a saber: *Rhizobium trifolii* Dangeard para o grupo dos trevos, *Rhizobium meliloti* Dangeard para a alfafa, *Rhizobium leguminosarum* Frank para a ervilha, *Rhizobium lupini* Eckharolt para lupinos, *Rhizobium japonicum* Buchanan para soja, *Rhizobium phaseoli* Dangeard para o feijão e um grupo com um alto grau de promiscuidade, denominado grupo "cowpea" (Burkart, 1952), no entanto, existe muita controvérsia sobre essa classificação. Nutman (1965) comentou que os epítetos usados para descrever a bactéria de cada um desses 6 grupos principais, tem uma validade taxonômica duvidosa, mas são conservados por conveniência. De acordo com Vincent (1974) o gênero *Rhizobium* está associado com os gêneros *Agrobacterium* e *Cronobacterium*, na família Rhizobiaceae, dentro da Ordem Eubacteriales. Como bases para um sistema de classificação, Vincent (1970c) considerou a taxonomia numérica de Graham (1964b), a homologia do ADN, os antígenos internos do grupo e as relações G + C, como alguns dados importantes.

A posição taxonômica da planta dentro da família é uma consideração inicial que deve ser estabelecida, em estudos desse tipo, de acordo com Norris (1969). Depois de ter observado mais de 400 espécies de leguminosas da Rodésia, Corby (1971) encontrou uma relação entre a forma do nódulo maduro e a

classificação tribal da hospedeira, havendo, portanto, uma forma característica para cada tribo. Norris e t'Mannetje (1964) aplicaram o método "symbio-taxonomy" para determinar a posição filogenética de espécies dentro de grupos especializados e chegaram à conclusão de que existe uma relação mais aproximada entre as espécies que nodulam eficientemente com certas estirpes de *Rhizobium* do que entre estas hospedeiras e outras que nodulam ineficientemente, ou mesmo, que não produzam nódulos, com tais estirpes.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Procedência do material

Algumas sementes de leguminosas florestais, utilizadas nesta tese, vieram de Brasília, enviadas pelo Prof. Ezechias Heringer, outras foram conseguidas pelo Prof. Lauro Bezerra, da U.F.R.PE, uma espécie foi trazida de Parintins-Amazonas, uma enviada de Pelotas - Rio Grande do Sul, pelo Dr. Bertels e a maior parte coletada no Campus da U.F.R.R.J. e Estação Experimental Engenheiro Mário Xavier, RJ. As estirpes de *Rhizobium* foram todas isoladas no Setor de Microbiologia de Solos da EMBRAPA/RJ. Os solos usados para inoculação foram coletados nos locais de procedência das sementes e a areia usada nos vasos e nas sementeiras foi proveniente do Rio Guandu e da Praia do Recreio dos Bandeirantes - RJ, respectivamente.

3.2 - Local

Os experimentos foram executados em casa de vegetação e no Laboratório de Microbiologia de Solos (EMBRAPA/RJ), sendo os trabalhos de observação de flagelação, desenvolvidos nos Institutos de Microbiologia e de Biofísica da U.F.R.J.

3.3 - Experimentos

3.3.1 - Ocorrência de nodulação

A fim de se observar a capacidade de nodulação de 43 espécies florestais, foi feito inicialmente, um experimento em casa de vegetação (Figura 1), usando-se vasos com 10 kg de areia lavada (Figura 2), em blocos ao acaso com 2 repetições, sendo a germinação das sementes feita em sementeiras (Figura 3). Neste experimento foram usadas 24 estirpes de *Rhizobium*.

3.3.1.1. - Espécies de Leguminosas usadas:

<u>Subfamília</u>	Nome científico	Nome vulgar	Procedência.
Mimosoideae	<i>Acacia mollissima</i> Humb	Acácia negra	Pelotas- RS
"	<i>Adenantha pavonina</i> L.	Carolina	Est. Exp.-RJ
"	<i>Albizzia lebbek</i> (L.) Benth.	Ébano oriental	Km 47-RJ
"	<i>Entada polyphylla</i> Benth.	Entada	Parintins-AM
"	<i>Enterolobium ellipticum</i> Benth.	vinhático liso	Est. Exp.-RJ
"	<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) De Wit.	Leucena	Km 47-RJ
"	<i>Mimosa caesalpiniiifolia</i> Benth.	Sabiá	Km 47 - RJ
"	<i>Mimosa laticifera</i> Rizz. & Matt.	Quebra-foice	Brasília-DF
"	<i>Piptadenia peregrina</i> (L.) Benth.	Angico de cortume	Recife-PE
"	<i>Pithecellobium dulce</i> Benth.	Pitecelóbio	Recife-PE
"	<i>Pithecellobium</i> sp.	Pitecelóbio	Brasília-DF
"	<i>Plathymenia reticulata</i> Benth.	Vinhático do campo	Brasília-DF
"	<i>Prosopis juliflora</i> (Sw.) DC.	Algaroba	Recife-PE
"	<i>Stryphnodendron barbatimão</i> Benth.	Barbatimão	Brasília-DF
Faboideae	<i>Aeschynomene</i> sp.	Aeschynomene	Est. Exp.-RJ
"	<i>Bowdichia virgilioides</i> HBK.	Sucupira mirim	Recife-PE
"	<i>Dalbergia violacea</i> Hoffmgg.	Jacarandá	Brasília-DF
"	<i>Erythrina velutina</i> Willd.	Mulungú	Recife-PE

Faboideae	<i>Erythrina speciosa</i> Todaro	Mulungú	Km 47-RJ
"	<i>Lonchocarpus discolor</i> Hub.	Catinga de barrão	Est. Exp.-RJ
"	<i>Platypodium elegans</i> Vog.	Platipódio	Brasília-DF
"	<i>Sesbania marginata</i> Benth.	Sesbânia	Rio-Santos-RJ
"	<i>Vigna racemosa</i> (<i>Clitoria racemosa</i> Benth.)	Sombreiro	Km 47-RJ
Caesalpinioideae	<i>Bauhinia</i> sp.	Unha de vaca	Brasília-DF
"	<i>Caesalpinia bracteosa</i> Tul.	Catingueira	Recife-PE
"	<i>C. echinata</i> Lam.	Pau Brasil	Recife-PE
"	<i>C. ferrea</i> Mart.	Pau ferro	Brasília-DF
"	<i>C. peltophoroides</i> Benth.	Sibipiruna	Km 47-RJ
"	<i>C. pulcherrima</i> Swartz	Barba de barata	Recife-PE
"	<i>Cassia fistula</i> L.	Chuva de ouro	Est. Exp.-RJ
"	<i>C. grandis</i> L.f.	Cassia grande	Est. Exp.-RJ
"	<i>C. javanica</i> L.	Chuva vermelha	Est. Exp.-RJ
"	<i>C. leptophylla</i> Vog.	Cássia	Est. Exp.-RJ
"	<i>C. macranthera</i> DC.	Canudeiro	Est. Exp.-RJ
"	<i>C. sylvestris</i> Vell.	Mariçá	Est. Exp.-RJ
"	<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.	Pau d'óleo	Brasília-DF
"	<i>Delonix regia</i> Raf.	Flamboyant	Km 47-RJ

Caesalpinioideae	<i>Hymenaea courbaril</i> L.	Jatobá	Recife-PE
"			
"	<i>Melanoxylon brauna</i> Schott.	Braúna	Km 47-RJ
"	<i>Peltophorum vogelianum</i> Benth.	Tamboril	Recife-PE
"	<i>Schyzolobium parahyba</i> (Vell.) Tol.	Guapuruvu	Brasília-DF
"	<i>Sclerolobium aureum</i> Baill.	Sclerolóbio	Brasília-DF
"	<i>Tamarindus indica</i> L.	Tamarindo	Km 47-RJ

A determinação das espécies leguminosas foi feita através das seguintes publicações: Braga (1953), Campêlo (1970), Engler (1964), Bentham (1876), Barroso (1946) e Jackson & Hooker (1946).

3.3.1.2 - Estirpes de *Rhizobium* usadas

Referência	Isoladas de:
Al. 2,4	<i>Albizzia lebbek</i> (L.) Benth.
Ee. 4,6	<i>Enterolobium ellipticum</i> Benth
Ll. 2,10	<i>Leucaena leucocephala</i> (Lam.) De Wit.
X.18b, X.26a	<i>Mimosa caesalpiniiifolia</i> Benth.
Pp. 1,2	<i>Piptadenia peregrina</i> (L.) Benth.
Pd. 1,2	<i>Pithecellobium dulce</i> Benth.
Pj. 1,2	<i>Prosopis juliflora</i> (Sw.) DC.
Es. 1,3	<i>Erythrina speciosa</i> Todaro
Ld. 1,2	<i>Lonchocarpus discolor</i> Hub.
Vr. 4,5	<i>Vigna racemosa</i> (<i>Clitoria racemosa</i> Benth.)
Mi. 8,9	<i>Machaerium incorruptibile</i> Allem.
Cc. 1,2	<i>Cassia calycioides</i> DC.

3.3.1.3 - Pré-tratamento das sementes

Devido à resistência do tegumento, as sementes de muitas espécies florestais só germinam bem quando recebem um pré-tratamento com ácido sulfúrico, água morna e outros meios usados com a mesma finalidade. Para facilitar a germinação foi usado o ácido sulfúrico concentrado, variando o tempo conforme a resistência do tegumento, durante 10-15 min.. Em seguida, foram

bem lavadas em água corrente até a lavagem completa do ácido. Para a esterilização, foi usado HgCl_2 (sol. a 1:1.000), durante 2-3 min. e em seguida, lavadas com água esterilizada por 5 vezes. Após esses tratamentos, as sementes foram plantadas nas sementeiras.

3.3.1.4 - Adubação

Tanto os vasos quanto as sementeiras foram adubados com KH_2PO_4 (sol. 3,5%) 5 ml/kg de areia e com uma solução de elementos menores (1 ml/kg de areia). A solução de elementos menores tinha a seguinte composição: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 150,000g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 15,800g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 8,908g; H_3BO_3 : 1,000g; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,500g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 20,000g. A esta solução foram adicionadas 20,000g de ácido cítrico, completando-se o volume para 1.000 ml com H_2O destilada. A solução foi esterilizada em autoclave por 30 min., a 1,5 atm.

3.3.1.5 - Sementeiras

Para a germinação das sementes foram usadas caixas de madeira com areia de praia lavada, esterilizadas em autoclave por 1 h a 1,5 atm.. Com 8 dias de nascidas, as plantinhas foram transplantadas para os vasos (uma por vaso) e receberam o inoculante.

3.3.1.6 - Inoculantes

O meio de cultura usado para os inoculantes foi o 79 de Fred e Waksman (1928), semilíquido, distribuído em erlenmeyers (30 ml em cada), nos quais foram repicadas as estirpes de *Rhizobium*. Uma vez repicado, o erlenmeyer foi incubado em es-

tufa a 30°C, até a cultura atingir um bom desenvolvimento (6-8 dias), quando então, foi testada quanto à pureza, ao microscópio e riscada em placas de Petri com meio 79 + manitol. Comprovada a pureza, 5 ml de cada cultura foram inoculados por vaso. A composição do meio foi a seguinte: Agar: (bacto-agar, Difco), 2g; manitol: 10g; K_2HPO_4 : 0,1g; KH_2PO_4 : 0,4g; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$: 0,2g; NaCl: 0,1g; extrato de levedura (10%): 100 ml; azul de bromotimol (sol. 0,5% alcoólica): 5 ml. Completar com H_2O destilada para 1.000 ml. Esterilizar em autoclave durante 20 min. até 1,5 atm. (120°C).

As estirpes usadas foram divididas em 2 grupos: o primeiro, abrangendo as estirpes de *Rhizobium* (duas de cada espécie) isoladas de: angico, sabiá, vinhático liso e mulungú e o segundo grupo com estirpes de *Rhizobium* de: catinga de barrão, sombreiro, jacarandá, cássia, leucena, ébano, algaroba e pitecelóbio. Cada uma das espécies florestais foi inoculada com 5g de solo do local de procedência da semente ou com as estirpes de *Rhizobium* (duas de cada espécie) dos 2 grupos citados acima. Assim, os vasos que receberam inoculação com o grupo 1 de estirpes, foram inoculados com 40 ml de cultura (5 ml de cada estirpe) e os que receberam o grupo 2 de estirpes foram inoculados com 80 ml de cultura.

3.3.1.7 - Colheita e observações

65 dias após o transplante as plantas foram colhidas e feitas as observações de nodulação (número, cor e forma do nódulo) e coloração das raízes. Para determinar a forma, foi considerado apenas o nódulo maduro.

Simultaneamente, foram feitas observações em 17 espécies de leguminosas colhidas no campo, na área da U.F.R.R.J., nas Estradas Rio-Santos, Rio-Petrópolis e na Estação Experimental Eng. Mário Xavier, em plantas adultas e/ou jovens, para constatar o "status" de nodulação, em seu habitat natural. Como algumas espécies vieram de outros locais, não foi possível fazer tal observação em todas. Em plantas jovens, as observações foram feitas arrancando-as com o sistema radicular completo, enquanto em plantas adultas o solo era escavado, com enxadão, junto às raízes principal e secundárias mais jovens, até a profundidade de 0,50 m, onde eram cortadas e examinadas no próprio local. Todas as espécies foram colhidas em solos de aterro, em canteiros, compondo a arborização de parques e margens de estradas.

Espécies examinadas	Local	Idade da planta
<i>Adenantha pavonina</i>	Est. Exp.	Adulta
<i>Albizzia lebbek</i>	Est. Exp.	Jovem
<i>Enterolobium ellipticum</i>	Est. Exp.	Adulta
<i>Mimosa caesalpiniiifolia</i>	U.F.R.R.J.	Adulta e Jovem
<i>Piptadenia peregrina</i>	U.F.R.R.J.	Jovem
<i>Erythrina velutina</i>	U.F.R.R.J.	Joven
<i>Erythrina speciosa</i>	Rio-Petrópolis	Adulta
<i>Lonchocarpus discolor</i>	Est. Exp.	Adulta
<i>Sesbania marginata</i>	Rio-Santos	Adulta
<i>Bauhinia</i> sp.	U.F.R.R.J.	Adulta
<i>Caesalpinia echinata</i>	U.F.R.R.J.	Adulta e Jovem
<i>Caesalpinia peltophoroides</i>	U.F.R.R.J.	Adulta e Jovem

<i>Caesalpinia pulcherrima</i>	U.F.R.R.J.	Adulta
<i>Cassia fistula</i>	Est. Exp.	Adulta
<i>Delonix regia</i>	U.F.R.R.J.	Adulta e Jovem
<i>Peltophorum vogelianum</i>	U.F.R.R.J.	Adulta

Foi considerada jovem a planta com altura de até 1m, aproximadamente.

3.3.2 - Inoculação cruzada

A finalidade desse experimento foi, por meio de inoculações cruzadas, estabelecer os grupos de inoculação, aos quais pertencem as diversas florestais. Por falta de sementes, apenas 11 espécies das 21 noduladas no primeiro experimento, puderam ser testadas.

Foi feito também em casa de vegetação este segundo experimento, usando-se 11 espécies florestais e 1 forrageira (Estilosante), para comparação e 19 estirpes de *Rhizobium*, em 3 repetições, divididas em blocos com 36 latas. Para isso foram usadas latas de cerveja de 250 ml, com areia de praia lavada e esterilizadas em autoclave por 1 hora a 1,5 atm. (Figura 4).

3.3.2.1 - Sementeiras e latas

Para a germinação das sementes foram preparadas sementeiras idênticas as usadas no experimento 3.3.1, assim como, a adubação das latas e o tratamento das sementes foi também idêntico ao primeiro experimento (3.3.1).

3.3.2.2 - Transplante e inoculação

Com 8 dias de germinadas as plantinhas foram transplan-

tadas para as latas, já adubadas, onde receberam a inoculação (1 ml/lata, de cada cultura). O inoculante foi preparado em meio 79, já referido no experimento anterior.

3.3.2-3 - Espécies leguminosas e estirpes de *Rhizobium* usadas.

Espécies	Estirpes	Origem das estirpes
<i>Acacia mollissima</i>	Am. 1,2	<i>Acacia mollissima</i>
<i>Albizzia lebbek</i>	Al. 2,4	<i>Albizzia lebbek</i>
<i>Entada polyphylla</i>	Ep. 2	<i>Entada polyphylla</i>
<i>Erythrina speciosa</i>	Es. 1,3	<i>Erythrina speciosa</i>
<i>Leucaena leucocephala</i>	L1.7	<i>Leucaena leucocephala</i>
<i>Mimosa caesalpiniiifolia</i>	x-18,26	<i>Mimosa caesalpiniiifolia</i>
<i>Mimosa laticifera</i>	M1.1	<i>Mimosa laticifera</i>
<i>Piptadenia peregrina</i>	Pp. 2,4	<i>Piptadenia peregrina</i>
<i>Pithecellobium dulce</i>	Pd. 2	<i>Pithecellobium dulce</i>
<i>Prosopis juliflora</i>	Pj. 1	<i>Prosopis juliflora</i>
<i>Sesbania marginata</i>	Sm. 1	<i>Sesbania marginata</i>
<i>Stylosanthes schofield</i>	BR. 23	<i>Stylosanthes schofield</i>
	Pr. 1	<i>Plathymenia reticulata</i>
	Vr. 4	<i>Vigna racemosa</i>

As sementes tiveram a mesma procedência que as usadas no experimento anterior.

As estirpes foram igualmente testadas quanto à pureza.

3.3.2.4 - Colheita e análise

65 dias após o transplante, as plantas foram colhidas. Nas não noduladas foi feita apenas a observação da cor da raiz, enquanto nas noduladas foi avaliada a atividade específica da

nitrogenase, através do método de redução de acetileno e em seguida, feitas as observações de cor, número e peso seco de nódulos e cor das raízes.

Para medir a atividade específica da nitrogenase foi feito o seguinte: as raízes com nódulos foram cortadas (retirando-se antes o excesso de areia), introduzidas em frascos convenientemente calibrados, com capacidade de 120 ml e fechados com tampa de borracha perfurável com agulha hipodérmica. Parte do ar contido nos frascos foi substituída por acetileno (retirado de um cilindro), aspirando-se 12 ml do ar e injetando-se, em seguida, 12 ml de acetileno (com o auxílio de uma seringa hipodérmica), ficando nos frascos uma mistura com aproximadamente 10% de C_2H_2 . Os frascos foram incubados em temperatura ambiente, durante 1 hora, quando então, foram aspirados, 0,5 ml da mistura gasosa neles contida. As agulhas foram introduzidas em rolhas de borracha fixadas num suporte, onde permaneciam até o momento da ingestão no cromatógrafo. O etileno produzido nas amostras durante 1 hora, foi avaliado injetando-se esses 0,5 ml num Perkin Elmer (F_{11}), cromatógrafo de gás, com coluna Poropak N de 2m x 5mm (de diâmetro), à temperatura de 100°C, tendo o nitrogênio como gás de arraste, num fluxo de 25 ml/min. e ionização de chama de hidrogênio (Day et al., 1975). O acetileno também foi medido em todas as amostras, servindo de testemunha para os erros de injeção ou de amostragem. Para calibração, misturas de etileno e ar conhecidas foram usadas e todos os valores foram corrigidos, para a contaminação do etileno proveniente do acetileno usado. Uma vez conseguidos os gráficos foram calculados os resultados e feita a análise estatística, usando-se o teste de Tukey.

Feitas as observações de número, cor e forma, os nódulos foram levados à estufa a 65°C para secagem e pesagem posterior.

3.3.3. - Ensaio de laboratório

3.3.3.1 - Fontes de C para crescimento do *Rhizobium*

Em meio 79 sólido (Fred & Waksman, 1928), com azul de bromotimol, como indicador (pH 6,8), em tubos de ensaio inclinados (15 g de agar/litro), foram testadas 54 estirpes de *Rhizobium*, em relação ao crescimento e efeito no pH final do meio de cultura, comparando-se como fontes energéticas: galactose, dextrose, arabinose, maltose, manitol, xilose, açúcar cristal e succinato de sódio (pH inicial do succinato 7,3). A composição do meio foi a mesma usada nos experimentos anteriores.

Soluções a 10% de galactose, dextrose, arabinose, maltose, manitol, xilose, succinato de sódio e açúcar cristal foram preparadas e esterilizadas em filtros Seitz. Após a esterilização foi adicionado ao meio básico, já esterilizado em autoclave, 1% da solução, com auxílio de pipeta esterilizada. O meio foi homogeneizado com uma delicada agitação do tubo. As estirpes de *Rhizobium* foram repicadas nesses tubos, incubados a 30°C e após 3 dias, feitas as primeiras observações na mudança de pH e crescimento da cultura. Todas as estirpes foram também repicadas em tubos testemunhas (meio 79 sem fonte de C). Outras observações foram feitas no 6º, 10º, 14º e 20º dias, após incubação. As culturas usadas tinham a mesma idade, foram desenvolvidas em 79 líquido (com manitol) e testadas anterior-

mente, quanto à purezza, por meio de riscagem em placas de Petri com meio 79 sólido (com manitol) e com azul de bromotimol (pH 6,8), como indicador.

Estirpes de *Rhizobium* usadas:

Estirpes	Origem
Pp. 2,3,4,7	<i>Piptadenia peregrina</i>
Ep. 1,2,3	<i>Entada polyphylla</i>
Ee. 1,2,3	<i>Enterolobium ellipticum</i>
x.13, x.26, x.18	<i>Mimosa caesalpinifolia</i>
ES. 1,2,3	<i>Erythrina speciosa</i>
Am. 1,2,3	<i>Acacia mollissima</i>
Pr. 1,2,3	<i>Plathymenia reticulata</i>
Ml. 1,2,3	<i>Mimosa laticifera</i>
Sm. 1,2	<i>Sesbania marginata</i>
Vr. 1,2,4	<i>Vigna racemosa</i>
Pj. 1,2,3	<i>Prosopis juliflora</i>
Dm. 1,3	<i>Dimorphandra mollis</i>
Al. 2,3,4	<i>Albizzia lebbek</i>
Mi. 1,2,3	<i>Machaerium incorruptibile</i>
Ll. 2,7,10	<i>Leucaena leucocephala</i>
Ld. 1,2,3	<i>Lonchocarpus discolor</i>
Pd. 1,2	<i>Pithecellobium dulce</i>
Cc. 1,2,3	<i>Cassia calycioides</i>
BR. 23	<i>Stylosanthes sp.</i>
F. 310	<i>Phaseolus vulgaris</i>

As estirpes BR-23 e F-310 foram usadas para comparação por serem típicas de crescimento lento e de crescimento rápido, respectivamente. Para observação da mudança de pH foi preparada, para comparação, uma escala com meios líquidos,

com azul de bromotimol, como indicador, em tubos de ensaio. Como referência, foi tomado o pH 6,8 (inicial para os tubos inoculados) e daí a escala foi ajustada com ácido acético ou solução a 0,1% de NaOH, até se conseguir uma escala de pH, que variava de 5,8 a 7,8, a qual era medida em potenciômetro Beckman (Zeromatic II, MV x 100). A avaliação do crescimento da cultura foi feita em termos de: abundante, bom, regular, ruim e sem crescimento, no final do ensaio, ou sejam, 20 dias após a repicagem.

3.3.3.2 - Aspecto e tempo de aparecimento das colônias

Em placas de Petri com meio 79 (Fred & Waksman, 1928), com manitol, sólido, usando o azul de bromotimol como indicador (pH 6,8), foram riscadas, com alça de platina, 54 estirpes de *Rhizobium* com a finalidade de testá-las quanto à pureza e de observar o aspecto e o tempo necessário para o aparecimento das colônias. Para confirmar a pureza, foram feitas observações microscópicas, colocando-se uma gota da cultura sobre a lâmina e cobrindo-a com lamínula. As estirpes testadas foram as usadas no experimento 3.3.3.1. Foram consideradas de crescimento rápido quando o aparecimento das colônias se dava entre 24-72 horas após repicadas e depois desse tempo, foram consideradas de crescimento lento. 48 horas após o aparecimento das colônias foi avaliada a formação de muco, observada a cor das colônias e medido o tamanho das mesmas.

3.3.3.3 - Comportamento das estirpes em Leite-Litmus

A fim de se observar a reação (ácida ou alcalina) e formação da zona de soro de 54 estirpes de *Rhizobium* de espécies

florestais foram preparados tubos de ensaio com leite-litmus. As estirpes usadas foram as mesmas do teste 3.3.3.1, com 2 repetições.

A preparação do leite foi de acordo com o Manual Difco (1953), modificando-se apenas a temperatura, uma vez que a 120° C o leite fica caramelado. O método foi o seguinte: 100g de leite em pó desnatado (marca Silhouette) e 0,75g de bacto-litmus foram dissolvidos em água destilada e o volume completado para 1.000 ml. Uma vez a mistura homogeneizada, 5 ml foram distribuídos para cada tubo de ensaio (num total de 108 tubos) e esterilizados em autoclave a 110°C, durante 15 min.. Após esterilizados foram repicados e em seguida incubados em estufa a 30°C. Diariamente, foram feitas observações sobre a mudança de pH e formação da zona de soro, durante 35 dias.

3.3.3.4 - Característica flagelar

Com a finalidade de identificar o tipo de flagelo dos *Rhizobium* de crescimento lento e de crescimento rápido das espécies florestais, foram usadas 10 estirpes, sendo 9 isoladas de leguminosas florestais e 1 isolada de Estilosante (espécie forrageira), como comparação, por se tratar de uma estirpe típica de crescimento lento.

As estirpes foram as seguintes: Ll-7 isolada de leucena, Al-2 isolada de ébano oriental, Mi-1 isolada de jacarandá (essas 3 são de crescimento rápido e tornam ácido o pH do meio 79 + manitol), X-13 isolada de sabiá, M1-1 isolada de quebra-foice, Sm-1 isolada de sesbânia, Pp-2 isolada de angico (essas 4 são de crescimento rápido, mas alcalinizam o meio 79 + manitol), Ep.

2 isolada de entada, Pr-3 isolada de Vinhático do campo, BR-23 isolada de Estilosante (essas são de crescimento lento).

As estirpes foram repicadas em tubos de ensaio contendo 10 ml do meio 79 (Fred & Waksman, 1928) líquido, pH 6,8 e incubados em estufa a 30°C por 48 h, quando foi observada a atividade das culturas em microscópio ótico (a estirpe BR-23 foi incubada por mais 24 h). Os 10 ml da cultura bem desenvolvida, foram transferidos para tubo de centrífuga esterilizado e em seguida, levados à centrifugação a 4.000 rpm., durante 30 min. Terminada a centrifugação, retirou-se, com o auxílio de pipeta esterilizada, o líquido sobrenadante, desprezando-o. Ao concentrado, foi adicionado 1 ml de soro fisiológico, agitando-se levemente o tubo da centrífuga e em seguida, a cultura foi transferida para tubo de vidro graduado, ao qual foram adicionadas 3 gotas de glutaraldeído a 25% (usado como fixador). Até o momento de se fazer a coloração negativa, os tubos foram conservados em geladeira.

Técnica de coloração negativa:

Com pipeta Pasteur foi colocada sobre a grelha do microscópio eletrônico, 1 gota da cultura, deixando-se por 1 min. até que houvesse sedimentação. Com a mesma pipeta, retirou-se o líquido em excesso e o sedimento foi secado com auxílio de papel de filtro. Em seguida, também com pipeta Pasteur, foi depositada sobre o sedimento 1 gota do corante, deixando-se por 1 min. e o excesso, secado com papel de filtro. Em seguida foram tiradas as fotografias.

O corante é uma solução em partes iguais de bacitraci-

na (**10 μ /ml**) e PTA (ácido fosfotungstático) a 2% e pH 7. A função da bacitracina é baixar a tensão superficial do PTA que é o corante propriamente dito (Gregory & Pirie, 1973). A grelha foi preparada com uma camada fina de carbono para imprimir maior rigidez à mesma.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Ocorrência de nodulação

Das 43 espécies leguminosas plantadas, 21 apresentaram nódulos. Os resultados encontram-se no quadro 1 e uma comparação com o número de espécies noduladas encontradas por Allen e Allen (1961), pode ser observada no quadro 1a.

A maior percentagem de espécies noduladas foi observada nas Mimosoideae (93%), discordando dos resultados de Allen e Allen (1936). Talvez, isso seja explicado pelo fato de que as leguminosas florestais são, na sua maioria, Mimosoideae. Por outro lado, vale ressaltar que as observações de Allen e Allen (1961) foram feitas no campo, onde as plantas não tiveram as mesmas condições que na casa de vegetação, em vasos inoculados.

Com exceção da espécie *Sclerolobium aureum* que apresentou nódulos brancos quando inoculada com estirpes de *Rhizobium* de crescimento rápido (grupo 2) nenhuma espécie da subfamília Caesalpinioideae nodulou, assim como também a espécie *Adenanthera pavonina* (Mimosoideae). Embora Allen e Allen (1961) afirmem que espécies não noduladas ocorrem somente nas subfamílias mais primitivas Caesalpinioideae e Mimosoideae, duas espécies de *Aes-*

chynomene e *Bowdichia* da subfamília Faboidea e não nodularam e Rothschild (1970) não encontrou nódulos em espécies de *Erythrina*. Por outro lado, uma espécie de *Copaifera* (Caesalp.) foi encontrada com nódulos por Allen e Allen (1961), mas De Souza (1961), não encontrou nódulos nessa espécie observada por Allen e Allen (1961). Nesse experimento, uma outra espécie do mesmo gênero não nodulou com nenhum tratamento de inoculação. Embora Norris (1956, 1969) e Rothschild (1970) tenham encontrado nódulos em espécies de *Hymenaea*, *Bauhinia* e *Cassia* e Conklin (1936) tenha trabalhado com estirpes de *Rhizobium* isoladas de *Cassia*, Campêlo e Döbereiner (1969) não encontraram nódulos em leguminosas florestais deste último gênero. No entanto, Campêlo e Campêlo (1972) isolaram estirpes de *Rhizobium* de *Cassia calycioides*.

A cor da raiz é relacionada com a nodulação, segundo alguns pesquisadores (Norris, 1969; Corby, 1974). Espécies que não nodulam tem as raízes mais frequentemente coloridas do que espécies noduladas (Corby, 1974), no entanto, no presente trabalho, algumas espécies com raízes coloridas apresentaram nódulos e outras com raízes brancas não nodularam ou nodularam com uma determinada inoculação, parecendo portanto, ser a nodulação dependente do tratamento de inoculação, pois a cor da raiz não variava quando a planta estava ou não, nodulada. Todas as Caesalpinioideae realmente tinham raízes coloridas e não nodularam, variando a cor desde o amarelo pálido ao vermelho vinho, como é o caso da *Caesalpinia pulcherrima*. A forma do nódulo mostrou uma certa relação com a subfamília, independentemente da idade do nódulo ou da estirpe de *Rhizobium* com a qual a espécie foi inocu-

lada (quadro 1), concordando com Trinick (1968) quando afirma que a planta hospedeira determina a forma e a aparência externa dos nódulos, enquanto Corby (1971) encontrou forma de nódulos característica para as diversas tribos. Embora algumas espécies apresentassem duas formas de nódulos na mesma planta, como é o caso da *Entada polyphylla* que apresentou nódulos coralóides e oblongos, as Mimosoideae apresentaram nódulos coralóides (Figuras 5-8), com exceção de *Stryphnodendron*, em oposição às observações de Rothschild (1970) que afirma que o tipo de nódulo frequente nessa subfamília é o esférico. Corby (1971) comentou que o nódulo coralóide é característico da tribo Genisteae (Faboideae) e que 7% das espécies da tribo Galegeae (também Faboideae) apresentam também essa forma. Nenhuma Faboideae apresentou nódulos coralóides ou alongados com lóbulos, como denomina Corby (1974), mas esféricos (Figura 9). A única espécie Caesalpinioideae que nodulou apresentou nódulos esféricos.

O número de nódulos variou de 1 a 36/planta. Segundo Stamford (1971) o número de nódulos variou de acordo com a espécie forrageira.

Os nódulos mostravam-se distribuídos por todo o sistema radicular, isolados ou formando cachos, como em algumas Mimosoideae (Figura 10), tornando difícil a sua mensuração que era feita em 2 sentidos: da base até o ápice e na largura, variando, de 1 a 3 mm x 8 a 10 mm nos coralóides e de 1 a 9 mm de \varnothing nos esféricos. Devido ao maior tamanho das sementes e, conseqüentemente, maior quantidade de reservas alimentícias, de algumas Cae-

salpinioideae, o crescimento das plantas ocorreu antes delas sentirem a deficiência de nitrogênio, assim, essas espécies mostravam-se viçosas e bem desenvolvidas, mesmo sem nódulos, durante 30 a 35 dias, o que não ocorreu com as de sementes pequenas que sem nódulos, apresentavam sintomas de deficiência de nitrogênio.

A ocorrência de nódulos em 17 espécies florestais, no campo, pode ser observada nos quadros 1b e 1c.

As espécies que não nodularam em vasos também não apresentaram nódulos no campo e essas eram todas da subfamília Caesalpinioideae, concordando com muitos outros trabalhos (Allen & Allen 1961; Grobbelaar & Clark, 1972; Allen & Baldwin, 1954). No entanto, o método usado na casa de vegetação, tornando as condições mais favoráveis pela inoculação dos vasos com solo e com *Rhizobium*, deveria dar uma maior percentagem de nodulação.

A forma dos nódulos e a coloração das raízes, não variou quando comparadas com as das espécies dos vasos.

4.2. - Inoculação cruzada

Os resultados desse experimento podem ser observados nos quadros 2, 2a e 3.

Estirpes de *Rhizobium* de sabiá, angico, quebra-foice e acácia negra mostraram-se bem promiscuas, nodulando 5 a 7 espécies, das 12 usadas no experimento, embora essas espécies, com exceção da acácia, sejam relativamente específicas, só nodulando com estirpes de Mimosoideae, concordando com os resultados de Döbereiner (1967) Campêlo e Döbereiner (1969) e Campêlo e Campêlo (1972), mostrando que alta promiscuidade não é prerrogativa de estirpes de crescimento lento. No entanto, espécies de *Acacia*

fazem parte de um grupo bem específico, segundo Habish e Khairi (1968), mas Carrol (1934) colocou espécies de *Acacia* e de *Phaseolus* no grupo "Cowpea". Por outro lado, tanto a espécie como a estirpe de Pitecelóbio mostraram-se altamente específicas. A espécie só nodulou com a estirpe homóloga e com a estirpe isolada de algaroba (Pj-1, Mimosoideae), concordando com Carrol (1934) que colocou essa espécie num grupo isolado, uma vez que estirpes isoladas de *Pithecellobium dulce* mostraram-se altamente específicas. Comportamento idêntico teve a algaroba que só nodulou com a estirpe homóloga e com a estirpe isolada de quebra-foice (M1-1, Mimosoideae), de acordo com os trabalhos anteriores de Campêlo e Cempêlo (1972). A espécie *Leucaena leucocephala*, não se mostrou tão específica, nodulando com estirpes de outras Mimosoideae, concordando com resultados de Campêlo e Campêlo (1972) e Ishizawa (1955) que conseguiu nodulação eficiente da espécie no verão e ineficiente no inverno, quando inoculada com *Rhizobium* de *Dalea*, mas discordando de outros pesquisadores (Galli, 1958; Trinick, 1963, 1968; Wilson, 1944) que a consideraram altamente específica, uma vez que não nodulou quando inoculada com estirpes de *Rhizobium* de crescimento rápido (como é o dessa espécie), isoladas de plantas dos principais grupos de inoculação cruzada como *Rh. meliloti*, *Rh. trifolii*, *Rh. leguminosarum* e *Rh. phaseoli*.

Com exceção de acácia que nodulou com Sm-1 e Es-3, entada que nodulou com Es-3 e BR-23, ébano que nodulou com Vr-4 (estirpes isoladas de espécies Faboideae), as Mimosoideae restantes só nodularam com estirpes isoladas de espécies Mimosoideae (tanto homólogas, como heterólogas).

Apesar de Carrol (1934) e Norris (1956) incluírem espécies de *Acacia*, *Mimosa*, *Erythrina*, *Albizzia* e *Hymenaea* no grupo "Cowpea", Campêlo e Döbereiner (1969) só encontraram nódulos em uma das seis espécies florestais inoculadas com estirpes de *Rhizobium* desse grupo. O *Rhizobium* de *Albizzia lebbek* é de crescimento rápido, acidifica o meio de cultura e a espécie mostrou-se bastante promíscua, nodulando bem em solos ácidos, com *Rhizobium* de várias espécies, inclusive de outras subfamílias, embora Norris (1967) tenha admitido que se o *Rhizobium* de uma espécie é normalmente produtor de ácido, essa leguminosa terá *Rhizobium* específico e a espécie terá nodulação problemática em solos ácidos, discordando assim, dos presentes resultados. Há muitos casos em que as mesmas espécies são noduladas tanto por estirpes de crescimento rápido, como de lento (Jensen, 1967).

Como altamente específica mostrou-se a *Sesbânia*, só nodulando com a estirpe homóloga, concordando com Trinick (1965b) que, embora conseguindo nódulos dessa espécie com estirpes isoladas de *Leucaena*, esses eram ineficientes. No entanto, Ishizawa (1955) referiu-se a um grupo de inoculação *Sesbania-Mimosa*.

As espécies de *Faboideae* restantes, nodularam tanto com estirpes heterólogas de *Faboideae*, como de *Mimosoideae*. *Mulungú* mostrou-se altamente promíscua, nodulando com 9 das 19 estirpes testadas.

Quanto à fixação de nitrogênio, medida através da atividade específica da **N₂-ase**, os resultados podem ser observados nos quadros 2 e 2a.

A medida indica a ocorrência de nódulos ineficientes,

confirmada, na maioria das vezes, pela cor branca que os mesmos apresentam. No entanto, às vezes são encontrados nódulos cor de rosa com baixa atividade específica, mostrando que, no momento da medida a sua atividade já havia cessado, tornando-se ineficientes (atividade específica da N_2 -ase abaixo de 10 *n*-moles de C_2H_4 /h/mg de nódulos).

4.3 - Análise estatística do Experimento 3.3.2

Os resultados dessa análise podem ser observados no quadro 2a.

Apesar do experimento ter sido executado com 12 espécies de leguminosas e 19 estirpes de *Rhizobium*, com delineamento em blocos ao acaso, com 3 repetições, que possibilitasse o estudo da variação entre espécies, entre estirpes e a interação estirpes x espécies, não foi possível de ser analisado, uma vez que as estirpes não nodularam, como era de esperar, todas as espécies, notadamente as mais específicas, sendo portanto, as análises realizadas individualmente, para cada espécie.

Como pode ser observado no quadro 2, nem sempre as estirpes homólogas, produziram na espécie hospedeira, maior número, peso e atividade específica de nódulos.

Acácia negra:

Para a acácia, a análise estatística mostrou alta significância, entre as estirpes, no que se refere a número e peso de nódulos, não mostrando, no entanto, diferença significativa para atividade específica dos nódulos.

Com aplicação do teste de Tukey, pelo primeiro contras-

te foram grupadas as estirpes: Pp-4 (14,00), Am-2 (5,33), Ll-7 (5,00) e Am-1 (4,00) para número de nódulos. Pelo segundo contraste, a estirpe Pp-4 foi selecionada como a de maior capacidade para a formação de nódulos e foi a que apresentou também maior peso médio de nódulos (25,33 mg), embora essa estirpe não seja específica para acácia negra. Apesar de não haver significância entre estirpes para atividade específica, pode-se observar no quadro 2 que a Pp-2 (não específica) foi a que apresentou maior atividade específica e que Am-1 (homóloga), mostrou atividade específica mais alta que a Pp-4, o mesmo não acontecendo com Am-2 (homóloga) e com Ll-7 que se classificaram, quanto a número de nódulos, junto com a Pp-4, pelo 1º contraste.

Algaroba:

A análise foi realizada somente com duas estirpes: Pj-1 e M1-1. A Pj-1 que é específica para algaroba, foi distinguida estatisticamente quanto a número (13,33) e peso de nódulos (52,33 mg). Quanto à atividade específica, não houve diferença significativa entre as duas estirpes, apesar da M1-1 (não específica), inferior em número e peso de nódulos à Pj-1, ter apresentado uma atividade específica 2,6 vezes maior que a Pj-1, confirmando que nódulos maiores são mais eficientes e assim, um menor número de nódulos foi necessário ser formado para que uma alta atividade específica fosse conseguida. A falta de significância talvez tenha sido devida ao alto coeficiente de variação.

Angico:

Nessa análise, tomaram parte somente as estirpes, Pp-4,

Pp-2 (homólogas), M1-1 e X-26, não havendo diferença significativa entre elas para número e peso de nódulos, cujas médias encontram-se no quadro 2a. O coeficiente de variação alto para peso de nódulos, pode ser atribuído ao pequeno número de parcelas na análise e à grande variação observada nos dados.

Para atividade específica, com o teste de significância empregado, a estirpe Pp-4 foi a que apresentou maior atividade. A estirpe X-26 que apresentou uma média de 1,67 nódulos e peso médio de nódulos de 3,33 mg, mostrou atividade específica zero, demonstrando a ineficiência dos nódulos brancos formados por essa estirpe no angico.

Ébano oriental:

Houve diferença significativa entre as 9 estirpes que participaram da análise, para número e peso de nódulos e para atividade específica.

Para número de nódulos, sobressaiu-se a estirpe Am-1 com média de 20,33, para peso de nódulos, a Vr-4 com média de 85,00 mg e para atividade específica a Pp-4 com média de 57,67 n-moles de C_2H_4 /h/mg de nódulos, salientando-se que nenhuma dessas estirpes é específica para ébano. É interessante observar que a estirpe Vr-4 que apresentou maior média de peso de nódulos (85,00 mg) teve em média 5,33 nódulos e sua atividade específica média foi de 20,33 n-moles de C_2H_4 /h/mg de nódulos, indicando uma produção de nódulos grandes, mas pouco eficientes.

A Am-1, classificada em 1º lugar quanto a número de nódulos, apresentou um peso médio de nódulos de 42,67 mg e uma atividade específica de 39,67 n-moles de C_2H_4 /h/mg de nódulos.

Pelo 1º contraste, as estirpes A1-2 e A1-4 (homólogas), classificaram-se juntamente com Am-1 quanto a número de nódulos, no entanto, quanto à atividade específica e peso de nódulos foram as que apresentaram menores valores. Talvez isso se explique devido ao fato que, os nódulos rosas formados por essas estirpes homólogas, já haviam cessado a sua atividade na ocasião da medida.

Entada:

Para número e peso de nódulos houve significância estatística entre 9 estirpes que tomaram parte na análise.

Para número de nódulos, pelo 1º contraste, as estirpes Pp-4 e Es-3 (não específicas) foram as que apresentaram maior número de nódulos, mas pelo 2º contraste a Pp-4 sobressaiu-se à Es-3. Para peso de nódulos, pelo 2º contraste, a Es-3 sobressaiu-se em relação à Pp-4, mas pelo 1º contraste elas se classificaram juntamente. Não houve diferença significativa entre estirpes para a atividade específica, no entanto, observando-se os dados no quadro 2, constata-se, que a Es-3, apresentou apenas 5,00 n-moles de C_2H_4 /h/mg de nódulos, enquanto a Pp-4, 52,00 n-moles de C_2H_4 /h/mg de nódulos. A estirpe que maior atividade específica apresentou foi a Ep-2 (homóloga) com 76,67 n-moles de C_2H_4 /h/mg de nódulos apesar do pequeno número de nódulos (7,33) e peso médio de nódulos, também baixo (30,67 mg), donde se deduz que os poucos nódulos estavam todos em atividade.

Leucena:

Para número, peso e atividade específica de nódulos, a

análise que foi realizada apenas com 4 estirpes: L1-7, M1-1, x-18 e x-26, mostrou significância estatística entre as estirpes. A L1-7 (homóloga) distinguiu-se como a de maior capacidade para a formação de nódulos (12,33), a de nódulos mais pesados (30,00 mg) e também a que mostrou atividade específica mais alta (115,67 n-moles de C_2H_4 /h/mg de nódulos). Convém ressaltar que, para atividade específica, apenas 3 estirpes entraram na análise, uma vez que a M1-1 apresentou zero em todas as repetições, demonstrando a formação de nódulos ineficientes, como confirmado pela cor branca que apresentam.

Mulungú:

Na análise estatística dessa espécie, bastante promíscua, tomaram parte 9 estirpes.

Para número de nódulos, pelo 1º contraste, somente a Pj-1 estaria em 2º lugar. Pelo 2º contraste, a Vr-4 (não específica) foi a que mostrou maior número de nódulos (11,00). Quanto a peso de nódulos, pelo primeiro contraste estariam em 2º lugar as estirpes: Sm-1, A1-2 e Pj-1, mas pelo 2º contraste, distinguiu-se a Am-1 como a de nódulos mais pesados (49,33 mg). A Sm-1 que foi a que apresentou atividade específica mais alta (112,00 n-moles de C_2H_4 /h/mg de nódulos), teve em média, apenas 1 nódulo, com peso médio de 6,33 mg. As estirpes Es-1 e Es-3 (homólogas), pelo 1º contraste, nos 3 objetivos pesquisados foram classificadas em 1º lugar, juntamente com a Vr-4, em número de nódulos, com a Am-1 em peso de nódulos e com Sm-1 em atividade específica.

Pitecelóbio:

A análise estatística foi realizada entre as estirpes: Pj-1 e Pd-2. Não houve diferença significativa para o número e peso de nódulos. A Pj-1 apresentou 4,38 mg/nódulo, enquanto que a Pd-2 (específica) apresentou 3,55 mg/nódulos. Não foi analisada a atividade específica, visto que, somente a estirpe Pd-2, mostrou uma atividade específica de 12,00 n-moles de C_2H_4 /h/mg de nódulos.

Quebra-Foice:

Não houve diferença significativa entre as estirpes: Pp-4, Pp-2, M1-1, X-18 e X-26 que tomaram parte na análise, para número e peso de nódulos.

Observando-se o quadro 2, nota-se que a M1-1 (homóloga) apresentou maior número e maior peso de nódulos. Houve significância estatística para atividade específica, classificando-se 2 M1-1 em primeiro lugar, juntamente com as estirpes Pp-4, Pp-2 e X-18, pelo 1º contraste, mas pelo 2º contraste a estirpe Pp-4 distinguiu-se das demais, apresentando uma atividade específica de 155,00 n-moles C_2H_4 /h/mg de nódulos, a mais alta calculada em todo o trabalho.

Ressalta-se que essa estirpe foi a que produziu menor número de nódulos (4,00) e menor peso de nódulos (9,33 mg), nessa espécie, donde se pode concluir que, os poucos nódulos existentes eram todos eficientes e com uma alta atividade específica da N_2 -ase.

Sabiá:

Para essa espécie, a análise foi realizada entre as es-

tirpes Pp-2, M1-1, X-18 e X-26. Não houve diferença significativa para os objetivos pesquisados, quais sejam: número, peso e atividade específica dos nódulos, entre essas estirpes. As estirpes homólogas, X-18 e X-26, foram as que apresentaram maior número e peso de nódulos. Quanto à atividade específica, a X-18 foi a que apresentou maior atividade específica, enquanto a X-26 mostrou, em média, a atividade específica mais baixa, não sendo, no entanto, o resultado apresentado significativo. É interessante observar que a estirpe Pp-2 (não específica) com pequeno número (8,06) e peso de nódulos baixo (18,00) mostrou uma atividade específica alta (67,67 n-moles de C_2H_4 /h/mg de nódulos), em relação à X-26 que só deu 15,33 n-moles de C_2H_4 /h/mg/ de nódulos, com quase o mesmo número de nódulos como a Pp-2.

Estilosante:

Para essa espécie forrageira, usada para comparação, tomaram parte nas análises, além da estirpe específica BR-23, as estirpes Am-1, Pp-4, Es-1 e Es-3. Não houve diferença significativa entre as estirpes, para número, peso e atividade específica de nódulos. Observando-se os dados, pode-se informar que a BR-23 apresentou em média 6,24 nódulos, com peso médio de 12,67 mg e uma atividade específica de 132,33 n-moles de C_2H_4 /h/mg de nódulos, enquanto a Am-1, apresentou praticamente o mesmo número de nódulos (6,69), o mesmo peso (10,00) e uma atividade específica (122,00 n-moles de C_2H_4 /h/mg de nódulos), bem próxima à apresentada pela BR-23 (homóloga), demonstrando a eficiência dos poucos nódulos formados pela estirpe Am-1.

4.4 - Ensaio de laboratório

4.4.1- Fontes de C para o crescimento do *Rhizobium*, aspecto das colônias em placas de Petri com meio 79 + manitol e reação das estirpes de *Rhizobium* em leite-litmus.

Os resultados destes testes são apresentados no quadro 4 e nas figuras 11 a 18.

De acordo com o efeito do uso das várias fontes de C sobre o pH final do meio de cultura e o crescimento, as 54 estirpes de *Rhizobium* testadas foram divididas em 3 grupos.

No I grupo foi tomada para comparação a estirpe BR-23 que é típica produtora de álcali, associada a leguminosas tropicais, a qual, embora de crescimento lento teve comportamento semelhante às estirpes Ml.1, 2, 3, Sm.1, 2 de crescimento rápido. Todas as estirpes desse grupo tiveram crescimento bom a abundante com galactose, dextrose, arabinose, maltose, manitol, xilose e sacarose, com exceção da BR-23 que nesse último carboidrato teve crescimento regular, discordando de Graham (1964a) quando afirma que algumas estirpes de *Rhizobium* não crescem em meio com sacarose como única fonte de C, embora Vincent (1974) tenha observado que estirpes de crescimento lento não usam saca-

rose, por não possuírem a enzima necessária para metabolizar esse dissacarídeo. Para todas as estirpes as melhores fontes de carbono foram: dextrose, arabinose, manitol e xilose, discordando de Vincent (1974) que considerou a sacarose como a melhor fonte para as de crescimento rápido e de Nutman (1965) quando concluiu que a sacarose é a fonte de carboidrato preferida pelo *Rhizobium*, de uma maneira geral. As estirpes de crescimento rápido, desse grupo, tornaram alcalino o pH final do meio de cultura, discordando de Norris (1965) quando afirmou que estirpes de crescimento rápido, na ausência de CO_3Ca são produtoras de ácido, enquanto a BR-23 acidificou o meio com arabinose e xilose e alcalinizou-o com os demais carboidratos. No entanto, as 39 estirpes do gênero *Sesbania* estudadas por Johnson e Allen (1952), tiveram uma reação alcalina no meio com manitol, de acordo com os resultados obtidos nesse trabalho. Nos tubos testemunhas todas as estirpes alcalinizaram o meio e tiveram um crescimento ruim a regular, mostrando, no entanto, que provavelmente, usaram o etanol do indicador, uma vez que não havia outra fonte de C, no meio.

Em leite-litmus, a reação foi idêntica para todas: alcalinizaram o meio e não formaram zona de soro (Figura 18). Quanto ao aspecto das colônias em meio 79 com manitol, todas eram planas, branco-leitosas, pequenas, possuíam bordos lisos e apresentavam bastante muco. O aparecimento das colônias se deu entre 24 e 72 h, por isso foram consideradas de crescimento rápido, com exceção da BR-23 que, formando colônias depois de 72 h de repicada, foi considerada de crescimento lento, confirmando ensaios anteriores.

O II grupo compreende estirpes de crescimento rápido, as quais tornaram ácido o pH final do meio com todas as fontes de carbono, com exceção do meio com succinato, o que aliás poderia ser explicado, uma vez que a estirpe usando ácido succínico, deixa sobrar o sódio o que provocaria a alcalinização do meio. Porisso, essas estirpes foram comparadas à F-310, de feijão, típica de leguminosas temperadas e que se comportou, praticamente, de modo idêntico. Enquanto estirpes de *Cassia* foram colocadas neste II grupo, Conklin (1936) observou que estirpes desse gênero eram de crescimento lento e produziam álcali. As estirpes Ld-1, 2, 3 tiveram crescimento regular em arabinose e maltose, assim com o também a Ll-7 em maltose. As estirpes Ll-2, 10 e Pd-1 e 2 não modificaram o pH do meio com maltose, embora tenha tido um crescimento bom e abundante, respectivamente. As estirpes restantes tiveram crescimento bom a abundante em todas as fontes de Carbono. Assim, de uma maneira geral, todas as estirpes se desenvolveram melhor em galactose, dextrose, manitol e xilose.

Nos tubos testemunhas, as estirpes tiveram crescimento regular a ruim e alcalinizaram o meio, utilizando, como as do I grupo, o etanol do indicador usado no meio.

Em leite-litmus, a grande maioria das estirpes desse grupo apresentou reação bastante ácida e formou uma zona de soro na superfície do meio, embora Bushnell e Sarles (1937) tenham observado que estirpes de *Cassia* apresentaram reação alcalina e sem formação da zona de soro, discordando, assim, do comportamento das estirpes de *Cassia*, usadas nesse trabalho. As estir-

pes Pj-1, Pd-1, 2, tiveram um comportamento diferente das restantes. Enquanto Pj-1 alcalinizou o meio e não formou zona de soro, Pd-1 e 2, apresentaram reação alcalina, mas formaram zona de soro, concordando com os resultados obtidos com estirpes de *Trifolium* por Bushnell e Sarles (1937).

Em meio 79 com manitol as colônias apresentaram-se um pouco elevadas e branco amareladas quando tinham de 2-4 mm de ϕ . As de menor tamanho eram planas e branco-leitosas. O aparecimento das colônias se deu entre 24 e 72 h e com bastante formação de muco, razão pela qual, as estirpes foram consideradas de crescimento rápido.

O III grupo abrange um sub-grupo de estirpes de crescimento rápido, as quais acidificam o meio com Galactose, Dextrose, Arabinose e Xilose e o alcalinizam com Maltose, Manitol, Succinato e Sacarose e um segundo sub-grupo, incluindo estirpes de crescimento lento, as quais tem um comportamento idêntico ao 1º sub-grupo, com todas as fontes de Carbono, embora Vincent (1970b) tenha admitido que a produção de ácido seja uma medida duvidosa da utilização de C pela estirpe.

Graham (1963, 1964a) observou que estirpes de crescimento lento, geralmente só utilizavam D-glucose, citrato de sódio, D-xilose, D-manitol, L-arabinose, galactose e D-frutose e que o máximo de crescimento foi obtido com xilose, arabinose e galactose. Quanto às de crescimento rápido, utilizavam praticamente todos os substratos usados, com exceção da dextrina, no entanto, os presentes resultados mostram que o melhor crescimento, tanto para as estirpes de crescimento rápido, como para as

de crescimento lento, desse grupo, foi obtido com manitol e embora algumas de crescimento lento, não tenham conseguido um crescimento abundante como as de crescimento rápido, usaram todas as fontes de C, sendo o crescimento mínimo obtido com maltose. As estirpes Es-1, 2 e Pr-1, 2, 3, no entanto, não se desenvolveram em succinato. Todas, com exceção das estirpes Es-1, Es-2, usaram sacarosa, com crescimento de bom a abundante, discordando de Vincent (1974) e de Drets e Arias (1970, 1972) que afirmaram que estirpes de crescimento lento não usam esse carboidrato, enquanto Conklin (1936) observou que arabinose, glucose e frutose eram as fontes mais usadas por estirpes de crescimento lento. Também com as estirpes desse grupo (com exceção das estirpes Es-1 e Es-3), observou-se um crescimento ruim e alcalinização do meio, nos tubos testemunhas.

Todas as colônias de estirpes desse grupo eram planas e branco-leitosas no meio com manitol e apresentavam bordos lisos. O aparecimento das colônias se deu de 36 h (rápidas) a 5 dias (lentas).

Em leite-litmus, as estirpes de crescimento lento, alcalinizaram o meio e não formaram zona de soro. As de crescimento rápido, acidificaram o meio e formaram zona de soro, com exceção das estirpes Pp-4 e Pp-7.

De uma maneira geral, as estirpes dos 3 grupos não se desenvolveram bem em Succinato, tornando o meio fortemente alcalino, devido ao consumo do ácido succínico. Pela hipótese de Norris (1965), o grupo de estirpes de *Rhizobium* de crescimento rápido adaptado, a solos neutros, teria desenvolvido um siste-

ma enzimático para a utilização de açúcares, sistema esse que o grupo de crescimento lento, adaptado a solos tropicais (ácidos) não desenvolveu, por ser prejudicial à sua sobrevivência, discordando dos resultados obtidos nesse trabalho.

4.4.2 - Característica flagelar

Os resultados desse teste podem ser observados através das figuras 19, 20, 21 e do quadro 5.

De acordo com os resultados obtidos no experimento "Uso de carboidratos" foram escolhidas 3 estirpes, dentro dos grupos I e II e 4 estirpes dentro do grupo III.

De uma maneira geral, tanto estirpes de crescimento rápido como de lento, flagelaram muito pouco. Duas estirpes do grupo I, M1-1 (crescimento rápido) e BR-23 (lento) não flagelaram com 48 nem com 72 horas. Não sendo encontrados flagelos soltos no meio, concluiu-se que estas duas estirpes não flagelaram, enquanto a Sm-1, também do grupo I, é monotríquia (Figura 19). As estirpes dos grupos II e III, mostraram flagelação num só polo, apresentando às vezes um único flagelo (Figura 20) e às vezes vários flagelos, no mesmo polo (Figura 21). Nem mesmo as de crescimento rápido apresentaram flagelação peritríquia. Os presentes resultados não concordaram com as observações de Conklin (1936), Vincent (1970b) e Bergey (1934), as quais mostram que estirpes de crescimento rápido (como as do feijão) são peritríquias e as de crescimento lento (tipo Cowpea, soja) são monotríquias. No entanto, Leifson (1960) citou estirpes isoladas de *Albizzia* (crescimento rápido) que eram monotríquias e de *Acacia*

(crescimento lento) peritríquias. De Ley e Rassel (1965) observaram que os *Rhizobium* com flagelos peritríquios, de crescimento rápido, possuem um flagelo sub-polar, o qual é mais firmemente ligado à célula do que os outros e assim, algumas estirpes poderiam, incorretamente, ser consideradas como flageladas sub-polares. Assim, a flagelação não pode ser usada como critério de separação entre grupos de crescimento rápido e lento, uma vez que houve variação apenas no número de flagelo, mas mesmo assim, não corresponde às divisões feitas dentro do teste 4.4.1., como pode ser observado no quadro 5.

Bushnell e Sarles (1937) observaram que tanto estirpes monotríquias como peritríquias, podiam alcalinizar o meio leite-litmus, com formação ou não, de zona de soro.

5 - CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho pode-se concluir que:

a) 49% das leguminosas florestais testadas em casa de vegetação, nodulam, nas condições deste experimento, sendo assim distribuídas: 93% Mimosoideae, 78% Faboideae e 5% Caesalpinioideae, não havendo relação entre a ocorrência de nódulos e a coloração da raiz (5.1 - Quadro 1).

b) A cor da raiz é característica da espécie.

c) Há uma certa relação entre a forma do nódulo e a subfamília a que pertence a espécie, de forma que espécies da subfamília Mimosoideae (todas as tribos) apresentam nódulos coralóides ou oblongos e as espécies da subfamília Faboideae, nódulos esféricos, independente da estirpe inoculada.

d) Assim como existem espécies de leguminosas mais promíscuas do que outras, existe também uma maior ou menor promiscuidade entre as estirpes de *Rhizobium* (5.2 - Quadros 2 e 3).

e) As espécies mais promíscuas são: acácia negra, entada, ébano oriental (Mimosoideae) e mulungú (Faboideae) que nodularam com 9 a 12 das 19 estirpes testadas; com alta especifici-

cidade, formando cada uma, um grupo de inoculação, revelaram-se as espécies: pitecelóbio, algaroba (Mimosoideae) e sesbânia (Faboideae); formando um grupo de especificidade intermediária dentro da subfamília Mimosoideae estão as espécies; leucena, sabiá, quebra-foice e angico que só nodulam entre elas.

f) O fato de uma espécie ser promíscua, não implica que sua estirpe também o seja, assim, as estirpes: Am-2 (isolada de acácia), Al-2, Al-4 (de ébano), Es-1 (de mulungú), BR-23 (de Stylo), Pr-1 (de platimênia), Vr-4 (de sombreiro), são bem específicas, só nodulando uma outra espécie, além da que foi isolada. As estirpes Pp-2, Pp-4 (isoladas de angico), Ml-1 (de quebra-foice) X-26 (de sabiá), mostraram alta promiscuidade, capazes de provocar nódulos em várias espécies, inclusive de outra subfamília.

g) A estirpe que apresentou a mais alta atividade específica (155,00 n-moles de C_2H_4 /h/mg de nódulos) foi a Pp-4 (com a espécie quebra-foice), apesar do pequeno número médio de nódulos (4,00), seguida das estirpes BR-23 (em estilosante), Ml-1 (em algaroba), Am-1 (em estilosante), L1-7 (em leucena) e Sm-1 (em mulungú) com 132,33; 130,33; 122,00; 115,67 e 112,00 n-moles de C_2H_4 /h/mg de nódulos, respectivamente. A estirpe Es-3 foi a que conseguiu maior peso médio de nódulos (101,67mg, em entada), em todo o trabalho, com um número médio de nódulos razoável (28,67), mas com atividade específica muito baixa (5,00 n-moles de C_2H_4 /h/mg de nódulos).

h) Tentou-se dividir as estirpes em 3 grupos, de acordo com o uso das várias fontes de C, em relação ao crescimento

e pH final do meio de cultura. O I grupo abrangendo as estirpes M1-1, M1-2, M1-3 (isoladas de quebra-foice), Sm-1, Sm-2 (isoladas de Sesbânia) e BR-23 (isolada de estilósante). O II grupo abrangendo as estirpes: Pj-1, Pj-2, Pj-3 (isoladas de algaroba), A1-2, A1-3, A1-4 (isoladas de ébano), L1-2, L1-7, L1-10 (isoladas de leucena), Pd-1, Pd-2 (isoladas de pitecelóbio), Vr-1, Vr-2, Vr-4 (isoladas de sombreiro), Mi-1, Mi-2, Mi-3 (isoladas de jacarandá), Ld-1, Ld-2, Ld-3 (isoladas de catinga de barrão), Dm-1, Dm-3 (isoladas de dimorfandra), Cc-1, Cc-2, Cc-4 (isoladas de cássia) e F-310 (isolada de feijão e usada para comparação). O III grupo compreendendo as estirpes: Pp-2, Pp-3, Pp-4, Pp-7 (isoladas de angico), Ep-1, Ep-2, Ep-3 (isoladas de entada), Ee-1, Ee-2, Ee-3 (isoladas de vinhático liso), X-13, X-18, X-26 (isoladas de sabiá), Am-1, Am-2, Am-3 (isoladas de acácia) Pr-1, Pr-2, Pr-3 (isoladas de vinhático do campo) e Es-1, Es-2, Es-3 (isoladas de mulungú).

i) O melhor crescimento, nos 3 grupos, foi obtido com manitol e o crescimento mínimo com maltose e succinato de sódio. Quando esse ácido orgânico foi usado como fonte de carbono, não houve diferença no pH final do meio, entre as estirpes de *Rhizobium* que o usaram, pois devido ao consumo do ácido, todas tornaram o meio fortemente alcalino. Com exceção das estirpes Es-1 e Es-3, que não se desenvolveram, as restantes tiveram um crescimento ruim a regular nos tubos testemunhas, mostrando que elas usaram o etanol do indicador como fonte de C e alcalinizaram o meio.

Em leite-litmus, estirpes que acidificaram o meio for-

maram zona de soro e essas eram na maioria de crescimento rápido; estirpes que alcalinizaram o meio, não formaram zona de soro. As estirpes Pd-1, 2 constituem exceções, pois alcalinizaram o leite-litmus, mas formaram zona de soro (5.3 - Quadro 4).

j) Não houve diferença entre a forma de flagelação de estirpes de crescimento rápido e lento. Estirpes de angico, jacarandá, sesbânia, leucena, ébano (de crescimento rápido), entada e platimênia (de crescimento lento) apresentam um único flagelo e num só polo, sendo portanto monotríquias. A estirpe X-13 de sabiá, apresenta vários flagelos, num só polo, sendo classificada como lofotríquia (5.4 - Quadro 5).

6 - RESUMO

Foram realizados 2 experimentos em casa de vegetação com leguminosas florestais. O primeiro teve como objetivo observar a ocorrência de nódulos em 43 espécies florestais, pertencentes às 3 subfamílias (Mimosoideae, Faboideae e Caesalpinioideae), em vasos de cerâmica com areia, em blocos ao acaso com 3 tratamentos de inoculação : a) solo do local de procedência da semente; b) grupo 1, de estirpes de *Rhizobium* isoladas de *Piptadenia peregrina* (L.) Benth. (angico), estirpes: Pp-1, Pp-2; *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth. (sabiá), estirpes: X-18, X-26; *Erythrina speciosa* Todaro (mulungú), estirpes: Es-1, Es-3 e *Enterolobium ellipticum* Benth. (vinhático liso), estirpes: Ee-4, Ee-6; e grupo de estirpes de *Rhizobium* isoladas de *Vigna racemosa* (sombreiro), estirpes: Vr-4, Vr-5; *Machaerium incorruptibile* Allem. (jacarandá), estirpes: Mi-8, Mi-9; *Leucaena leucocephala* (Lam.) De Wit. (leucena), estirpes: Ll-2, Ll-10; *Albizzia lebbek* (L.) Benth. (ébano), estirpes: Al-2, Al-4; *Prosopis juliflora* (Sw.) DC. (algaroba), estirpes: Pj-1, Pj-2; *Lonchocarpus discolor* Hub. (catinga de barrão), estirpes: Ld-1, Ld-2; *Cassia calycioides* DC. (cássia), estirpes: Cc-1, Cc-2 e de *Pithecellobium dulce* Benth. (pitecelóbio), estirpes:

Pd-1, Pd-2. Simultaneamente, foram feitas observações sobre a presença de nódulos em 17 espécies florestais, no campo.

A percentagem de nodulação foi assim distribuída: subfamília, Mimosoideae 93%, subfamília Faboideae 78% e subfamília Caesalpinioideae 5%.

Observou-se uma relação entre a forma do nódulo e a subfamília, assim é que as espécies da subfamília Mimosoideae apresentam nódulos coralóides, com exceção da espécie *Stryphnodendron* barbatimão (barbatimão) e as da subfamília Faboideae, nódulos esféricos, independentemente da estirpe inoculada. A cor da raiz também é característica da espécie, não havendo relação entre a cor e a presença ou ausência de nódulos.

O segundo experimento teve como finalidade observar a inoculação cruzada entre 11 espécies florestais, usadas no 1º experimento e uma espécie forrageira, usada como comparação, inoculadas com 19 estirpes de *Rhizobium*, em latas de cerveja, com areia, esterilizadas, em blocos ao acaso, com 3 repetições.

Algumas espécies mostraram-se altamente, específicas como a sesbânia (Faboideae) e outras altamente promíscuas como, ébano, entada, acácia (Mimosoideae) e mulungú (Faboideae). Quanto às estirpes, algumas mostraram-se específicas como Pd-2 (isolada de pitecelóbio), Am-2 (de acácia), Al-2, Al-4 (de ébano), Es-1 (de mulungú), BR-23 (de estilosante), Pr-1 (de vinhático do campo), e Vr-4 (de sombreiro); outras bem promíscuas como Ml-1 (de quebra-foice), Pp-4 (de angico) e outras mostraram especificidade intermediária, como, Am-1, X-26 e X-18, isoladas de acácia e de sabiá, respectivamente.

A estirpe que apresentou atividade específica mais alta foi a Pp-4 (com a espécie quebra-foice) com 155,00 n-moles de C_2H_4 /h/mg de nódulos, seguida das estirpes BR-23 (com estilosante), M1-1 (com algaroba), Am-1 (com estilosante), L1-7 (com leucena) e Sm-1 (com mulungú). A estirpe Es-3 foi a que conseguiu maior peso médio de nódulos (101,67 mg, com entada), mas com uma atividade específica muito baixa (5,00 n-moles de C_2H_4 /h/mg de nódulos).

No laboratório, foram realizados 3 ensaios com 54 estirpes de *Rhizobium*, sendo o 1º em placas de Petri com meio 79 com manitol, riscando-se as placas com a alça de platina, a fim de que as estirpes fossem testadas quanto à pureza e observados a forma, tamanho, aspecto e tempo de aparecimento das colônias. As estirpes, cujo tempo de aparecimento variava de 24 a 72 horas foram consideradas de crescimento rápido, enquanto as que apareciam depois de 72 horas de repicadas, foram consideradas de crescimento lento. As estirpes de crescimento rápido normalmente formaram mais muco do que as de crescimento lento. O aspecto das colônias pouco variou. Algumas eram mais planas, outras um pouco convexas, mas todas apresentaram bordos lisos. Quanto ao tamanho, depois de 48 horas do aparecimento, as colônias variavam de 0,5 a 2 mm de diâmetro, para as estirpes de crescimento lento e de 1 a 4 mm de diâmetro para as de crescimento rápido. O segundo ensaio foi feito em tubos com meio 79 sólido, inclinado, a fim de se observar o uso de 8 fontes de C pelas 54 estirpes e o seu efeito sobre o pH final do meio.

O melhor crescimento foi obtido com manitol e o cresci-

mento mínimo com maltose e succinato de sódio. Com exceção das estirpes Ee-1, Ee-3 (isoladas de enterolóbio) que nada cresceram, as restantes tiveram um crescimento ruim a regular nos tubos testemunhas, mostrando que usaram o etanol do indicador (azul de bromotimol) do meio, como fonte de C.

O terceiro ensaio, foi também em tubos de ensaio com leite-litmus, em duas repetições, a fim de se observar a reação e a formação, ou não, de zona de soro com as 54 estirpes usadas nos testes anteriores.

De acordo com o comportamento nesses ensaios, as estirpes foram divididas em 3 grupos a saber: grupo I, abrangendo as estirpes: M1-1, M1-2, M1-3 (isoladas de *Mimosa laticífera*), Sm-1, Sm-2 (isoladas de *Sesbania marginata*), BR-23 (isolada de *Stylosanthes*), as quais, tiveram um crescimento bom a abundante com galactose, dextrose, arabinose, maltose, manitol, xilose e sacarose, tornaram alcalino o pH final do meio e em leite-litmus alcalinizaram o meio e não formaram zona de soro. O aparecimento das colônias se deu entre 24 e 72 h, por isso, as estirpes foram consideradas de crescimento rápido, com exceção da BR-23 que é de crescimento lento; grupo II, abrangendo as estirpes: Pj-1, Pj-2, Pj-3 (isoladas de *Prosopis juliflora*), Al-2, Al-3, Al-4 (isoladas de *Albizzia lebbek*), Ll-2, Ll-7, Ll-10 (isoladas de *Leucaena-leucocephala*), Pd-1, Pd-2 (isoladas de *Pithecellobium dulce*), Vr-1, Vr-2, Vr-4 (isoladas de *Vigna recemosa*), Mi-1, Mi-2, Mi-3 (isoladas de *Machaerium incorruptibile*), Ld-1, Ld-2, Ld-3 (isoladas de *Lonchocarpus discolor*), Dm-1, Dm-3 (isoladas de *Dimorphandra mollis*), Cc-1, Cc-2, Cc-4 (isoladas de (*Cassia ca-*

lycioides), F-310 (isolada de *Phaseolus vulgaris*), as quais são de crescimento rápido, tornam ácido o pH final do meio com todas as fontes de C, com exceção do meio com succinato. As estirpes desse grupo se desenvolveram melhor em galactose, dextrose, manitol e xilose. Em leite-litmus, a maioria das estirpes acidificou o meio e formou uma zona de soro. Uma das exceções foram as estirpes Pd-1, Pd-2 que apresentaram reação alcalina, mas formaram zona de soro. O aparecimento das colônias se deu entre 24 e 72 h. e grupo III, abrangendo as estirpes: Pp-2, Pp-3, Pp-4, Pp-7 (isoladas de *Pintadenia peregrina*), Ep-1, Ep-2, Ep-3 (isoladas de *Entada polyphylla*), Ee-1, Fe-2, Ee-3 (isoladas de *Enterolobium ellipticum*), X-13, X-18, X-26 (isoladas de *Mimosa caesalpiniiifolia*), Am-1, Am-2, Am-3 (isoladas de *Acacia mollissima*), Pr-1, Pr-2, Pr-3 (isoladas de *Plathymenia reticulata*), Es-1, Es-2, Es-3 (isoladas de *Erythrina speciosa*), divididas em subgrupos a saber: o primeiro subgrupo, com as estirpes de crescimento rápido, as quais acidificam o meio com galactose, dextrose, arabinose e xilose e o alcalinizam com maltose, manitol, succinato e sacarose e o segundo subgrupo, incluindo estirpes de crescimento lento, as quais tiveram um comportamento idêntico ao primeiro subgrupo com todas as fontes de C.

Desses 3 grupos, foram escolhidas 10 estirpes, a fim de se examinar a forma dos flagelos, tentando-se, assim, observar as afinidades entre as estirpes. Com exceção da estirpe X-13 (de sabiá) que apresentou flagelação lofotríquia, as restantes, tanto as de crescimento rápido: Pp-2, Mi-1, Sm-1, L1-7, Al-2 (isoladas de angico, jacarandá, sesbânia, leucena e ébano,

respectivamente), como as de crescimento lento: Ep-2 e Pr-3 (isoladas de entada e de platimênia) apresentaram flagelação monotríquia. Duas estirpes M1-1 (isolada de quebra-foice) e BR-23 (de estilosante) não flagelaram.

7- ABSTRACT

In two greenhouse experiments and four experiments in the laboratory the nodulation pattern and growth behaviour of *Rhizobium* strains isolated forest species were studied.

The greenhouse experiments were carried out in pots with sand. Three inoculation treatments were used:

- a - soil from the place of origin of the seed;
- b - group 1 of *Rhizobium* strains;
- c - group 2 of *Rhizobium* strains.

Per cent nodulation was distributed as follows:

Mimosoideae - 93%

Faboideae - 78%

Caesalpinioideae - 5%

A relationship was found between the shape of the nodules and the subfamily, independently of what the inoculated strains was.

The Mimosoideae subfamily had choral shaped nodules, except for "barbatimão". The Faboideae subfamily had spherical nodules. Only one plant of the Caesalpinioideae subfamily was nodulated, and the nodules were spherical.

The color of the roots was characteristic for each species. However, there was no relationship between the color of the roots and presence or absence of nodules.

Cross inoculation was made between 11 forest species and one forage species. Nineteen *Rhizobium* strains were used.

Some of the legume species studied such as "sesbânia" (Fabaceae) showed high specificity, while others were highly promiscuous, such as "ébanó, entada, acácia" (M) and "mulungú" (F).

Some *Rhizobium* strains, such as Pd-2, Am-2, Al-2, Al-4, Es-1, BR-23, Pr-1, Vr-4 (isolated from "pitécelóbio, acácia, ébanó, mulungú, estilósante, vinhático-do-campo" and "sombreiro", respectively) were highly specific, while others, such as Ml-1, Pp-4 (isolated from "quebra-foice" and "angico", respectively) were highly promiscuous. The remaining strains showed an intermediary level of specificity (isolated from "acácia" and "sabiá").

The highest specific activity of nitrogenase was found for the symbiosis between the Pp-4 *Rhizobium* strain and the "quebra-foice" legume (155,00 n-moles C_2H_4 /h/mg dry nodules).

The E_3 x "entada" symbiosis nodulated most abundantly (101,67 mg dry weight nodules) but had the lowest specific activity (5,00 n-moles C_2H_4 /h/mg dry nodules).

Fifty four *Rhizobium* strains were studied for morphological characteristics in culture medium. Thirty eight out of the 54 were considered as fast growing (colonies appeared after up to 72 hours) while the 16 others were considered as slow gro-

wing (colonies appeared later than after 72 hours).

The fast growing strains generally showed more mucus than the slow growing ones. There was little difference in the aspect of the colonies. All of them had smooth border some were flat, and some convex.

As for the carbon source, the best growth of the 54 species was obtained with mannitol, and the minimum growth was observed with maltose and Na-succinate. Except for two strains isolated from "vinhático-liso" that had no growth at all, all the others showed a high to fair growth in a medium where only bromothimol blue was used. This was thought to indicate that the ethanol present in the bromothimol blue medium was used up as a carbon source.

In accordance with the use of the several carbon sources (eight) used, the *Rhizobium* strains were divided into three groups.

A study of acid and serum production for the 54 *Rhizobium* strain in litmus milk, showed the *Rhizobium* strains to be dividial into those 3 groups:

a - Turnes litmus milk medium alkaline and does not produce a serum zone. Those were the "quebra-foice", "sesbânia" and "estilosante" strains. Except for the estilosante's strain, all other strains in this group were fast growing.

b- Acidifies litmus milk and produces the serum zone. In this group the strains were fast growing. Those were the "algaroba, ébano, leucena , pitecelóbio, sombreiro, jacarandá, catinga-de-barrão, dimorfandra, cássia and feijão" strains.

c- These strains were divided into two subgroups: the first subgroup contained the fast growing strains (isolated from "angico" and "sabiá"), they acidified the litmus milk and produced serum zone. The second subgroup contained the slow growing strains (isolated from "entada, vinhático-liso, acácia negra, vinhático-do-campo and mulungú"). In litmus milk, their behaviour was similar to those of the first group of strains.

Ten strains selected from the 3 groups were studied in respect to flagellation. Strain X-13 (from sabiá) showed lofotrichous flagellation, however, strains isolated from "angico", jacarandá, sesbânia, leucena, ébano" (fast growing), "entada and vinhático-do-campo" (slow growing) showed monotrichous flagellation. Strains isolated from "quebra-foice and estilosante" were not flagellated.

8 - BIBLIOGRAFIA

- Allen, O.N. Inoculate legumes it Pays. Agric. Exp. Station Univ. Wisconsin. 1-16.
- Allen, O. N. & Allen, E.K. 1936. Plants in the subfamily Caesalpinioideae observed to be lacking nodules. Soil Sci. 42: 87-91.
- Allen, O.N. & Allen, E.K. 1939. Root nodule bacteria of some tropical leguminous plants: II. Cross inoculation tests within the Cowpea group. Soil Sci. 47: 63-76.
- Allen, O.N. & Allen, E.K. 1940. Response of peanut plant to inoculation with Rhizobia with special reference to morphological development of the nodules. Bot. Gaz.102: 121-142.
- Allen, O.N. & Allen, E.K. 1947. A survey of nodulation among leguminous plants. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 12: 203-208.
- Allen, E.K. & Allen, O.N. 1961. Nitrogen fixation. The scope of nodulation in the Leguminosae. Rec. Adv. Bot. 7: 585-588.
- Allen, O.N. & Baldwin, I.L. 1954. Rhizobia-legume relationships. Soil Sci. 78: 415-427.
- Axelrod, D.I. 1958. Evolution of the Madro-Tertiary Geoflora. Bot. Rev. 24: 433-509.

- Bailey, R.W., Greenwood, R.M. & Criag, A. 1971. Extracellular polysaccharides of *Rhizobium* strains associated With Lotus species. J. Gen. Microbiol. 65: 315-325.
- Bañados, L.L. & Fernandez, W.L. 1954. Nodulation among the Leguminosae. Philipp. Agric. 37: 529-533.
- Barrios, S. & Gonzalez, V. 1971. Rhizobial symbiosis on Venezuelan savannas. Plant & Soil. 34: 707-719.
- Barroso, J.L. 1946. Chaves para a determinação de gêneros indígenas e exóticos das dicotiledoneas no Brasil. 2º ed. 1: 62-103. Serv. Flor. M.A.
- Beadle, N.C.W. 1964. Nitrogen economy in arid and semi-arid plant communities. Proc. Linn. Soc. N.S.W. 89: 273-286.
- Beijerinck, M.W. 1888. Die Bacterien der Papilionaceen-Knöllchen. Bot. Ztg. 46: 725-735 (citado por Carrol, 1934).
- Bentham, G. 1859-1876. Leguminosae. Flora Brasiliensis I, II, III. In: Martius.
- Bergersen, F.J. 1968. The symbiotic state in legume root nodule studies with the soybean system. Trans. IX Intern. Congr. Soil. Sci. 2: 49-63.
- Bergersen, F.J. & Goodchild, D.J. 1973. Aeration pathways in soybean root nodules. Aust. J. Biol. Sci. 26: 729-740.
- Bergey's, D.H. 1934. Family II. Rhizobiaceae Conn. 1938. Manual of determinative bacteriology. 4ª ed. 285-288. Baltimore.
- Bonnier, C. 1957. Symbiose Rhizobiun-légumineuses en région équatoriale. Inst. Nat. Etude Agron. Congo Belga. Ser. Sci. 72: 1-77.
- Bonnier, C. 1960. Symbiose *Rhizobium* Legumineuses. Aspects Par-

- ticuliers aux régions Tropicales. Ann. Inst. Past. 98 (4): 527-556.
- Bonnier, C. & Brakel, J. 1969. Lutte Biologique Contre la Faim. J. Duculat, S.A. Gembloux.
- Bonnier, C. & Brakel, J. 1970. Problème spécifique des légumineuses tropicales. In: As leguminosas na Agricultura Tropical, 28-51. An. V Reun. Lat. Amer. Rhiz. Rio de Janeiro.
- Braga, R. 1953. Plantas do Nordeste Especialmente do Ceará. Imp. Univ. Fortaleza.
- Burkart, A. 1952. Las Leguminosas Argentinas Silvestres y Cultivadas. 2^a ed. Acme. Ag. - Buenos Aires.
- Burris, R.M., Phelps, A.S. & Wilson, J.B. 1942. Adaptations of *Rhizobium* and *Azotobacter*. Soil. Sci. Soc. Amer. Proc. 7: 272-275.
- Burton, J.C. 1952. Host specificity among certain plants in the cowpea cross inoculation group. Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 16: 356-358.
- Bushnell, O.A. & Sarles, W.B. 1937. Studies on the root nodule bacteria of wild leguminous plants in Wisconsin. Soil Sci. 44: 409-423.
- Campêlo, C.R. 1970. Família Leguminosae. In: Taxonomia Botânica. 1: 25-38. Depto. Biol. Veg. U.F.R.R.J.
- Campêlo, A.B. & Campêlo, C.R. 1970. Eficiência da inoculação cruzada entre espécies da subfamília Mimosoideae. Pesq. Agrop. Bras. 5: 333-337.

- Campêlo, A.B. & Campêlo, C.R. 1972. Eficiência da inoculação em essências florestais leguminosas. An. XXIII Congr. Nac. Bot. 273-279.
- Campêlo, A.B. & Dobereiner, J. 1969. Estudo sobre inoculação cruzada de algumas leguminosas florestais. Pesq. Agrop. Bras. 4: 67-72.
- Carrol, W.R. 1934. A study of *Rhizobium* species in relation to nodule formation on the roots of Florida legumes. Soil Sci. 37: 117-135 e 227-257.
- Coaldrake, J.E. 1962. The nitrogen of natural plant communities. Bull. 46, Commw. Bur. Past. Field Crops. 35-42.
- Conklin, M.E. 1936. Studies of the root nodule organisms of certain wild legumes. Soil Sci. 41. 167-185.
- Corby, H.D.L. 1971. The shape of leguminous nodules and the colour of leguminous roots. Plant & Soil Spec. Vol. 305-314.
- Corby, H.D.L. 1974. Systematic implications of nodulation among Rhodesian legumes. *Kirkia* 9: 301-330.
- Dart, P.J. 1974. The Infection Process. In: The Biology of Nitrogen Fixation, A. Quispel (ed.) Ch. 11-1: 381-429.
- Dart, P.J., Day, J.M. & Harris, D. 1972. Assay of nitrogenase activity by acetylene reduction. In use of isotopes for study of fertiliser utilisation by legume crops. Soil Microbiol. Depart. Rothamsted Exp. Sta. Harpenden, Herts, 85-100.
- Day, J.M., Neves, M.C.P. & Döbereiner, J. 1975. Nitrogenase activity on the roots of tropical forage grasses. Soil

- Biol. Biochem. 7: 107-112.
- De Ley, J. & Rassel, A. 1965. DNA base composition, flagellation and taxonomy of the genus *Rhizobium*. J. Gen. Microbiol. 41: 85-91.
- De Souza, D.I.A. 1966. Nodulation of Indigenous Trinidad legumes. Trop. Agric. Trin. 43: 265-267.
- Diatloff, A. 1973. Leucaena Needs Inoculation. Qd. Agric. J. 99: 642-644.
- Difco Manual. 1953. Difco Lab. 9^a ed., Detroit, Michigan, p. 192-193 e 296.
- Dilworth, M.J & McComb, J.A. 1975. Recent advances in tissue-culture studies of the Legume-*Rhizobium* symbiosis. N_2 Fixation to improve yield in tropical farming System. IITA.
- Döbereiner, J. 1966. Inoculação de sementeiras de sabiá. (*M. caesalpiniiifolia*) com *Rhizobium*. I Congr. Panam. Cons. Solos. São Paulo.
- Döbereiner, J. 1967. Efeito da inoculação de sementeiras de sabiá (*M. caesalpiniiifolia*) no estabelecimento e desenvolvimento das mudas no campo. Pesq. Agropec. Bras. 2: 301-305.
- Döbereiner, J. & Campêlo, A.B. 1975. Importance of legumes and their contribution to tropical agriculture. In: Dinitrogen (N_2) Fixation. (a ser editado por R.W.F.), Ch. V-II. Harley, John Wiley & Sons, New York.
- Döbereiner, J., Day, J.M. & Dart, P.J. 1972. Nitrogenase activity and oxygen sensitivity of the *Paspalum notatum*-Azo-

- tobacter paspali* association. J. Gen. Microbiol. 71:103-116.
- Dobereiner, J. & Day, J.M. 1974. Associação de bactérias fixadoras de nitrogênio com raízes de gramíneas. II Reun. Lat. Amer. Trigo. 1-19. Porto Alegre.
- Drets, G.M. de, & Arias, A. 1970. Estudios enzimaticos comparativos en rizobios de crecimiento rapido y de crecimiento lento: In: As leguminosas na Agricultura Tropical, 15-18. An. V Reun. Lat. Amer. Rhiz. Rio de Janeiro.
- Drets, G.M. de, & Arias, A. 1972. Enzymatic basis for differentiation of *Rhizobium* into fast and slow-growing group. J. Bacteriol. 109: 467-470.
- Drets, G.M. de, Arias, A. & Rovira De Cutinella, M. 1974. Fast and slow-growing rhizobia differences in sucrose utilization and invertase activity. Can. J. Microbiol. 20: 605-609.
- Ducke, A. 1939. As leguminosas da Amazonia Brasileira. Ser. Flor. M.A. 170.
- Ducke, A. & Black, G.A. 1953. Phytogeographical notes on the Brazilian Amazon. An. Acad. Bras. Ciênc. 25: 1-46.
- Engler's, A. 1964. Fam. Leguminosae (Fabaceae) In: Syllabus Der Pflanzenfamilien. II Band. Gebröder Borntraeger. 221-240. Berlin. Nikolassae.
- Fahraeus, G. & Ljunggren, H. 1959. The possible significance of pectic enzymes in root infection by nodule bacteria. Physiol. Plantarum. 12: 145-153.
- Foury, A. 1950. Les légumineuses fourragères au Maroc. Les Ca-

- hiers de la Rech. Agron. Rabat. Morocco, 3(1):25.
- Frank, B. 1879. Ueber die Parasiten in der Wurzelanschwellung der Papilionaceen. Bot. Ztg. 37: 377-388 (Citado por Carroll 1934).
- Fred, E.B. & Waksman, S.A. 1928. Yeast extract-mannitol agar. Laboratory Manual of general microbiology, McGraw-Hill-Book Co. Inc. New York. 145.
- Fred, E.B., Baldwin, I.L. & McCoy, E. 1932. Root nodule bacteria and leguminous plants. Univ. Wisconsin, Madison, Stud. Sci. 5:343.
- Galli, F. 1958. inoculações cruzadas com bactérias dos nódulos de leguminosas tropicais. Rev. Agric. 33: 139-150.
- Galli, F. 1959. Caracteres culturais das bactérias dos nódulos de algumas leguminosas tropicais. An. Esc. Sup. Agricultura Luis de Queiroz. 16: 113-122.
- Gibson, A.H. 1974. Limitations to N_2 fixation by legumes. Abst. Intern. Symp. Nit. Fix. Washington. 33.
- Graham, P.H. 1963. Vitamin requirements of root nodule bacteria. J. Gen. Microbiol. 30: 245-248.
- Graham, P.H. 1964a. Studies on the utilization of carbohydrates and Krebs cycle intermediates by rhizobia using an agar plate method. Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol. 30: 68-72.
- Graham, P.H. 1964b. The application of computer techniques to the taxonomy of the root-nodule bacteria of legumes. J. Gen. Microbiol. 35: 511-517.
- Graham, P.H. & Parker, C.A. 1964. Diagnostic features in the

- characterization of the root-nodule bacteria of legumes. *Plant & Soil*. 20(3) 383-396.
- Graham, P.H. & Hubbell, D. 1974. Interaccion del suelo la planta e el *Rhizobium* em la agricultura. Centro Intern. Agricultura Trop. Univ. Florida, Gainesville. 1-12.
- Gregory, D.W. & Pirie, B.J.S. 1973. Wetting agents for biological electron microscopy. *Journal of microscopy*. 99: 261-265.
- Grobbelaar, N. & Clarke, B. 1972. A qualitative study of the nodulating ability of legume species: List 2. *J. S. Afr. Bot.* 38: 241-247.
- Gundersen, A. 1950. Families of dicotyledons. Chron. Bot. Co. Waltham, Mass.
- Habish, H.A. & Khairi, Sh. M. 1968. Nodulation of legumes in the Sudan: cross inoculation groups and the associated *Rhizobium* strains. *Expl. Agric.* 4: 227-234.
- Harris, J.O., Allen, E.K. & Allen, O.N. 1949. Morphological development of nodules on *Sesbania grandiflora* Poir. with referente to the origin of nodule rootlets. *Am. J. Bot.* 36: 651-661.
- Hellriegel, H. 1886. Welche Stickstoffquellen stehen der Pflanze zu Gebote. *Landw. Vers. Sta.* 33: 464-465 (citado por Carrol, 1934).
- Hellriegel, H. & Wilfarth, H. 1888. Untersuchungen über die stickstoff-Nahrung der Gramineen und Leguminosen. *Beil. Ztschr. Ver. Rubens.* 1-234 (citado por Carrol, 1934)
- Henzell, E.F. & Norris, D.O. 1962. Processes by which nitrogen is added to the soil/plant system: 1-18. In: A review of

- nitrogen in the tropics with particular reference to pastures. Bull. 46, Commw. Bur. Past. Field Crops. Hurley, Berkshire.
- Hiltner, L. 1900. Ueber die ursachen, welche die grosse, zahl, stellung und workung der wurzel-knollchen der leguminosen bedingen. Arb. K. Gesundh. Biol. Abt. 1: 177-222.
- Humphrey, B.A. & Vincent, J.M. 1959. Extracellular polysaccharides of *Rhizobium*. J. Gen. Microbiol. 21: 477.
- Humphrey, B.A., Edgley, M. & Vincent, J.M. 1974. Absence of mannose in the extracellular polysaccharide of fast-growing Rhizobia. J. Gen. Microbiol. 81: 267-270.
- Jackson, B.D. & Hooker, L.D. 1946. Index Kewensis Plantarum Phanerogamarum. Oxford Univ. Press, London. 2: 155.
- Ishizawa, S. 1955. Studies on the root-nodule bacteria of leguminous plants. J. Soil. Sci. Manure. Japan. 26:31-32.
- Ishizawa, S. 1972. Root nodule bacteria of tropical legumes. Japan Agric. Res. Quart. 6: 199-211.
- Jacobson, H.G.M., Swanson, C.L.W. & Smith, E. 1948. Effect of various fertilizer cations and anions on soil reaction, leaching, nitrification of urea and related characteristics in an uncropped soil. Soil Sci. 65: 437-460.
- Jensen, H.L. 1967. Mutual host plant relationships in two groups of legumes root nodule bacteria (*Rhizobium* sp.) Arch. f. Mikrobiol. Ed. 59: 174-179.
- Johnson, M.D. & Allen, O.N. 1952. Cultural reactions of rhizobia with special reference to strains isolated from *Sesbania* species. Anton. van Leeuwenhoek, J. Microbiol.

- Serol. 18: 1-12.
- Kidby, D.K. & Goodchild, D.J. 1966. Host influence on the ultrastructure of root nodules of *Lupinus luteus* and *Ornithopus sativus*. J. Gen. Microbiol. 45: 147-152.
- Lange, R.T. & Parker, C.A. 1960. Nodulation patterns on Legmes. Nature. 186: 178-179.
- Ledoux, P. & Lobato, R.C. 1968. Contribuição ao estudo bio-ecológico de *Cassia grandis* L. F. (Leguminosae). Investigações de fitogeografia e de ecologia experimental nas savanas equatoriais do Amapá. Ciênc. Cult. 20(2): 502-503.
- Leifson, E. 1960. Atlas of bacterial flagellation. Acad. Press. Inc. New York. 171.
- Leonard, L.T. 1923. Nodule production kinship between the soybean and the cowpea. Soil Sci. 15: 277-283.
- Lillich, T.T. & Elkan, G.H. 1968. Evidence countering the role of polygalacturonase in invasion of root hairs of leguminous plants by *Rhizobium* spp. Can. J. Microbiol. 14: 617-625.
- Ljunggren, H. 1961. Transfer of virulence in *Rhizobium trifolii*. Nature Lond. 191: 623.
- Ljunggren, H. & Fahraeus, G. 1961. The role of polygalacturonase in root hair invasion by nodule bacteria. J. Gen. Microbiol. 26: 521-528.
- Masefield, G.B. 1958. Some factors affecting nodulation in the tropics, 201-215. In: Hallsworth, E.G. (ed.), Nutrition of the legumes. Acad. Press. New York.
- Murad, J.E., Gazzinelli, N., Santana, M., Lacombe, O. & Forti-

- ni, L.G. 1968. Propriedades farmacológicas de uma planta do Cerrado a *Dimorphandra mollis* Benth. *Ciência e Cultura* 20(2): 309-310.
- Norris, D.O. 1956. Legumes and the *Rhizobium* symbiosis. *Emp. J. Exp. Agric.* 24: 247-270.
- Norris, D.O. 1958. Lime in relation to the nodulation of tropical legumes, p. 164-182. In: *Nutrition of the legumes*, Hallsworth, E.G. (ed.) Acad. Press. New York.
- Norris, D.O. 1959. Legume bacteriology in the tropics. *J. Aust. Inst. Agric. Sci.* 25: 202-207.
- Norris, D.O. 1965. Acid production by *Rhizobium*. A unifying concept. *Plant & Soil.* 22: 143-166.
- Norris, D.O. 1967. The intelligent use of inoculants and lime pelleting for tropical legumes. *Trop. Grassl.* 1: 107-121.
- Norris, D.O. 1969. Observations on the nodulation status of rainforest leguminous species in Amazonia and Guyana. *Trop. Agric. Trin.* 46: 145-151.
- Norris, D.O. & t'Mannetje, L. 1964. The symbiotic specialization of African *Trifolium* spp. in relation to their taxonomy and their agronomique use. *East. Afr. Agric. & For. J.* 29: 214-235.
- Nutman, P.S. 1946. Genetical factors concerned in the symbiosis of clover and nodule bacteria. *Nature.* 157: 463-465.
- Nutman, P.S. 1952. A discussion on symbiosis involving microorganisms. Host factors influencing infection and nodule development in leguminous plants. *Proc. Roy. Soc. (Lond.) B,* 139: 176-185.
- Nutman, P.S. 1956. The influence of the legume in root-nodule

- symbiosis. A comparative study of host determinants and functions. Biol. Rev. 31: 109-151.
- Nutman, P.S. 1965. Symbiotic nitrogen fixation. In: Soil Nitrogen, 360-383 (ed. Bartholomew & Clark) Amer. Soc. Agron. Inc. Publ. Madison, Wisconsin.
- Nutman, P.S. 1970. The physiology of root-hair infection. In: As leguminosas na Agricultura Tropical. 66-74. An.V Reun. Lat. Amer. Rhiz. Rio de Janeiro.
- Oliveira, B. 1969. Exóticas e Nativas na Problemática Florestal Brasileira. IBGE Bol. Geogr., 213: 89-107.
- Pagan, J.D. Child, J.J., Scowcroft, W.R & Gibson, A. H. 1975. Nitrogen fixation by *Rhizobium* cultured on a defined medium. Nature, 256: 406-407.
- Pankhurst, C.E. 1970. A taxonomic study of some acid and non-acid producing strains of *Lotus* rhizobia. Rhiz. Newsl. 15 (1): 40-43.
- Parker, C.A. 1968. On the evolution of symbiosis in legumes. In: Festschrift til Hans Laurits Jensen. Publ. Gadg. Niel. Bog. Lemvig. Denmark. 107-116.
- Pochon, J. & Barjac, B. de, 1958. Traité de Microbiologie des Sols. 103-130.
- Postgate, J.R. 1974. New advances and future potential in biological nitrogen fixation. J. Appl. Bact. 37: 185-202.
- Robinson, A.C. 1969. Competition between effective and ineffective strains of *Rhizobium trifolii* in the nodulation of *Trifolium subterraneum*. Aust. J. Agric. Res. 20: 827-842.

- Rocha, G.L. da, Werner, J.C., Mattos, H.B. de, & Pedreira, J. V.S. 1970. As leguminosas e as pastagens tropicais. In: As leguminosas na Agricultura Tropical. 1-27. Anais V Reun. Lat. Amer. Rhiz. Rio de Janeiro.
- Rothschild, D.I. 1963. Anatomia del nódulo radical de algunas leguminosas cultivadas. Rev. Inst. Mud. Bot. 3(1): 1-32.
- Rothschild, D.I. 1967. Anatomia del nódulo radical de origem bacteriano en "Adesmia" DC. (Leguminosae). Rev. Mus. Arg. Cienc. Nat. 3: 161-184.
- Rothschild, D.I. 1970. Nodulación en leguminosas, subtropicales de la flora Argentina. Rev. Mus. Arg. Cienc. Nat. Bot. 9: 267-285.
- Sears, O.H. & Carrol, W.R. 1927. Cross-inoculation with cowpea and soybean nodule bacteria. Soil Sci. 24: 413-419.
- Senn, H.A. 1938. Chromosome number relationships in the leguminosae. Bibliog. Genet. 12: 175-336.
- Solheim, B. & Raa, J. 1971. Evidence countering the theory of specific induction of pectin-degrading enzymes basis for specificity in *Rhizobium*-Leguminosae associations. Plant & Soil. 35: 275-280.
- Stamford, N.P. 1971. Nódulos pretos no estudo da inoculação cruzada e da competição entre estirpes de *Rhizobium* em leguminosas forrageiras tropicais. Tese para o grau de *Magister Scientiae*. 1-112. UFRRJ.
- Trinick, M.J. 1963. Specificity in the *Rhizobium* symbiosis of *Leucaena glauca*. Benth. Rhiz. Newsl. 8: 135-136.
- Trinick, M.J. 1965a. Effectiveness of nodulation of *Vigna*

- sinensis and other tropical legumes with fast growing rhizobia isolated from *Leucaena leucocephala*. Rhiz. Newsl. 10(2): 164-169.
- Trinick, M.J. 1965b. *Medicago sativa* nodulation with *Leucaena leucocephala*. Root-nodule bacteria. Aust. J. Sci. 27:263-264.
- Trinick, M.J. 1968. Nodulation of tropical legumes. I - Specificity in the *Rhizobium* symbiosis of *Leucaena leucocephala*. Expl. Agric. 4: 243-253.
- Tutin, T.G. 1958. Classification of the legumes, p. 3-14. In: Nutrition of the legumes, Hallsworth, E. G. (ed.), Acad. Press, New York.
- Vincent, J.M. 1967. Symbiotic specificity. Aust. J. Sci. 29(7): 192-197.
- Vincent, J.M. 1970a. The Bacteriology and Serology of *Rhizobium*. I Sem. Met. Plan. Pesq. Leg. Trop. 2-8. Rio de Janeiro.
- Vincent, J.M. 1970b. A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. I.B.P. Handbook. 15, Blackwell Scientific Pub. Oxford.
- Vincent, J.M. 1970c. The legume symbiosis. In: As leguminosas na agricultura tropical, 53-65. V Reun. Lat. Amer. Rhiz. Rio de Janeiro.
- Vincent, J.M. 1974. Root-nodule symbiose with *Rhizobium*. In: The Biology of Nitrogen Fixation. A. Quispel (ed.) Ch. 9: 265-341.
- Vincent, J.M. & Jancey, C.H. 1964. Nutritive requirements of *Lotononis Rhizobium*. Rhiz. Newsl. 9(2): 141-145.

- Waksman, S.A. 1932. Principles of Soil Microbiology. Williams & Wilkins (ed.) Baltimore, 132.
- Wilson, J.K. 1939. Leguminous plants and their associated organisms. Cornell Univ. Agric. Exp. Sta. Mem. 221.
- Wilson, J.K. 1944. Over hundred reasons for abandoning the cross inoculation groups of the legumes. Soil Sci. 58: 61-69.

Quadro 1 - Ocorrência de nodulação em 43 espécies florestais com 3 tratamentos de inoculação.

Sub-família	Tribó	Espécies	Cordafraiz	Nodulação								
				Inoculação com solo		Inoculação com grupo 1		Inoculação com grupo 2				
				Cor	Forma	Cor	Forma	Cor	Forma			
Mimosoideae	Acácia negra	branca	rosa coral-oblonga	3	rosa coral	3	branca coral	1	branca coral	3	branca coral	1
"	Adenanthereae Carolina	branca	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0
"	Adenanthereae Entada	castanha	tijolo coral	21	tijolo coral	19	tijolo coral-oblonga	36	tijolo coral-oblonga	19	tijolo coral-oblonga	36
"	Adenanthereae Angico	castanha	-	0	tijolo coral	4	-	0	-	4	-	0
"	Adenanthereae Algaroba	amarela	-	0	rosa coral	1	tijolo coral	9	tijolo coral	1	tijolo coral	9
"	Adenanthereae Barbatimão	branca	branca esférica	1	-	0	rosa	2	rosa esférica	0	rosa esférica	2
"	Ingese Zbano oriental	branca	-	0	-	0	rosa coral	4	rosa coral	0	rosa coral	4
"	Ingese Vinhático liso	br. amarela	-	0	rosa coral	5	-	0	-	5	-	0
"	Ingese Pitacelóbio	br. parda	-	0	tijolo coral-oblonga	9	rosa	1	rosa coral	9	rosa coral	1
"	Ingese Pitacelóbio	amarela	-	0	-	0	rosa	3	rosa coral-oblonga	0	rosa coral-oblonga	3
"	Mimosese Leucena	amarela	-	0	-	0	rosa	3	rosa coral	0	rosa coral	3
"	Mimosese Sabiá	castanha	-	0	-	0	rosa	6	rosa coral	0	rosa coral	6
"	Mimosese Quebra-foice	amarela	branca coral	1	tijolo coral	2	branca coral	1	branca coral	2	branca coral	1
"	Piptadenieae Vinhático do campo amarela	amarela	tijolo coral-oblonga	7	tijolo coral-oblonga	13	rosa	4	rosa coral-oblonga	13	rosa coral-oblonga	4
Faboideae	Astragaleae Sebânia	amarela	rosa esférica	2	-	0	-	0	-	0	-	0
"	Corculleae Aeschynorene	br. parda	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0
"	Dalbergieae Jacarandá	cinza-escuro	-	0	branca esférica	5	-	0	-	5	-	0
"	Dalbergieae Catunga de barrão	castanha	rosa	3	-	0	rosa	2	rosa esférica	0	rosa esférica	2
"	Dalbergieae Flatipódio	branca	branca esférica	6	branca esférica	13	branca	5	branca	13	branca	5
"	Phaseoleae Mulungú	cinza	tijolo esférica	5	branca esférica	13	rosa	35	rosa esférica	13	rosa esférica	35
"	Phaseoleae Mulungú	castanha	rosa	3	-	0	rosa	26	rosa esférica	0	rosa esférica	26
"	Phaseoleae Sombreiro	br. amarela	rosa	10	-	0	rosa	5	rosa esférica	0	rosa esférica	5
"	Sophoreae Sucupira mirim	br. amarela	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0

Os dados são médias de 2 repetições.

A cor da raiz não variou com o tratamento.

Com exceção da espécie *Sclerolobium aureum* que apresentou 2 nódulos brancos quando inoculada com o grupo 2 de estirpes de *Phizobium*, nenhuma *Ceasalpinoideae* (20 espécies examinadas) nodulou.

O tamanho dos nódulos variou de 1-9 mm de diâmetro nos nódulos esféricos.

Grupo 1 - estirpes isoladas de: angico, sabiá, mulungú e vinhático liso.

Grupo 2 - estirpes isoladas de: sombreiro, jacarandá, leucena, ébano, algaroba, louchoarpo, cássia e pitacelóbio.

Para as espécies não noduladas, vide Material e Métodos.

Quadro 1a - Comparação da nodulação entre leguminosas florestais examinadas para esta tese e outras espécies leguminosas pesquisadas por Allen & Allen (1961).

Sub-família	Referência	Nº examinado Gêneros	Espécies	% de espécies noduladas
Mimosoideae	Allen & Allen	21	146	87
	Florestais	12	14	93
Caesalpinioideae	Allen & Allen	40	115	24
	Florestais	11	20	5
Faboideae	Allen & Allen	182	1024	93
	Florestais	8	9	78

Quadro 1b - Ocorrência de nodulação em 17 espécies florestais, examinadas no campo.

Espécies	Nodulação
Carolina	-
Ébano oriental	+
Vinhático liso	-
Sabiá	+
Angico	+
Mulungú	-
Mulungú	+
Catinga de barrão	+
Sesbânia	+
Unha de vaca	-
Pau brasil	-
Sibipiruna	-
Barba de barata	-
Chuva de ouro	-
Flamboyant	-
Tamboril	-
Tamarindo	-

+ nodulada
- sem nódulo

Quadro 1c - Ocorrência de nodulação em Leguminosas florestais.

Sub-família	Espécies							
	Noduladas		N . ncúladas		Tot. examinados		% esp. noduladas	
	Vasos	Campo.	Vasos	Campo	Vasos	Campo		
Mimosoideae-12 gêneros em 5 tri- bos.	13	3	1	2	14	5	93	60
Faboideae-8 gê- neros em 5 tribos.	7	3	2	1	9	4	78	75
Caesalpinioideae 11 gêneros em 5 tribos.	1	0	19	8	20	8	5	0

Quadro 2 - Avaliação da atividade específica do N₂-ase em nódulos de 11 espécies florestais e uma forrageira em inoculação cruzada com 19 estirpes de *Rhizobium*.

Espécies	Estirpe	Cor da raiz	Nodulação				Atividade específica nmoles de C ₂ H ₄ /h/ mg de nódulos.
			Cor	Forma	Número planta	Peso seco mg/planta	
Acácia negra	Am.1	branca	rosa	coral	4	9	21
Ébano oriental		branca	rosa	coral	20	43	39
Entada		castanha	rosa	coral	15	65	44
Leucena		amarela	-	-	0	0	0
Sabiá		castanha	-	-	0	0	0
Quebra-foice		amarela	-	-	0	0	0
Angico		castanha	-	-	0	0	0
Pitacelóbio		br.parda	-	-	0	0	0
Algaroba		amarela	-	-	0	0	0
Mulungú		castanha	rosa	esférica	7	49	7
Sesbânia		amarela	-	-	0	0	0
Estilosante		br.parda	rosa	esférica	4	10	122
Acácia negra	Am.2	branca	rosa	coral-oblonga	5	14	6
Ébano oriental		branca	rosa	coral	3	21	5
Entada		castanha	-	-	0	0	0
Leucena		amarela	-	-	0	0	0
Sabiá		castanha	-	-	0	0	0
Quebra-foice		amarela	-	-	0	0	0
Angico		castanha	-	-	0	0	0
Pitacelóbio		br.parda	-	-	0	0	0
Algaroba		amarela	-	-	0	0	0
Mulungú		castanha	-	-	0	0	0
Sesbânia		amarela	-	-	0	0	0
Estilosante		br.parda	-	-	0	0	0
Acácia negra	Al.2	branca	-	-	0	0	0
Ébano oriental		branca	rosa	coral	10	17	9
Entada		castanha	-	-	0	0	0
Leucena		amarela	-	-	0	0	0
Sabiá		castanha	-	-	0	0	0
Quebra-foice		amarela	-	-	0	0	0
Angico		castanha	-	-	0	0	0
Pitacelóbio		br.parda	-	-	0	0	0
Algaroba		amarela	-	-	0	0	0
Mulungú		castanha	branca	esférica	1	2	3
Sesbânia		amarela	-	-	0	0	0
Estilosante		br.parda	-	-	0	0	0
Acácia negra	Al.4	branca	-	-	0	0	0
Ébano oriental		branca	rosa	coral	5	20	11
Entada		castanha	-	-	0	0	0
Leucena		amarela	-	-	0	0	0
Sabiá		castanha	-	-	0	0	0
Quebra-foice		amarela	-	-	0	0	0
Angico		castanha	-	-	0	0	0
Pitacelóbio		br.parda	-	-	0	0	0
Algaroba		amarela	-	-	0	0	0
Mulungú		castanha	rosa	esférica	3	17	5
Sesbânia		amarela	-	-	0	0	0
Estilosante		br.parda	-	-	0	0	0

Os dados são médias de 3 repetições.

Estirpes: Am.1, Am.2 isoladas de Acácia negra.

Al.2, Al.4 isoladas de Ébano oriental.

Continuação: Quadro 2.

Espécies	Estirpe	Cor da raiz	Nodulação				Atividade específica nmoles de C ₂ H ₄ /h/ mg de nódulos.
			Cor	Forma	Número planta	Peso seco mg/ planta	
Acácia negra	Ep.2	branca	branca	coral-oblonga	3	12	3
Ébano oriental		branca	rosa	coral	9	56	46
Entada		castanha	rosa	coral	7	31	77
Leucena		amarela	-	-	0	0	0
Sabiá		castanha	-	-	0	0	0
Quebra-foice		amarela	-	-	0	0	0
Angico		castanha	-	-	0	0	0
Pitecelóbio		br.parda	-	-	0	0	0
Algaroba		amarela	-	-	0	0	0
Mulungú		castanha	-	-	0	0	0
Sesbânia		amarela	-	-	0	0	0
Estilosante		br.parda	-	-	0	0	0
Acácia negra	Ll.7	branca	rosa	coral-oblonga	5	23	6
Ébano oriental		branca	-	-	0	0	0
Entada		castanha	rosa	coral	8	65	52
Leucena		amarela	tijolo	coral	12	30	116
Sabiá		castanha	-	-	0	0	0
Quebra-foice		amarela	-	-	0	0	0
Angico		castanha	-	-	0	0	0
Pitecelóbio		br.parda	-	-	0	0	0
Algaroba		amarela	-	-	0	0	0
Mulungú		castanha	-	-	0	0	0
Sesbânia		amarela	-	-	0	0	0
Estilosante		br.parda	-	-	0	0	0
Acácia negra	X.18	branca	-	-	0	0	0
Ébano oriental		branca	-	-	0	0	0
Entada		castanha	rosa	coral	15	66	53
Leucena		amarela	rosa	coral	2	7	0
Sabiá		castanha	tijolo	coral	10	40	89
Quebra-foice		amarela	rosa	coral	6	19	19
Angico		castanha	-	-	0	0	0
Pitecelóbio		br.parda	-	-	0	0	0
Algaroba		amarela	-	-	0	0	0
Mulungú		castanha	-	-	0	0	0
Sesbânia		amarela	-	-	0	0	0
Estilosante		br.parda	-	-	0	0	0
Acácia negra	X.26	branca	branca	coral	2	9	1
Ébano oriental		branca	-	-	0	0	0
Entada		castanha	-	-	0	0	0
Leucena		amarela	-	-	0	0	0
Sabiá		castanha	branca	coral	7	28	15
Quebra-foice		amarela	rosa	coral	4	25	7
Angico		castanha	branca	coral	2	3	0
Pitecelóbio		br.parda	-	-	0	0	0
Algaroba		amarela	-	-	0	0	0
Mulungú		castanha	-	-	0	0	0
Sesbânia		amarela	-	-	0	0	0
Estilosante		br.parda	-	-	0	0	0

Estirpes: Ep.2 - isolada de Entada

Ll.7 - isolada de Leucena

X.18, X.26 - isoladas de Sabiá.

Continuação: Quadro 2.

Espécies	Estirpe	Cor da raiz	Nodulação				Atividade específica nmoles de C ₂ H ₄ /h/mg de nódulos
			Cor	Forma	Número/ planta	Peso seco mg/planta	
Acácia negra	Ml.1	branca	rosa	coral	1	12	19
Ébano oriental		branca	rosa	coral	2	17	14
Entada		castanha	-	-	5	5	5
Leucena		amarela	branca	coral	3	10	0
Sabiá		castanha	rosa	coral	6	21	20
Quebra-foice		amarela	rosa	coral-oblonga	7	30	41
Angico		castanha	branca	coral	1	4	3
Pitecelóbio		br.parda	-	-	0	0	0
Algaroba		amarela	rosa	coral	1	8	130
Mulungá		castanha	-	-	0	0	0
Sesbânia		amarela	-	-	0	0	0
Estilozante		br.parda	-	-	0	0	0
Acácia negra		Pp.4	branca	rosa	coral-oblonga	14	25
Ébano oriental	branca		rosa	coral	9	36	58
Entada	castanha		rosa	coral	44	74	52
Leucena	amarela		-	-	0	0	0
Sabiá	castanha		-	-	0	0	0
Quebra-foice	amarela		rosa	coral	4	9	155
Angico	castanha		rosa	coral	4	39	68
Pitecelóbio	br.parda		-	-	0	0	0
Algaroba	amarela		-	-	0	0	0
Mulungá	castanha		rosa	esférica	9	32	57
Sesbânia	amarela		-	-	0	0	0
Estilozante	br.parda		branca	esférica	3	8	4
Acácia negra	Pp.2		branca	rosa	coral	3	5
Ébano oriental		branca	-	-	0	0	0
Entada		castanha	rosa	coral	2	13	63
Leucena		amarela	-	-	0	0	0
Sabiá		castanha	rosa	coral	8	18	67
Quebra-foice		amarela	rosa	coral	5	15	58
Angico		castanha	rosa	coral	3	13	28
Pitecelóbio		br.parda	-	-	0	0	0
Algaroba		amarela	-	-	0	0	0
Mulungá		castanha	-	-	0	0	0
Sesbânia		amarela	-	-	0	0	0
Estilozante		br.parda	-	-	0	0	0
Acácia negra		Pd.2	branca	rosa	coral-oblonga	2	10
Ébano oriental	branca		-	-	0	0	0
Entada	castanha		-	-	0	0	0
Leucena	amarela		-	-	0	0	0
Sabiá	castanha		-	-	0	0	0
Quebra-foice	amarela		-	-	0	0	0
Angico	castanha		-	-	0	0	0
Pitecelóbio	br.parda		rosa	coral	10	34	12
Algaroba	amarela		-	-	0	0	0
Mulungá	castanha		-	-	0	0	0
Sesbânia	amarela		-	-	0	0	0
Estilozante	br.parda		-	-	0	0	0

Estirpes: Ml.1 - isolada de Quebra-foice
Pp.4, Pp.2 - isoladas de Angico
Pd.2 - isolada de Pitecelóbio.

Continuação: Quadro 2.

Espécie	Estirpe	Cor da raiz	Nodulação				Atividade específica nmoles de C ₂ H ₄ /h/ mg de nódulos
			Cor	Forma	Número/ planta	Peso seco mg/ planta	
Acácia negra	Pj.1	branca	-	-	0	0	0
Ébano oriental		branca	-	-	0	0	0
Entada		castanha	rosa	coral	7	37	38
Leucena		amarela	-	-	0	0	0
Sabiá		castanha	-	-	0	0	0
Quebra-foice		amarela	-	-	0	0	0
Angico		castanha	-	-	0	0	0
Pitacelóbio		br.parda	branca	coral	2	7	0
Algaroba		amarela	rosa	coral	13	52	49
Mulungú		castanha	rosa	esférica	1	1	22
Sesbânia		amarela	-	-	0	0	0
Estilosante		br.parda	-	-	0	0	0
Acácia negra	Es.1	branca	-	-	0	0	0
Ébano oriental		branca	-	-	0	0	0
Entada		castanha	-	-	0	0	0
Leucena		amarela	-	-	0	0	0
Sabiá		castanha	-	-	0	0	0
Quebra-foice		amarela	-	-	0	0	0
Angico		castanha	-	-	0	0	0
Pitacelóbio		br.parda	-	-	0	0	0
Algaroba		amarela	-	-	0	0	0
Mulungú		castanha	tijolo	esférica	7	31	60
Sesbânia		amarela	-	-	0	0	0
Estilosante		br.parda	rosa	esférica	5	18	44
Acácia negra	Es.3	branca	branca	coral	3	9	5
Ébano oriental		branca	-	-	0	0	0
Entada		castanha	rosa	coral	29	102	5
Leucena		amarela	-	-	0	0	0
Sabiá		castanha	-	-	0	0	0
Quebra-foice		amarela	-	-	0	0	0
Angico		castanha	-	-	0	0	0
Pitacelóbio		br.parda	-	-	0	0	0
Algaroba		amarela	-	-	0	0	0
Mulungú		castanha	rosa	esférica	6	31	31
Sesbânia		amarela	-	-	0	0	0
Estilosante		br.parda	rosa	esférica	6	14	45
Acácia negra	Sm.1	branca	rosa	coral	1	4	16
Ébano oriental		branca	-	-	0	0	0
Entada		castanha	-	-	0	0	0
Leucena		amarela	-	-	0	0	0
Sabiá		castanha	-	-	0	0	0
Quebra-foice		amarela	-	-	0	0	0
Angico		castanha	-	-	0	0	0
Pitacelóbio		br.parda	-	-	0	0	0
Algaroba		amarela	-	-	0	0	0
Mulungú		castanha	rosa	esférica	1	6	112
Sesbânia		amarela	tijolo	esférica	21	105	19
Estilosante		br.parda	-	-	0	0	0

Estirpes: Pj.1 - isolada de Algaroba
 Es.1, Es.3 - isoladas de Mulungú
 Sm.1 - isolada de Sesbânia

Continuação: Quadro 2.

Espécies	Estirpe	Cor da raiz	Modulação				Atividade específica nmoles de C_2H_4 /h/mg de nódulos
			Cor	Forma	Número/ planta	Peso seco mg planta	
Acácia negra	Br.23	branca	-	-	0	0	0
Ébano oriental		branca	-	-	0	0	0
Entada		castanha	rosa	coral	3	17	45
Leucena		amarela	-	-	0	0	0
Sabiá		castanha	-	-	0	0	0
Quebra-foice		amarela	-	-	0	0	0
Angico		castanha	-	-	0	0	0
Pitacelóbio		br.parda	-	-	0	0	0
Algaroba		amarela	-	-	0	0	0
Mulungú		castanha	-	-	0	0	0
Sesbânia		amarela	-	-	0	0	0
Estilosante		br.parda	rosa	esférica	3	13	132
Acácia negra	Pr.1	branca	branca	coral	3	9	8
Ébano oriental		branca	rosa	coral	6	41	42
Entada		castanha	-	-	0	0	0
Leucena		amarela	-	-	0	0	0
Sabiá		castanha	-	-	0	0	0
Quebra-foice		amarela	-	-	0	0	0
Angico		castanha	-	-	0	0	0
Pitacelóbio		br.parda	-	-	0	0	0
Algaroba		amarela	-	-	0	0	0
Mulungú		castanha	-	-	0	0	0
Sesbânia		amarela	-	-	0	0	0
Estilosante		br.parda	-	-	0	0	0
Acácia negra	Vr.4	branca	-	-	0	0	0
Ébano oriental		branca	tijolo	coral	5	85	20
Entada		castanha	-	-	0	0	0
Leucena		amarela	-	-	0	0	0
Sabiá		castanha	-	-	0	0	0
Quebra-foice		amarela	-	-	0	0	0
Angico		castanha	-	-	0	0	0
Pitacelóbio		br.parda	-	-	0	0	0
Algaroba		amarela	-	-	0	0	0
Mulungú		castanha	rosa	esférica	11	39	48
Sesbânia		amarela	-	-	0	0	0
Estilosante		br.parda	-	-	0	0	0

Estirpes: BR-23 - isolada de Estilosante
 Pr.1 - " " Vinhático do campo
 Vr.4 - " " Sombreiro

Quadro 2a - Valores de F Obtidos nas Análises Estatísticas Realizadas em 10 Leguminosas Florestais e 1 Espécie Forrageira.

o	Zbano			Antada			Laucena			Mullungú			Pitacelóbio			Quebra-Peixe			Sabiá			Estilosanta		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c	a	b	c
20,61**	3,28*	4,67**	6,08**	38,37**	3,63*	1,87	10,58**	10,78**	33,72**	6,07**	4,30**	6,06**	16,26	11,05	-	1,77	4,14*	-	-	-	3,22	2,15	2,04	-
-	1,40	1,66	6,63**	1,46	-	2,75	-	-	-	-	-	2,24	2,57	2,97	-	-	-	-	-	-	1,26	2,99	-	-
58,74	2,21	64,69	45,12	1,68	77,92	-	1,54	16,03	87,62	2,09	41,84	95,13	-	-	-	-	-	141,42	-	-	-	-	-	-
38	27	48	58	13	52	52	22	40	43	26	62	66	21	47	-	31	54	90	38	64	73	14	38	139

1 de 12-esse
 , e análise foi realizada com dados transformados em $\sqrt{X + 1}$
 o valor D.V.S. e a estirpe for significativa, isto indica que
 tre duas estirpes apenas.
 ensas com plantas noduladas.

Quadro 3 - Inoculação cruzada entre 19 estirpes de *Rhizobium* e 11 espécies florestais e 1 forrageira.

Espécies	47.1	45.7	41.2	41.4	Sp.2	11.7	X.18	X.26	M.1	Sp.4	Pp.2	P3.2	P3.1	Es.1	Es.3	Sm.1	BR.23	Pt.1	Vr.4
Acácia negra	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+
Zambo oriental	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Zabida	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
Zambona	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sabiá	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Quebra-foice	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Angico	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Piteco lóbio	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Algaroba	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Maluquú	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+
Sesbúfia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Estilo santo	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+

Obs: As estirpes homólogas encontram-se dentro do retângulo.
 + com nódulos
 - sem nódulos

Quadro 4 - Características culturais e morfológicas de 54 estirpes de *Rhizobium* com o uso de 8 fontes de C e reação em leite-litmus.

Origem da estirpe	Estirpe	Galactose		Dextrose		Arabinose		Xilose		Maltose		Sacarose		Manitol		Succinato de Sódio		Testemunha		Colônias - 79 + manitol			Leite-litmus	
		pH	C*	pH	C	pH	C	pH	C	pH	C	pH	C	pH	C	pH	C	pH	C	Tempo de espalhamento	Reação em 48 h após espalhamento	Aspecto	Zona de reação	Ac. Al.
I Quebra-folgo	Q1.1	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	1	X	2	Rp	1-2	planas	-	X
	Q1.2	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	1	X	1	Rp	1-2	brusco-leitosas	-	X
	Q1.3	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	1	X	2	Rp	1-2	"	-	X
	Sm.1	+	3	+	4	+	4	+	4	+	3	+	3	+	4	+	1	X	2	Rp	1-2	"	-	X
	Sm.2	+	3	+	4	+	4	+	4	+	3	+	3	+	4	+	1	X	2	Rp	1-2	"	-	X
	BR-23	+	4	+	4	+	4	+	4	+	3	+	2	+	4	+	1	X	1	L	1	"	-	X
II Algaroba	Pj.1	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	3	+	4	+	3	X	2	Rp	2	pouco elevadas.	-	X
	Pj.2	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	3	+	4	+	3	X	1	Rp	2-3	Br. amarel.	+	+
	Pj.3	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	3	+	4	+	3	X	1	Rp	2	"	+	+
	Al.2	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	3	X	2	Rp	3-4	"	+	+
	Al.3	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	3	X	2	Rp	3-4	"	+	+
	Al.4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	3	X	2	Rp	3-4	"	+	+
	Ll.2	+	3	+	3	+	3	+	3	+	3	+	4	+	3	+	2	X	2	Rp	1-2	plan. br.	+	+
	Ll.7	+	3	+	3	+	3	+	3	+	2	+	3	+	3	+	2	X	2	Rp	1	leitosas	+	+
	Ll.10	+	3	+	3	+	3	+	3	+	3	+	4	+	3	+	-	X	2	Rp	1-2	"	+	+
	Pd.1	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	3	+	4	+	-	-	1	Rp	4	Pouco elev.	+	X
Sombroiro	Vr.1	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	3	+	4	+	3	X	2	Rp	3-4	Br. amarel.	+	X
	Vr.2	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	3	+	4	+	3	X	2	Rp	3-4	"	+	+
	Vr.4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	3	+	4	+	3	X	2	Rp	4	"	+	+
	Mi.1	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	3	+	4	+	3	X	2	Rp	4	"	+	+
Jacarandá	Mi.2	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	3	+	4	+	3	X	2	Rp	3-4	"	+	+
	Mi.3	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	3	+	4	+	3	X	2	Rp	3-4	"	+	+
	Ld.1	+	3	+	3	+	3	+	3	+	2	+	3	+	3	+	1	X	2	Rp	3	"	+	+
Catinga de barrão	Ld.2	+	3	+	3	+	3	+	3	+	2	+	3	+	3	+	1	X	2	Rp	3-4	"	+	+
	Ld.3	+	3	+	3	+	3	+	3	+	2	+	3	+	3	+	1	X	2	Rp	3	"	+	+
	Dm.1	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	3	X	2	Rp	3-4	"	+	+
Dimorfandra	Dm.3	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	3	X	2	Rp	3-4	"	+	+
	Cc.1	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	3	X	1	Rp	3-4	"	+	+
Cassia	Cc.2	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	3	X	1	Rp	3	"	+	+
	Cc.4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	3	X	2	Rp	3-4	"	+	+
Feijão	F.310	+	4	+	4	+	4	+	4	+	4	+	3	+	4	+	3	X	2	Rp	3	"	+	+

Continuação do quadro 4.

Origem da estirpe	Estirpe	Galactose		Dextrose		Arabinose		Miose		Maltose		Sacarose		Manitol		Succinato de Sódio		Testemunha		Colônias - 79 + manitol		Leite-Litmus		
		pH	C*	pH	C	pH	C	pH	C	pH	C	pH	C	pH	C	pH	C	pH	C	Tempo de aparecimento**	Parafino em 48 h após sra. recimento	aspecto	% de reação Ac. Al.	
III Angico	Pp.2	+	3	+	3	+	3	+	3	X	2	X	3	X	4	X	1	X	1	Rp	2	Planas-brancas-leitceas	+	+
	Pp.3	+	3	+	3	+	3	+	3	X	2	X	3	X	4	X	1	X	1	Rp	1-2	"	+	+
	Pp.4	+	3	+	3	+	3	+	3	X	2	X	3	X	4	X	1	X	1	Rp	2	"	-	-
Entada	Pp.7	+	3	+	3	+	3	+	3	X	2	X	3	X	4	X	1	X	1	Rp	2	"	-	-
	Sp.1	+	3	+	3	+	4	+	2	X	3	X	3	X	4	X	1	X	1	L	0,5-1	"	-	-
	Sp.2	+	3	+	3	+	3	+	3	X	2	X	3	X	4	X	1	X	1	L	1	"	-	-
Vinático liso	Sp.3	+	3	+	3	+	4	+	2	X	3	X	3	X	4	X	1	X	1	L	0,5-1	"	-	-
	Sp.1	+	3	+	3	+	3	+	3	X	2	X	3	X	4	X	1	X	1	L	1-2	"	-	-
	Sp.2	+	3	+	3	+	3	+	3	X	2	X	3	X	4	X	1	X	1	L	1-2	"	-	-
Sebia	Sp.3	+	3	+	3	+	3	+	3	X	2	X	3	X	4	X	1	X	1	L	1-2	"	-	-
	X.13	+	4	+	4	+	3	+	4	X	3	X	3	X	4	X	1	X	1	Rp	1-2	"	+	+
	X.18	+	4	+	4	+	4	+	4	X	3	X	3	X	4	X	2	X	2	Rp	1	"	+	+
Acacia negra	X.26	+	4	+	4	+	4	+	4	X	3	X	3	X	4	X	2	X	2	Rp	1-2	"	+	+
	Am.1	+	4	+	4	+	4	+	4	X	2	X	3	X	4	X	1	X	1	L	1-2	"	-	-
	Am.2	+	4	+	4	+	4	+	4	X	2	X	3	X	4	X	1	X	1	L	1	"	-	-
Vinático do campo	Am.3	+	4	+	4	+	4	+	4	X	2	X	3	X	4	X	1	X	1	L	1	"	-	-
	Pr.1	+	3	+	3	+	3	+	3	X	1	X	3	X	4	X	1	X	1	L	0,5-1	"	-	-
	Pr.2	+	3	+	3	+	3	+	3	X	1	X	3	X	4	X	1	X	1	L	0,5-1	"	-	-
Mulungú	Pr.3	+	3	+	3	+	3	+	3	X	2	X	3	X	3	X	1	X	1	L	0,5-1	"	-	-
	Ss.1	+	3	+	3	+	3	+	3	X	2	X	3	X	3	X	1	X	1	L	0,5-1	"	-	-
	Ss.2	+	3	+	3	+	3	+	3	X	2	X	3	X	3	X	1	X	1	L	0,5-1	"	-	-
	Ss.3	+	3	+	3	+	3	+	3	X	1	X	3	X	4	X	1	X	1	L	1	"	-	-

A Estirpe Sp.2 difere das Sp.1, 3, no uso da dextrose. As estirpes Pr.1, 2 diferem da Pr.3 no uso da dextrose e succinato.

As estirpes de crescimento rápido formaram colônias com bastantes mucos, ao contrário das de crescimento lento que pouco mucos formaram.

- * - Crescimento (20 dias após repicagem)
 - 4 - abundante
 - 3 - bom
 - 2 - regular
 - 1 - ruim
 - sem crescimento
 - pH: + ácido (Ac.)
 - X alcalino (Al.)
- Todas as colônias apresentaram bordos lisos.
- ** - Rp: rápido (quando a colônia aparecia 24 a 72 horas após a placa repicada).
- L: lento (72 horas após repicagem).
- *** - Sem formação de zona de soro.
- + Com formação de zona de soro.

Quadro 5 - Características flagelares de 9 estirpes de *Rhizobium* de florestais e 1 forrageira.

Grupos	Estirpes	Origem das Estirpes	Flagelação
I	M1.1	Quebra-foice*	-
	Sm.1	Sesbânia	Monotríquia
	BR.23	Estilosante**	-
II	L1.7	Leucena	Monotríquia
	Al.2	Éb ano	Monotríquia
	Mi.1	Jacarandá	Monotríquia
III	x.13	Sabiá	Lofotríquia
	Pp.2	Angico	Monotríquia
	Pr.3	Vinhático do campo	Monotríquia
	Ep.2	Entada	Monotríquia

* Não apresentou flagelo

** Usada para comparação. Não apresentou flagelo.



Fig. 1 - Casa de vegetação onde foram desenvolvidos os experimentos 1 e 2.



Fig. 2 - Tipo de vaso usado no experimento 1.



Fig. 3 - Tipo de sementeira usado nos experimentos 1 e 2.



Fig. 4 - Tipo de lata usado no experimento 2.

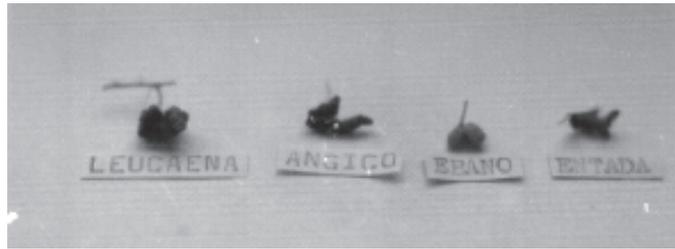


Fig. 5 - Forma de nódulos de espécies Mimosoideae.

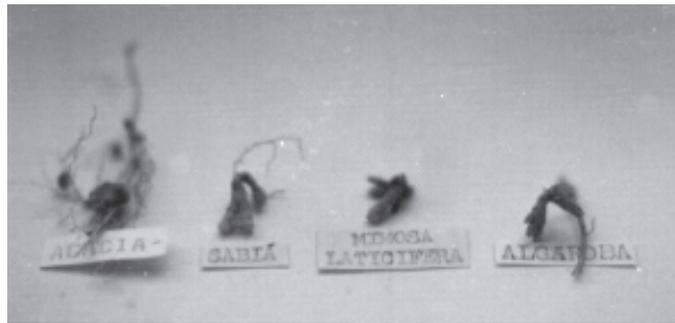


Fig. 6 - Forma de nódulos de espécies Mimosoideae.

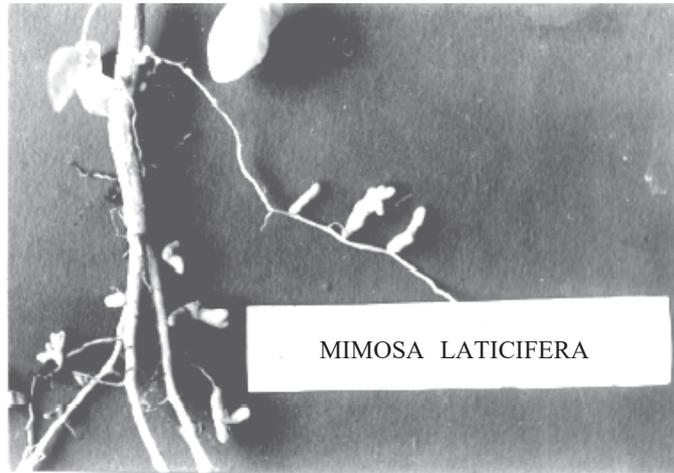


Fig. 7 - Forma de nódulos de espécies Mimosoideae.



Fig. 8 - Forma de nódulos de espécies Mimosoideae.



Fig. 9 - Forma de nódulos de espécies Faboideae.

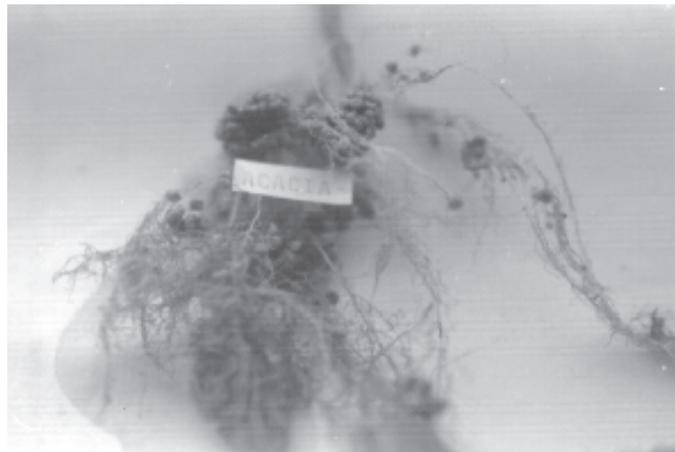


Fig. 10 - Distribuição de nódulos nas raízes de *Acacia mollissima*.

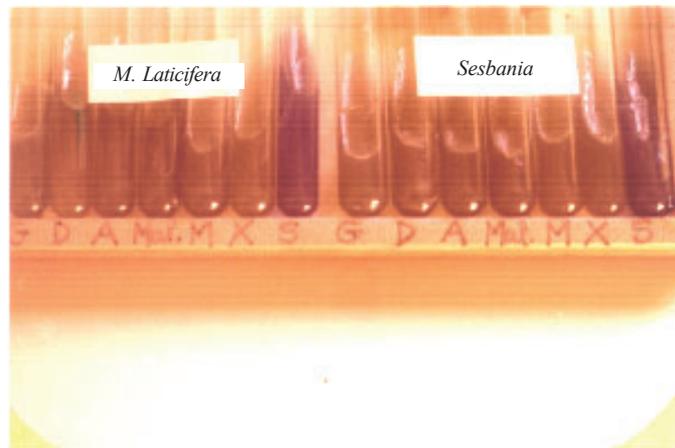


Fig. 11 - Crescimento das estirpes de *Rhizobium* Sm-1, M1-2 (I grupo) em meio 79 com várias fontes de C.

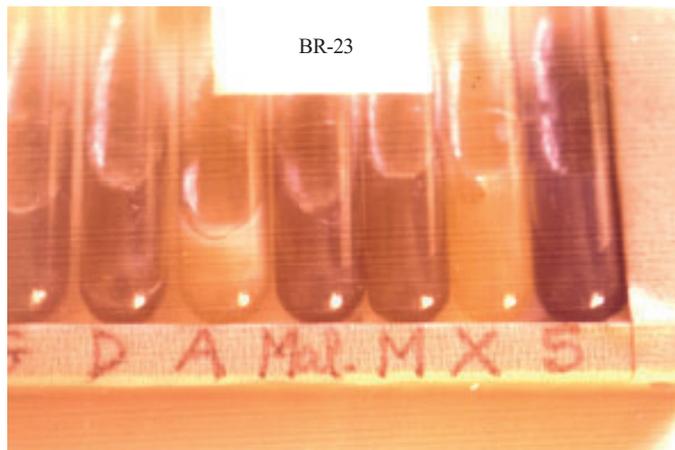


Fig. 12 - Crescimento da estirpe de *Rhizobium* BR-23, (forrageira usada para comparação com as estirpes do I grupo) em meio 79 com várias fontes de C.



Fig. 13 - Crescimento das estirpes de *Rhizobium* Pd-2, Cc1, Vr-4 do II grupo, em meio 79 com várias fontes de C.



Fig. 14 - Crescimento das estirpes de *Rhizobium* F-310, Al-3 do II grupo, em meio 79 com várias fontes de C.



Fig. 15 - Crescimento das estirpes de *Rhizobium* Pr-3, Ep-2 do III grupo, em meio 79 com várias fontes de C.



Fig. 16 - Crescimento das estirpes de *Rhizobium* L1-7, F-130 (II grupo) comparado com o da estirpe de *Rhizobium* M1-1 (I grupo) em meio 79 com várias fontes de C.



Fig. 17 - Crescimento da estirpe de *rhizobium* Pp-2 (III grupo) comparado com o da estirpe de *Rhizobium* Dm-1 (II grupo) em meio 79 com várias fontes de C.

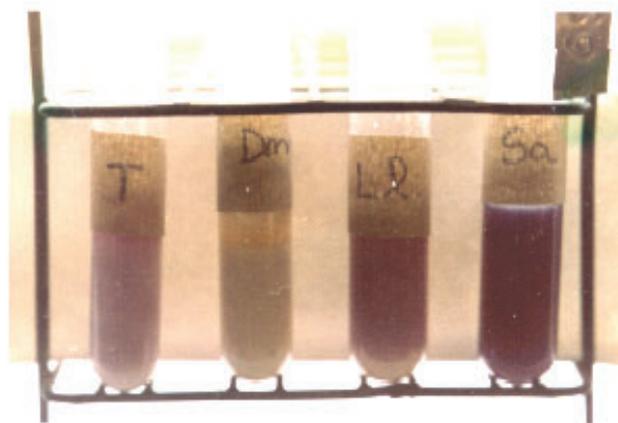


Fig. 18 - Crescimento das estirpes de *rhizobium* Dm-3, L1-7 (II grupo), Sm-1 (I grupo) e reação em leite-litmus.



Fig. 19 - Flagelação monotríquia da estirpe Sm-1 de crescimento rápido, do I grupo.

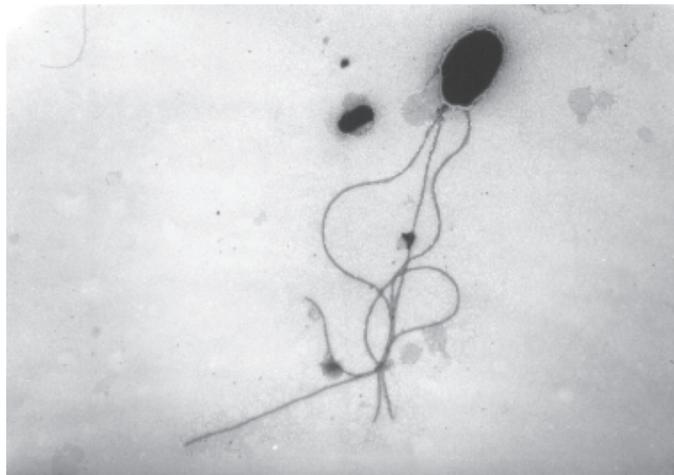


Fig. 20 - Flagelação monotríquia da estirpe A1-2, do II grupo, de crescimento rápido.

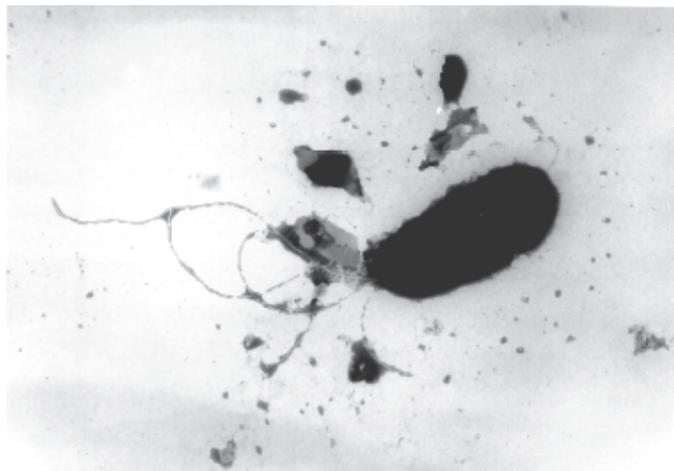


Fig. 21 - Flagelação lofotríquia da estirpe de *Rhizobium* X-13, de crescimento rápido, do III grupo.