

**EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ESTIRPES DE
BACTERIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO EM
FEIJOEIRO E SUA TOLERÂNCIA A ACIDEZ E
ALUMÍNIO “IN VITRO”**

PAULO ADEMAR AVELAR FERREIRA

2008

PAULO ADEMAR AVELAR FERREIRA

**EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ESTIRPES DE BACTERIAS
FIXADORAS DE NITROGÊNIO EM FEIJOEIRO E SUA
TOLERÂNCIA A ACIDEZ E ALUMÍNIO “IN VITRO”**

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

Orientadora

Profa. Dra. Fátima Maria de Souza Moreira

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
2008

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

Ferreira, Paulo Ademar Avelar.

Eficiência simbiótica de estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio em feijoeiro e sua tolerância a acidez e alumínio “in vitro” / Paulo Ademar Avelar Ferreira. – Lavras : UFLA, 2008.

50 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

Orientador: Fátima Maria de Souza Moreira.

Bibliografia.

1. Rhizobium. 2. Feijão. 3. Estresse ambiental. 4. Tolerância. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 633.652

PAULO ADEMAR AVELAR FERREIRA

**EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ESTIRPES DE BACTERIAS
FIXADORAS DE NITROGÊNIO EM FEJJOEIRO E SUA
TOLERÂNCIA A ACIDEZ E ALUMÍNIO “IN VITRO”**

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

APROVADA em 29 de julho de 2008

Prof. Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares	DCS/UFLA
Prof. Messias José Bastos de Andrade	DAG/UFLA
Prof ^ª . Rosane Freitas Schwan	DBI/UFLA

Profa. Fátima Maria de Souza Moreira
UFLA
(Orientadora)

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

Aos meus queridos pais, **José Ferreira da Silva (in memória) e Odília Avelar da Silva**, por todo o apoio, ensinamentos, conselhos, incentivos, compreensão e fé a mim dedicados.

OFEREÇO

A Deus,

Por seu amor incondicional, por iluminar meus caminhos e por ter concedido a sabedoria para gozar dos momentos alegres e superar os momentos de dificuldade abençoando minha vida.

As minhas irmãs, **Márcia Avelar e Maita Avelar**, pela amizade, pela compreensão e incentivo constante ao longo desta jornada.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciências do Solos, pela oportunidade de realização do Mestrado.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

À professora Fátima Maria de Souza Moreira, pela orientação, paciência, oportunidades concedidas e pelos ensinamentos passados.

Ao professor Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares, pela amizade e conhecimentos transmitidos.

Ao professor Messias José Bastos de Andrade pelo apoio e à Professora Rosane Freitas Schwan, pela participação na banca e pelas sugestões que muito contribuíram para a melhoria do trabalho.

A Cleide pela ajuda, amor e companheirismo e também pelo auxílio em todos os momentos.

A todos os funcionários Departamento de Ciência do Solo, pelo auxílio, apoio, disponibilidade e ajudas prestadas.

Aos funcionários Marlene Aparecida de Souza e Manuel Aparecido da Silva, pela valiosa contribuição na execução das análises.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia do Solo que, de alguma forma, sempre tiveram dispostos a discutir dúvidas e pontos de vista, além das grandes ajudas e auxílios nos momentos mais difíceis: Amanda, Alice, Bruno, Ederson, Gláucia, Krisle, Ligiane, Márcia, Mauricio, Jerusa, Michele Aparecida, Michele Rocha, Rogério, Leandro, Pedro, Plínio e Silvia.

A todos os amigos do Departamento de Ciência do Solo e de Biologia, incluindo alunos de graduação e pós-graduação, professores e funcionários, pela agradável convivência durante todos estes anos.

Aos amigos de república André Dominghetti Ferreira, Guilherme Amaral de Souza e Thiago Henrique Pereira Reis, pela amizade, convívio

intenso e por compartilharem dos momentos felizes e também pela força nas horas difíceis.

A todos os amigos adquiridos em Lavras.

Muito Obrigado!!!

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 A cultura do feijoeiro no Brasil.....	3
2.2 Nitrogênio.....	4
2.3 Papel da FBN na produção do feijoeiro	6
2.4 Seleção de Estirpes Eficientes na FBN	8
2.5 Fatores ambientais que afetam a fixação biológica de nitrogênio - Acidez e Al ⁺³	10
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Ensaio em Casa de Vegetação.....	15
3.2 Testes de Tolerância a Acidez e Alumínio.....	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1 Ensaio em Casa de Vegetação.....	20
4.2 Tolerância a acidez e a Alumínio.....	25
5 CONCLUSÕES	38
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	38

RESUMO

FERREIRA, Paulo Ademar Avelar. **Eficiência Simbiótica de Estirpes de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio em Feijoeiro e sua Tolerância a Acidez e Alumínio “in vitro”** 2008. 50p. Dissertação (Mestrado em Ciências do Solo) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG*

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das leguminosas mais cultivadas e consumidas pela população brasileira. A simbiose desta espécie hospedeira com bactérias fixadoras de nitrogênio pode aumentar a produção, substituindo os fertilizantes nitrogenados e diminuindo os custos de produção. O objetivo deste trabalho foi avaliar novas estirpes de rizóbio eficientes no processo de fixação biológica de nitrogênio de solos de diferentes usos da terra da região Amazônica, em simbiose com o feijão; compará-las com uma das estirpes atualmente recomendadas para produção de inoculante comercial (CIAT 899) para a cultura do feijoeiro e avaliar sua tolerância a acidez e alumínio “in vitro”. O experimento foi conduzido em vasos de Leonard, em casa de vegetação. O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente casualizado, com 20 tratamentos (18 estirpes e duas testemunhas sem inoculação sem e com nitrogênio mineral) e 5 repetições. Portanto, as estirpes que obtiveram os melhores resultados no ensaio de casa de vegetação foram avaliadas quanto sua tolerância a acidez e alumínio “in vitro”. No ensaio para a avaliação da eficiência da fixação biológica de nitrogênio, a inoculação com as estirpes 3K, 342k (*Mesorhizobium* sp.) e 10K (*Mesorhizobium loti*) proporcionaram maior crescimento das plantas, maior nutrição de nitrogênio e boa nodulação no experimento de Vaso de Leonard quando comparadas com a estirpe recomendada como inoculante e a testemunha nitrogenada. No ensaio para avaliar a tolerância a pH as estirpes mostraram-se tolerantes à acidez quando avaliadas em meio de cultura líquido. Já no ensaio com Al^{3+} as concentrações acima de $1 \text{ cmol}_e \text{ L}^{-1} \text{ Al}^{3+}$ inibiram o crescimento das estirpes testadas. Apesar da estirpe 10K apresentar tolerância à acidez, ela mostrou-se sensível à presença de alumínio no meio de cultura. Pode-se constatar que estas estirpes apresentam um grande potencial para novos testes em casa de vegetação e á campo.

*Orientadora: Fátima Maria de Sousa Moreira – UFLA.

ABSTRACT

FERREIRA, Paulo Ademar Avelar. **Simbiotic efficiency of nitrogen-fixing bacterial strains in common beans and its acidity and aluminum tolerance "in vitro"**. 2008. 50 p. Dissertation (Master in Soils Science) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.¹

The common beans (*Phaseolus vulgaris*) is one of the most cultivated and consumed legumes by the Brazilian population. The symbiosis of this host plant with nitrogen fixing bacteria can increase the production, replacing the nitrogen fertilizers and lowering the production costs. The aim of this research was to evaluate the efficient of new rhizobia strains isolated from different Amazon land use in the process of nitrogen biological fixation in symbiosis with common beans comparing them with one of the currently commercial inoculant (CIAT 899) and evaluate their acidity and aluminum tolerance “in vitro”. The experiment about efficiency was conducted in Leonard pots, in a greenhouse. The statistical design used was completely randomized, with 20 treatments (18 strains and two controls without inoculation; with and without mineral nitrogen) and 5 repetitions. The strains that showed the best results in the greenhouse experiment were evaluated for their tolerance to acidity and aluminum “in vitro”. In the test for assessing the efficiency of nitrogen biological fixation, the inoculation with the strains 3K, 342k (*Mesorhizobium* sp.) and 10K (*Mesorhizobium loti*) provided greater plant growth, higher nitrogen nutrition and good nodulation when compared with the strain recommended as inoculant and the control with nitrogen. In the pH tolerance test, the strains were tolerant to acidity when evaluated in liquid culture medium. In the test with Al^{3+} , the concentrations above $1\text{ cmolc L}^{-1} Al^{3+}$ inhibited the growth of the same strains. The strain 10K was tolerant to acidity, but it was sensitive to the presence of aluminum in the culture medium. These strains have a great potential for new tests in greenhouse and field experiments.

¹Guidance Committee: Fátima Maria de Souza Moreira – UFLA

1 INTRODUÇÃO

O feijoeiro constitui numa importante cultura de subsistência e principal fonte de proteínas na dieta humana de populações pobres, especialmente na América Latina e alguns países africanos. O feijão possui de 20 a 25% de proteínas ricas em aminoácidos como a lisina, histidina, isoleucina e valina, exercendo assim efeito complementar na dieta das populações de baixa renda.

O nitrogênio é o nutriente requerido em maior quantidade pela cultura do feijoeiro. O fornecimento desse nitrogênio pode ser feito pelo uso de fertilizantes nitrogenados, pela matéria orgânica do solo ou pela fixação biológica de nitrogênio.

A aplicação de fertilizantes nitrogenados minerais vem alcançando grandes dimensões em várias culturas agrícolas, levando ao aumento no custo de produção, sendo sua utilização restrita ou mesmo impraticável por pequenos agricultores. Portanto, a fixação biológica de nitrogênio, realizada por parte dos procariotos, é uma alternativa para suprir o nitrogênio requerido pelas leguminosas, a custo mais baixo que a utilização de fertilizantes nitrogenados. Resultados de pesquisa apontam que é possível que a cultura do feijoeiro se beneficie, no campo, da fixação biológica de nitrogênio e o grande desafio que se apresenta é conseguir um manejo adequado dessa simbiose, visando aumentar a sua eficiência.

Dessa forma, é importante selecionar estirpes que, além de eficientes no processo de fixação de nitrogênio, sejam adaptada a diversas condições, como altas temperatura, acidez do solo, baixos teores de nutrientes principalmente Ca e P, estabilidade genética dos microsimbiontes e cultivares adequadas para a fixação biológica de nitrogênio. A acidez do solo é apontada como um dos principais fatores limitantes ao processo de FBN, afetando o rizóbio, o hospedeiro e o próprio processo simbiótico.

Há evidências da existência de grande diversidade de bactérias que nodulam leguminosas na região Amazônica, sendo possível que estirpes nativas possam ser mais adaptadas às características adversas dos solos, tornando a região fonte de novas estirpes, com potencial para superar fatores críticos. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar novas estirpes de rizóbio eficientes no processo de fixação biológica de nitrogênio de solos de diferentes usos da terra da região Amazônica, em simbiose com o feijão, compará-las com uma das estirpes atualmente recomendadas para produção de inoculante comercial para a cultura do feijoeiro CIAT 899 e avaliar sua e tolerância a acidez e alumínio.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura do feijoeiro no Brasil

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) pertence à classe Dicotyledoneae, família Leguminosae, gênero *Phaseolus*. Esta leguminosa apresenta componentes e características que tornam seu consumo vantajoso do ponto de vista nutricional, tendo um importante destaque na agricultura dos países em desenvolvimento, em especial do Brasil, devido à sua importância na alimentação humana, por ser excelente fonte de proteína, além de possuir alto conteúdo de carboidratos e ferro.

O Brasil se destaca como o maior produtor mundial de feijão, o qual é produzido em quase todo o território nacional, com destaque para os estados do Paraná, Minas Gerais, Bahia, São Paulo e Goiás, responsáveis por 65% da produção nacional. O Brasil também se destaca por ser o maior consumidor mundial da leguminosa, com consumo médio de 2.950 mil t/ano ou 16 kg por habitante/ano (Food and Agriculture Organization, 2007).

Nos últimos cinco anos a produção nacional de feijão variou de 2,5 a 3,2 milhões de toneladas, em uma área que se tem mantido entre 4000 a 4500 mil hectares (MAPA, 2008). Cultiva-se o feijoeiro em três épocas: a “das águas” (1ª safra) nas regiões Sul e Sudeste, com uma produtividade média de 787 kg ha⁻¹; a “da seca” (2ª safra), em todo o Brasil, com produtividade média de 939 kg ha⁻¹ e a “de inverno” (3ª safra), cultivada principalmente nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Goiás, com produtividade média que pode atingir 2130 kg ha⁻¹ (MAPA 2008). A baixa produtividade média na 1ª e 2ª safras está ligada ao fato de serem praticadas por pequenos agricultores, que não possuem acesso à tecnologia disponível (Straliotto, 2002). As maiores médias de produtividade obtidas pela cultura na safra “de inverno” se devem ao uso de tecnologias como cultivares melhoradas, irrigação, manejo de solos e controle de pragas e doenças,

menores riscos climáticos, mas também pela mudança do perfil do produtor (Nehmi et al., 1999).

Há um enorme contraste entre os sistemas de produção utilizados no cultivo de feijão no Brasil. De um lado estão agricultores tipicamente de subsistência, com praticamente nenhum emprego de insumos, com lavouras menores que 100 ha, correspondendo a 71% da produção nacional e com produtividade média de 525 kg ha⁻¹. Do outro lado situam-se grandes produtores rurais, que cultivam o feijão em áreas maiores que 100 ha, com alto nível tecnológico obtendo produtividade média de 1440 kg ha⁻¹ (Straliotto, 2002).

O feijoeiro é muito exigente em nutrientes em decorrência, principalmente, do seu sistema radicular reduzido e pouco profundo, além de seu ciclo curto, de 90 a 100 dias (Rosolem & Marubayashi, 1994), devendo ser os nutrientes colocados à disposição da planta, em tempo e locais adequados. Uma das deficiências nutricionais que ocorre com maior frequência na cultura é a do nitrogênio, devendo-se propiciar um fornecimento adequado deste nutriente até à época do florescimento, ou seja, no momento que ainda é possível aumentar o número de vagens por planta (Carvalho et al., 2001).

2.2 Nitrogênio

O nitrogênio é um dos elementos mais importantes, fazendo parte de proteínas, ácidos nucléicos e outros constituintes celulares, incluindo membranas e diversos hormônios vegetais. Embora presente em grande concentração na atmosfera na forma de N₂ (78%), nenhum animal ou vegetal consegue assimilá-lo diretamente, devido à estabilidade da tripla ligação existente entre os dois átomos, sendo fator limitante para a produção agrícola.

O nitrogênio utilizado pela cultura do feijoeiro pode ser oriundo de fontes como fertilizantes nitrogenados, matéria orgânica ou fixação biológica de nitrogênio.

Os principais fertilizantes nitrogenados são sintetizados a partir do nitrogênio atmosférico, em um processo industrial altamente oneroso. Este processo de transformação do nitrogênio gasoso (N_2) em amônia (NH_3) requer hidrogênio derivado de gás de petróleo, altas temperaturas (300 a 600°C) e altas pressões (200 a 800 atm). O gasto com fontes energéticas não renováveis, para a produção de uma tonelada de NH_3 é equivalente, em média, a seis barris de petróleo (Carvalho, 2002).

Os fertilizantes nitrogenados são assimilados rapidamente pelas plantas, no entanto, o principal agravante na sua utilização, reside na baixa eficiência, que raramente ultrapassa 50%. Isto ocorre, devido às perdas causadas por práticas culturais inadequadas e processos como lixiviação (lavagem do perfil do solo), desnitrificação (transformação do NO_3^- em formas gasosas como N_2 e NO_2) e pela volatilização do NH_3 (Cantarella, 2007). Com isso, o uso desses fertilizantes nitrogenados em regiões tradicionais na agricultura, de forma intensiva e inadequada, pode apresentar sérios problemas de degradação ambiental e gradativa queda de produtividade.

A sustentabilidade dos sistemas agrícolas tem a sua manutenção garantida quando há preservação da matéria orgânica (M.O) no solo com adequada relação C/N. Isso garante a viabilidade dos sistemas de produção de maneira sustentável. A M.O tem seus processos de decomposição e perdas de N aceleradas pelas condições de temperatura e umidade que predominam no território brasileiro. Cultivos sucessivos podem esgotar rapidamente o reservatório de N presente na M.O do solo uma vez que este se apresenta limitado. Como resultado deste processo tem-se solos com baixos teores de N (0,05 a 0,30 dag kg^{-1} de N) afetando, conseqüentemente, a produtividade agrícola (Carvalho, 2002).

Outra fonte de nitrogênio para a cultura do feijoeiro é a FBN, realizada por varias espécies de bactérias fixadoras de N_2 nodulíferas.

2.3 Papel da FBN na produção do feijoeiro

Uma das alternativas para o suprimento de nitrogênio no feijoeiro é a FBN, processo caracterizado pela conversão do nitrogênio gasoso (N_2) em nitrogênio amoniacal (NH_3), principalmente por bactérias especializadas denominadas rizóbios, que possuem o complexo enzimático chamado de nitrogenase, necessário para a realização do processo. O rizóbio caracteriza-se pela capacidade de interação com o sistema radicular da planta hospedeira, por meio do desenvolvimento de estruturas hipertróficas denominadas de nódulos, onde ocorre a fixação do nitrogênio. Esta interação caracteriza-se por uma simbiose (uma interação mutualística), em que a bactéria se beneficia do suprimento de fotossintatos fornecido pela planta hospedeira, enquanto a planta recebe o nitrogênio fixado pelo rizóbio microssimbionte na forma amoniacal, incorporando-o em compostos nitrogenados que podem ser translocados para as suas diferentes partes, para a síntese de proteínas.

Segundo Moreira & Siqueira (2006), o feijoeiro pode estabelecer simbiose com diferentes espécies, todas de crescimento rápido: *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (Jordan, 1984), *Rhizobium tropici* (Martinez-Romero et al., 1991), *Rhizobium etli* bvs. *mimosae* e *phaseoli* (Wang et al., 1999, Segovia et al., 1993), *Rhizobium gallicum* bvs. *gallicum* e *phaseoli* (Amarger et al., 1997), *Rhizobium giardinii* bvs. *giardinii* e *phaseoli* (Amarger et al., 1997), *Rhizobium mongolense* (Van Berkun et al., 1998), *Rhizobium yanglingense* (Tan et al., 2001), *R. (Sinorhizobium) fredii* (Scholla & Elkan, 1984), *Sinorhizobium americanum* (Toledo et al., 2003) *R. (Mesorhizobium) loti* (Jordan, 1984) e *R. (Mesorhizobium) huahuii* (Chen et al., 1991) e *Azorhizobium doebereineriae* (Moreira et al., 2006), nem sempre sendo todas eficientes no processo de FBN.

Atualmente as estirpes recomendadas para a produção de inoculantes para a cultura do feijoeiro pertencem à espécie *Rhizobium tropici* (Martinez-Romero et al., 1991), compreendendo as estirpes comerciais SEMIA 4077 (CIAT 899) e SEMIA 4080 (PRF 81). Esta espécie é considerada geneticamente estável e tolerante a estresses, tais como temperaturas elevadas e acidez do meio, sendo adaptada às condições de solos tropicais (Graham, 1992; Hungria et al., 2000).

Pesquisas apontam que é possível que a cultura do feijoeiro se beneficie no campo, da fixação biológica de nitrogênio. Segundo Tsai et al. (1993), o feijoeiro é capaz de fixar de 20 a 60 kg ha⁻¹ N por ciclo cultural. No Brasil, as taxas médias de FBN nesta espécie são da ordem de 60 kg ha⁻¹ N e representam de 30% a 50% do N total acumulado pela planta (Saito, 1982), podendo chegar a substituir totalmente o uso da adubação nitrogenada, conforme verificado por Mendes et al. (1994) nas cultivares ‘Capixaba Precoce’ e ‘CNPAF-178’. Em solos de cerrado e sem irrigação, Peres et al. (1994) observaram que os ganhos de produtividade obtidos com a inoculação de estirpes de *Rhizobium* foram de 63 a 290 kg ha⁻¹ em relação às testemunhas não inoculadas. Straliootto (2002) relata que com o processo de inoculação, a cultura pode atingir produtividades de 1.500 a 2.000 kg ha⁻¹. Em um Argissolo Vermelho eutrófico adubado com 70 kg ha⁻¹ de P₂O₅ sob irrigação, no período de inverno, Lemos et al. (2003) utilizando a cv. Carioca, inoculada com a estirpe de *Rhizobium tropici* CM 255, obtiveram produtividades de 2858 kg ha⁻¹. Hungria et al. (2000), estudando a eficiência de novos isolados, obtiveram rendimentos de 1356 a 3520 kg ha⁻¹, com resposta à inoculação, proporcionam rendimentos de grãos semelhantes ao da estirpe referência CIAT 899 e mesmo da testemunha com nitrogênio mineral. Mostasso et al. (2001) obtiveram resultados de rendimento de grãos de 1612 a 2600 kg ha⁻¹, como resultado da inoculação com estirpes selecionadas, sendo que as melhores se mostraram similares à CIAT 899. Soares et al. (2006),

avaliando a produtividade do feijoeiro inoculado com quatro estirpes de rizóbio, em Perdões, MG, observou que a estirpe UFLA 02-100 proporcionou um aumento de 487,5 kg ha⁻¹ no rendimento de grãos em relação à testemunha sem nitrogênio e não diferiu da estirpe recomendada CIAT899 e da testemunha nitrogenada.

No entanto, as adubações de base com fósforo e potássio usadas por Hungria et al. (2000) e Mostasso et al. (2001), foram superiores aos demais trabalhos, respectivamente, 300 kg.ha⁻¹ da formulação N P K 0-28-20 e 84 kg P₂O₅ ha⁻¹ mais 60 kg K₂O ha⁻¹. Além disso, ambos receberam 40 kg.ha⁻¹ de micronutrientes e o de Mostasso et al. (2001), ainda recebeu calagem. Nos trabalhos de Hungria et al. (2000) e Mostasso et al. (2001), portanto, foram utilizados níveis de tecnologia mais elevados, mais próximos dos utilizados por grandes produtores, enquanto nos outros trabalhos a intenção foi simular condições adequadas a pequenos produtores.

Estes resultados apontam que estirpes eficientes no processo de FBN são capazes de contribuir de forma expressiva para o rendimento do feijoeiro, reduzindo assim o custo de produção.

2.4 Seleção de Estirpes Eficientes na FBN

A inoculação com bactérias fixadoras de nitrogênio em sementes de leguminosas é um dos processos relacionados à agricultura mais estudados e explorados tecnologicamente e é prática comum em vários países.

No Brasil, a inoculação da soja (*Glycine max* L. (Meril.)) com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* propicia economia em fertilizantes nitrogenados que pode ser estimada em quase nove bilhões de dólares anuais. Isto se deve, em boa parte, ao melhoramento vegetal direcionado para maior contribuição da FBN e a diversos trabalhos de seleção de rizóbios adaptados às condições dos solos brasileiros.

Em outras leguminosas como o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), o processo de domesticação e seleção de cultivares, dando maior atenção apenas às características agrônômicas do material de interesse, pode ter sido negativo ao processo de fixação biológica de nitrogênio, alterando o equilíbrio simbiótico estabelecido pela seleção natural no processo evolutivo do sistema rizóbio-feijão (Mytton, 1984). Além disso, a seleção do feijoeiro e seu cultivo em terras férteis pode também ter influenciado na capacidade de nodulação e fixação de nitrogênio em genótipos de feijão (Pereira, 1990). Outro ponto importante a ser considerado no processo de seleção de estirpes eficientes na fixação de nitrogênio rizóbio-feijão, é que o fluxo de carboidratos para os nódulos fica reduzido durante a formação das vagens, limitando a FBN (Lawn et al., 1974). Com isso, variedades com maior capacidade de manter o fluxo de carboidratos constante para os nódulos tem se mostrado mais eficientes no processo de fixação (Graham & Halliday, 1976). A FBN é mais eficiente em cultivares de hábito de crescimento indeterminado e nas cultivares de porte trepador (Graham & Rosas, 1977) devido, em parte, ao efeito do ciclo de crescimento mais longo. Já as variedades de feijoeiro de ciclo precoce, geralmente são pouco eficientes em fixar nitrogênio (Graham, 1981; Hardarson et al., 1993). Isso pode ser explicado pelo curto período vegetativo das plantas e a senescência dos nódulos na fase de enchimento dos grãos, devido à redução do fluxo de carboidratos para os mesmos (Ruschel et al., 1982; Rennie & Kemp, 1983; Sa e Israel, 1995). Em trabalho realizado por Morrison & Baird (1987), com variedades de feijoeiro de hábito de crescimento determinado e indeterminado, foi verificado que o tempo necessário para o estabelecimento dos nódulos não variou para os dois tipos de planta. Com isso, a duração da simbiose entre rizóbio-feijão parece estar relacionada com o ciclo de crescimento, daí o melhor resultado com genótipos de hábito de crescimento indeterminado.

A eficiência das estirpes fixadoras de nitrogênio que estabelecem simbiose com feijoeiro e sua capacidade de sobreviver e formar nódulos depende de fatores genéticos inerentes aos simbioses e da sua interação com fatores edáfo-climáticos (Moreira & Siqueira, 2006). Dentre estes, destacam-se a efetividade das estirpes presentes no inóculo e sua competitividade com as estirpes nativas do solo, número de células presente no inóculo, técnicas de inoculação, semeadura e fatores ambientais, principalmente fatores químicos e físicos do solo (Vargas & Hungria, 1997; Zilli et al., 1998; Stralioetto & Rumjanek, 1999), que garantem a sobrevivência e multiplicação do rizóbio no solo e rápida nodulação. A quase totalidade dos fatores que são benéficos para as plantas são benéficos também para as bactérias, alguns atuando direta ou indiretamente, ou mais acentuadamente sobre um dos simbioses. Diversos fatores, como temperatura, acidez do solo, teores de nutrientes principalmente Ca e P no solo, instabilidade genética dos microsymbioses e cultivares não adequadas, podem influenciar na fixação biológica de nitrogênio (Moreira & Siqueira, 2006). A acidez do solo é apontada como um dos principais fatores limitantes ao processo de FBN, afetando o rizóbio, o hospedeiro e o próprio processo simbiótico (Vargas & Graham, 1998).

Desta forma, pesquisas têm sido desenvolvidas com o objetivo de selecionar estirpes eficientes para potencializar a FBN em solos com limitações ambientais para o estabelecimento e eficácia da simbiose, visando maior aproveitamento do processo para a produção da cultura do feijoeiro.

2.5 Fatores ambientais que afetam a fixação biológica de nitrogênio - Acidez e Al^{3+} do solo

Devido aos processos de formação dos solos tropicais, a maior parte das áreas agrícolas brasileiras apresenta problemas relacionados com acidez, baixa disponibilidade de nutrientes (Ca, Mg, K) e elevados teores de íons H^+ e Al^{3+} .

A acidez influencia na disponibilidade dos nutrientes no solo, reduzindo a sua absorção destas pelas plantas. Ainda, a acidez tem um efeito direto na atividade dos microrganismos do solo que estão ligados com a mineralização da matéria orgânica, nitrificação e FBN, entre outros, sendo portanto, uma das propriedades químicas do solo determinantes para a produção agrícola. A toxidez de alumínio é outro importante fator limitante ao crescimento de plantas em solos ácidos, além de afetar vários microrganismos fixadores de nitrogênio em simbiose (Wood, 1995; Igual et al., 1997). Assim, estas condições são um problema para as plantas, as bactérias e sua simbiose.

A faixa ideal de pH para crescimento de estirpes de rizóbios está entre 6,0 e 7,0, sendo que poucos rizóbios crescem satisfatoriamente em pH menor que 5,0 (Graham et al., 1994). Estirpes de uma mesma espécie variam amplamente em certos casos de tolerância a um determinado pH. As estirpes de *Rhizobium* de crescimento rápido são em geral consideradas menos tolerantes a condições de pH ácido que aquelas estirpes de crescimento lento de *Bradyrhizobium* (Graham et al., 1994). Entretanto, algumas estirpes de crescimento rápido como *R. loti*, agora descrito como *Mesorhizobium*, *R. meliloti* e *R. tropici*, são tolerantes à acidez (Wood et al., 1988; O'Hara et al., 1989; Graham et al., 1994). Graham et al. (1994) relataram que a tolerância à acidez em *R. tropici* CIAT 899 está relacionada com a composição e a estrutura da membrana, que se mostrou hidrofóbica nestas condições de baixo pH. O'Hara et al. (1989) demonstraram que estirpes ácido tolerantes de *R. meliloti*, que tem desempenho superior em sobrevivência e habilidade de nodulação em solos ácidos, possuem a habilidade de manter o pH intracelular entre 7,2 e 7,4 mesmo quando em pH externo ácido (5,6). A tolerância à acidez em *Rhizobium loti* (*Mesorhizobium*) está relacionada com a composição e estrutura da membrana e estirpes ácido tolerantes apresentam proteínas de membrana que têm sua expressão aumentada sob pH 4 (Correa & Barneix, 1997).

A acidez afeta também os primeiros estágios do processo de infecção, incluindo a troca de sinais moleculares entre parceiros simbióticos e a aderência à raiz. A liberação dos indutores dos genes de nodulação por raízes de soja e feijoeiro comum foi menor a pH 4,5 que em pH 5,8 (Hungria & Stacey, 1997) com a falha na expressão de alguns genes de nodulação com a queda do pH. Além disto, McKay & Djordevic (1993) relataram que o baixo pH pode afetar a produção e excreção de fatores de nodulação em estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*.

Segundo Moreira (1994) estirpes ou isolados nativos tolerantes à acidez são mais facilmente obtidos de populações adaptadas a estes ambientes. Como exemplo, tem-se a estirpe de rizóbio INPA 07-B, isolada de leucena (*Leucaena leucocephala*) em solos ácidos, que apresentou maior tolerância à acidez que outras estirpes da mesma espécie isoladas de solos com pH menos ácido. Isso pode ser explicado pelo fenômeno denominado “acid habituation” ou “adaptative tolerance response”, segundo Dilworth et al. (1999). Esta tolerância intrínseca não pode ser inferida apenas a partir do local de isolamento da bactéria. Parece que a tolerância ao pH ácido depende da habilidade da estirpe em manter o pH interno entre 7,2 e 7,5, mesmo com a existência de pH ácido externo (O’Hara et al., 1989; Graham et al., 1994).

Apesar de vários estudos, as bases concretas para a explicação das diferenças na tolerância ao pH em estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* ainda não estão bem definidas (Correa & Barneix, 1997, Graham et al., 1994) ainda que vários autores tenham demonstrado que o pH citoplasmático de estirpes ácido tolerantes não é afetado pela acidez externa (Chen et al., 1993 a; Chen et al., 1993 b; Goss et al., 1990; O’Hara et al., 1989). Diferenças na composição dos lipopolissacarídeos, exclusão e extrusão de prótons (Chen et al., 1993 a; Chen et al., 1993 b), acúmulo de poliaminas celulares (Fujihara & Yoneyama, 1993), síntese de proteínas (Hickauy e Hirshfied, 1990) e o

acúmulo de moléculas que oferecem proteção a estresse oxidativo como a glutationa (Riccillo et al., 2000; Muglia et al., 2007) também estão associadas com o crescimento das células em pH ácido .

Segundo Cunningham & Munns (1984), estirpes de *Rhizobium* que produzem maior quantidade de exopolissacarídeos (EPS) são mais tolerantes às condições de acidez quando comparadas com estirpes que produzem menor quantidade de EPS. Barberi et al. (2004) e Miguel & Moreira (2001) também encontraram resultados semelhantes para estirpes do gênero *Bradyrhizobium*, relacionando a maior produção de EPS por estas bactérias com as condições de acidez do meio de cultura.

Rizóbios também possuem variadas reações à toxicidade ao alumínio em solos ácidos e em meios de cultura. Algumas estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* foram resistentes ao alumínio ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$ no meio) em baixo pH (4,5) (Wood et al., 1988). Geralmente estirpes de *Bradyrhizobium* spp. são mais tolerantes à toxicidade de Al^{3+} que *Rhizobium* spp. Vargas e Denardin (1992) testaram 155 estirpes isoladas de solos de regiões de cultivo do feijoeiro no estado de SP, quanto à tolerância à acidez em meio de cultura sólido e verificaram que 111 estirpes foram tolerantes ao pH 4,5, e que 77 estirpes cresceram quando $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AlCl_3 foram adicionados ao meio. Mukherjee & Asanuma (1998), Campo & Wood (2001), Hara & Oliveira (2005) também estudaram a tolerância de estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* ao alumínio, evidenciando tolerância à acidez em diversos isolados estudados.

Nem sempre a tolerância à acidez resulta em tolerância ao Al^{3+} . Hara & Oliveira (2004) estudaram 88 isolados de rizóbio oriundos de solos ácidos da Amazônia e concluíram que o alumínio foi mais limitante para o crescimento que a acidez, apresentando diferenças metabólicas de adaptação à acidez e ao alumínio. Assim, a identificação de isolados resistentes a acidez, isoladamente, não parece ser um procedimento adequado para seleção de rizóbios (Hara &

Oliveira 2005).

A nodulação em leguminosas parece ser o processo mais sensível ao Al^{3+} do que o crescimento da planta; em pH 4,5 e com $0,5 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$, a nodulação em caupi foi retardada por $12,7 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Al}^{3+}$ e o número de nódulos e peso seco foram afetados (Alva et al., 1990). A disponibilidade de Ca^{2+} em solos ácidos com alto teor de Al^{3+} parece ser muito importante para a nodulação; uma baixa concentração de Ca^{2+} ($0,127 \text{ mmol L}^{-1}$) em pH 4,5 afeta o número de nódulos, a atividade da nitrogenase e a ultra-estrutura dos nódulos em feijão (*Phaseolus vulgaris*) (Vassileva et al., 1997).

A natureza do processo e o local de atuação do Al^{3+} ainda permanecem indefinidos. Estudos realizados por Johnson & Wood (1990) e Wood (1995) indicam que os íons de Al^{3+} atuam se ligando ao DNA interferindo na divisão celular. No entanto, uma vez que estirpes sensíveis e tolerantes possuem o mesmo potencial de ligação ao Al^{3+} , um mecanismo de reparo do DNA deve existir em estirpes tolerantes. Johnson & Wood (1990) relataram que a síntese de DNA por estirpes tolerantes de *R. loti* (*Mesorhizobium*) não é afetada; entretanto, Richardson et al. (1988) constataram que $7,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \text{ Al}^{3+}$ deprimem a expressão dos genes *nodA* em estirpes de *R. leguminosarum* bv. *trifolii*.

Outro mecanismo de tolerância ao alumínio, apresentado por estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*, está relacionado com o acúmulo de fosfato inorgânico no interior da célula, neutralizando o efeito do alumínio pela formação de complexos insolúveis biologicamente não tóxicos (Mukherjee & Asanuma, 1998) além do aumento dos níveis de potássio e fósforo ligados à manutenção do pH interno em *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii* (Watkin et al., 2003).

A calagem é considerada a prática mais eficiente para superar a acidez do solo, com alguns benefícios para a cultura de leguminosas, não apenas pelo aumento do pH do solo, mas também pelo aumento da disponibilidade do Ca^{2+}

para a planta e bactéria. O' Hara et al. (1989) observaram que a taxa de crescimento de quatro linhagens ácido tolerantes aumentou com a adição de 2,0 mmol L⁻¹ de Ca²⁺ em meio de cultura. O Ca²⁺ parece atuar como cátion estabilizador da integridade da parede celular (de Maagd et al., 1989; Ballen et al., 1998), regular a expressão de algumas proteínas (Norris et al., 1991; Ballen et al., 1998) ou controlar o pH interno e manter o citoplasma alcalino através de sistemas de transporte da membrana (O' Hara et al., 1989).

Espécies de rizóbio que nodulam feijão variam em sua capacidade de fixação e competição pelo hospedeiro (Hungria et al., 1999). *R. tropici* é mais competitivo a pH baixo (em torno de 5,0) do que pH maior que 6,0 (Frey & Blum, 1994). Isto favorece a utilização desta espécie em solos tropicais ácidos. Heterogeneidade entre estirpes de *R. tropici* é descrita tanto para eficiência na fixação biológica de N, quanto na competição (Hungria et al., 1997; Hungria et al., 1999), indicando que melhores estirpes podem ser obtidas através de programas de seleção.

Interações entre estirpes e plantas hospedeiras podem ocorrer a baixos pH e devem ser consideradas em solos tropicais ácidos. Além disso, como muitos solos brasileiros apresentam altos níveis de Al³⁺, a pesquisa por estirpes bacterianas tolerantes a acidez deve continuar, de maneira a reduzir o número de estirpes candidatas e evitar o desperdício na análise de bactérias ineficientes em experimentos de campo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Ensaio em Casa de Vegetação

Para avaliação da eficiência simbiótica foram avaliadas 15 estirpes de rizóbio, com crescimento rápido característica semelhante à de estirpes que nodulam o feijoeiro. As estirpes foram isoladas de nódulos de plantas de siratro utilizadas como planta isca, que foram inoculadas com suspensão de solo com

diluição de 10^{-1} a partir de amostras obtidas de áreas de pastagem, capoeira velha, capoeira nova, agrofloresta e agricultura da Amazônia Ocidental (Tabela1), em trabalho realizado por Lima (2007). Estes solos apresentam acidez e teores de Al^{3+} elevados (Nóbrega, 2006).

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Departamento de Ciências do Solo na Universidade Federal de Lavras, nos meses de fevereiro e março de 2008, utilizando-se vasos de Leonard, durante 38 dias período em que ocorreu o florescimento. O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado, com vinte tratamentos e cinco repetições. Os tratamentos foram constituídos pelas 15 estirpes de rizóbio isoladas de siratro, duas estirpes selecionadas de nódulos de feijoeiro comum (UFLA 02-127 e 02-100) em trabalhos anteriores (Soares et al., 2006), a estirpe controle CIAT899 (*Rhizobium tropici*) recomendada como inoculante para cultura do feijoeiro pela RELARE (Rede de Laboratórios para Recomendação, Padronização e Difusão de Tecnologia de Inoculantes Microbiológicos de Interesse Agrícola) e mais duas testemunhas não inoculadas, uma sem nitrogênio e outra com nitrogênio mineral num total de 440 mg de N por vaso.

TABELA 1. Origem e características culturais das estirpes de rizóbio avaliadas no ensaio em casa de vegetação (Lima, 2007).

Identificador	Acessos	Estirpes	%	Análise de solo do local de coleta			Características morfológicas				
				Local	pH do solo	Al ⁺³ cmol _c dm ⁻¹	T.C ¹	pH ²	Cor	Absorção de indicador	Ø ³ (mm)
3K	ref NC_008254.1 	<i>Mesorhizobium</i> sp.	96	FA	4,0	9,4	R	ácido	amarela	sim	5
10K	ref NC_002678.2 	<i>Mesorhizobium loti</i>	98	AG	5,1	2,5	I	neutro	branca	não	2
268K	ref NC_008254.1 	<i>Mesorhizobium</i> sp.	99	FP	4,5	7,5	R	ácido	creme	sim	5
342K	ref NC_008254.1 	<i>Mesorhizobium</i> sp.	99	P	5,2	2,3	R	neutro	creme	sim	4
305K	ref NC_007511.1 	<i>Burkholderia</i> sp.	99	FA	4,0	9,4	R	neutro	creme	não	5
331K	ref NC_007511.1 	<i>Burkholderia</i> sp.	99	FI	4,6	3,4	R	ácido	amarela	não	3
RA6	gb AY210714.1 	<i>Rhizobium</i> sp.	96	AG	4,9	5,4	R	ácido	amarela	sim	4
RN294	ref NC_008254.1 	<i>Mesorhizobium</i> sp.	98	A	4,7	3,6	R	neutro	creme	não	3
RA49	gb AY500260.1 	<i>Rhizobium</i> sp.	98	A	4,9	2,5	R	ácido	amarela	não	4
RA35	gb AY500259.1 	<i>Rhizobium</i> sp.	97	AG	5,1	2,5	R	neutro	amarela	sim	2
RA58	gb EF035071.1 	<i>Rhizobium</i> sp.	99	A	4,9	2,5	R	ácido	amarela	não	3
RA272	ref NC_007511.1 	<i>Burkholderia</i> sp.	98	FI	4,4	6,7	R	neutro	creme	não	3
RA17	ref NC_007761.1 	<i>Rhizobium etli</i>	98	FP	4,5	5,2	R	ácido	amarela	sim	5
RA155	ref NC_002678.2 	<i>Mesorhizobium loti</i>	99	A	5,5	0,7	R	ácido	amarela	não	3
RA105	ref X67226.2 	<i>Rhizobium</i> sp.	99	FI	5,2	1,6	R	ácido	amarela	sim	5
UFLA 02-100	AY465886	<i>Rhizobium etli</i>	99	Theobroma, RO	-----	-----	R	neutro	branca	Sim	>2
UFLA 02-127	AF217263	<i>R. leguminosarum</i> bv <i>phaseoli</i>	97	Theobroma, RO	-----	-----	R	neutro	branca	Sim	>2
CIAT 899		<i>R. tropici</i>		Colômbia	-----	-----	R	ácido	amarela	Não	>2

Características culturais: 1. Taxa de crescimento, sendo R rápido (2 a 3 dias), I intermediário (4 a 5 dias); 2. pH do meio de cultura, 3 Diâmetro da colônia. Floresta secundária em estágio avançados de regeneração (FA), Agricultura (AG), Floresta primária (FP), Pastagem (P), Agrofloresta (A), Floresta secundária em estágio inicial de regeneração (FI).

A parte superior do vaso continha uma mistura 1:2 de areia (150 mL) e vermiculita (300 mL), e a inferior continha solução nutritiva de Hoagland e Arnon, (1950) sem nitrogênio mineral ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0,1 mL L⁻¹; KNO_3 0,6 mL L⁻¹; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,4 mL L⁻¹; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 mL L⁻¹; K_2SO_4 3 mL L⁻¹; $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 10 mL L⁻¹; $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 200 mL L⁻¹; H_3BO_3 2,86 mg L⁻¹; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,81 mg L⁻¹; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,22 mg L⁻¹; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,08 mg L⁻¹ e $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,09 mg L⁻¹) diluída quatro vezes. Após o preparo dos vasos e da solução nutritiva estes foram autoclavados por uma hora, à pressão de 1,5 kg cm⁻² e a 127 °C.

A cultivar de feijão utilizada foi a BRS-MG Talismã, de grão tipo carioca, lançada em 2002 e que possui resistência à antracnose e ao vírus do mosaico comum, sendo ainda moderadamente resistente à mancha angular (Ramalho et al., 2002). Antes do plantio as sementes utilizadas foram desinfestadas superficialmente com etanol 70% por 5 minutos e hipoclorito de sódio a 1,0%, por 3 minutos. Em seguida, as sementes foram lavadas seis vezes com água destilada esterilizada e semeadas num total de quatro sementes por vaso. Posteriormente, foi realizada a inoculação com as estirpes de rizóbio previamente crescidas em meio YMA (Vincent, 1970) semi-sólido, num período de dois dias sob agitação constante a 28 °C. Um mililitro de inóculo contendo cerca de 1×10^8 células bacterianas mL⁻¹ foi inoculado em cada semente. Também foi adicionado sobre a superfície do vaso, uma fina camada de mistura esterilizada de areia: benzeno: parafina (proporção de 5:1:0,015, respectivamente), com a finalidade de evitar possíveis contaminações.

A solução nutritiva dos vasos foi periodicamente repostada com solução autoclavada. Após cinco dias de germinação, foi realizado o desbaste, deixando-se somente duas plantas por vaso. A temperatura média da casa-de-vegetação foi avaliada semanalmente, identificando-se as médias das mínimas e máximas, que

foram 19 e 39,5 °C, respectivamente. A máxima obtida foi 43 °C e a mínima, 17 °C.

As plantas foram colhidas no período da floração, estágio R6 do ciclo cultural do feijoeiro para avaliar as seguintes variáveis: número de nódulos (NN); matéria seca de nódulos (MSN); matéria seca de raiz (MSR); matéria seca da parte aérea (MSPA); teor de nitrogênio (N %); acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA) e eficiência relativa (ER %). A eficiência relativa (ER) de cada estirpe foi calculada em relação à produção de MSPA das plantas do tratamento com N por meio da expressão, $ER = (MSPA \text{ tratamento}) * 100 / (MSPA \text{ da T/CN})$.

O teor de nitrogênio total foi avaliado pelo método semimicrokjedahl, de acordo com Sarruge & Haag (1979), determinando-se a percentagem de N na matéria seca da parte aérea. O N acumulado na parte aérea foi calculado multiplicando-se o peso da matéria seca da parte aérea pelo teor de N.

Todos os dados foram submetidos à análise de variância, empregando-se o sistema de análise estatística Sisvar, versão 4.0 (Ferreira, 2000). As médias dos tratamentos foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. Os valores das variáveis número de nódulos (NN) e matéria seca de nódulos (MSN), foram previamente transformados pela fórmula $(X+0,5)^{0,5}$.

3.2 Testes de Tolerância a Acidez e Alumínio “in vitro”

As estirpes que apresentaram melhor eficiência simbiótica no ensaio em casa de vegetação e a estirpe recomendada como inoculante para a cultura do feijoeiro, foram avaliadas quanto às suas respectivas tolerâncias à acidez e Al^{3+} em testes utilizando meio de cultura líquido.

Colônias isoladas de cada estirpe foram inoculadas em 100 mL de meio YM (Vincent, 1970) sem o corante azul de bromotimol e crescidas até atingir uma densidade ótica (D.O) de 0,5 em 560 nm, para posterior utilização deste

como pré-inóculo. Um mL do pré-inóculo foi então transferido para os meios de cultura com os valores de pH: 5,0; 6,0 e 6,8, ajustados previamente com HCl 2 mol L⁻¹ e autoclavados. A influência do Al³⁺ foi avaliada em meios apresentando concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 cmol_c L⁻¹ de Al³⁺, adicionado na forma de AlCl₃·6H₂O, no meio de cultura antes de ser autoclavado, e o pH foi ajustado para 4,5.

As estirpes foram crescidas sob agitação a 110 rpm a 28 °C. As avaliações foram feitas retirando-se alíquotas de 4 mL da cultura para determinação da D.O e inoculação em placa pelo método de diluições sucessivas para contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC) de acordo com o descrito por Miles & Misra (1938) nos intervalos de 6, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas de incubação.

O número de UFC foi calculado pela contagem direta do número de colônias nas placas em cada diluição, sendo obtidas equações de regressão pela relação do logaritmo do número de UFC por mililitro de meio de cultura em função do tempo e da densidade óptica. Comparou-se a produção de exopolissacarídeos entre as estirpes, tomando-se um mesmo número de UFC mL⁻¹ para todas as estirpes. Esse número foi determinado na fase log, na tentativa de se obter maior número de células viáveis, diminuindo assim, a interferência da fase estacionária nas leituras de densidade óptica.

No experimento de alumínio não foi possível tomar como base um mesmo número de UFC mL⁻¹ para todas as estirpes, pois nas concentrações de 1,0 e 2,0 cmol_c de Al³⁺ a fase log não atingiu a número de células das menores concentrações de Al³⁺. Foi calculado a D.O para o valor do máximo crescimento de cada estirpe e transformado pela equação $Y = -\text{LOG}_{10}(\text{D.O.}/\text{UFC})$ para comparação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaio em Casa de Vegetação

No experimento em vaso-de-Leonard, as plantas inoculadas com as estirpes 3K, 10K e 342K promoveram maior produção de matéria seca da parte aérea (MSPA), situando-se no mesmo grupo da estirpe CIAT899 (recomendada com inoculante pela RELARE) e mostrou-se superiores aos demais tratamentos com exceção da testemunha nitrogenada. Em média, a testemunha nitrogenada apresentou MSPA que superou a dos tratamentos CIAT899, 3K, 10K e 342K em 1,3; 1,37; 1,4 e 1,49 vezes, respectivamente. Quanto à produção de matéria seca de raiz (MSR) a testemunha nitrogenada também superou os demais tratamentos, enquanto as estirpes 3K, 10K, 342K e CIAT899 situaram-se no mesmo grupo e foram superiores às demais estirpes e a testemunha sem nitrogênio (Figura 1).

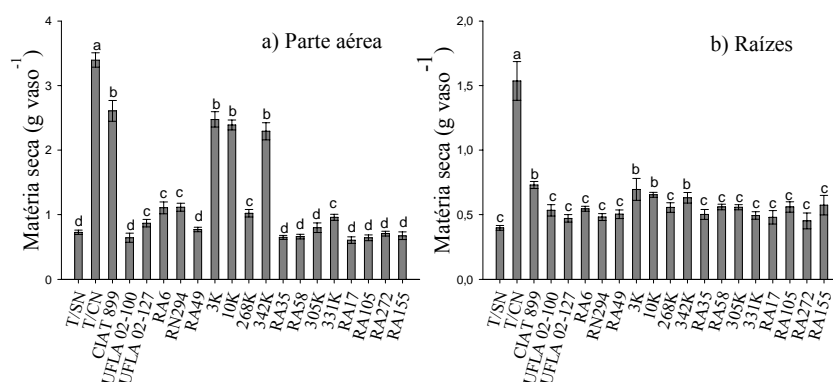


FIGURA 1. Matéria seca da parte aérea (a) raízes (b) do feijoeiro cv. Talismã inoculado com diferentes estirpes de rizóbio. Letras iguais indicam médias de um mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Assim como observado para a produção de matéria seca, verificou-se que os maiores valores de número de nódulos (NN) e matéria seca de nódulos (MSN) foram obtidos nos tratamentos 3K, 10K e 342K cujo comportamento foi compatível com o da estirpe recomendada CIAT899 e superior aos demais. As estirpes 331K, 305K, RA49, RA272, RA155, RA58, RA35, UFLA02-100 e

RA105 não apresentaram nódulos nos sistemas radiculares das plantas inoculadas. Além disso, as testemunhas não apresentaram nódulos nas suas raízes indicando, portanto, que não houve contaminação do experimento (Figura 2).

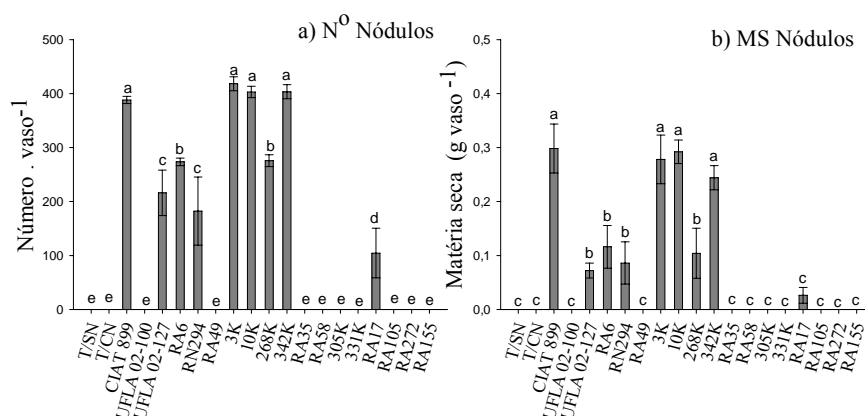


FIGURA 2. Número de nódulos (a) e matéria seca de nódulos (b) do feijoeiro cv. Talismã inoculado com diferentes estirpes de rizóbio. Letras iguais indicam médias de um mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Em relação ao teor de nitrogênio (TN) na parte aérea, as estirpes 3K, 10K, 342K, 268K, RA6 e UFLA 02-127, assim como a estirpe referência CIAT899 superaram a testemunha nitrogenada, com concentrações variando de 32 a 43,6 g kg⁻¹. Os valores encontrados no presente trabalho situaram-se dentro da faixa de suficiência indicada por Ambrosano et al. (1997), e acima do nível crítico de 30 g kg⁻¹. Segundo Lima et al. (2005), isolados de *Bradyrhizobium* de diferentes solos da Amazônia que apresentaram eficiência simbiótica próxima a 100%, obtiveram concentrações de nitrogênio superiores a 30 g kg⁻¹.

Com relação ao acúmulo de nitrogênio na parte aérea (ANPA), as estirpes 3K, 10K, 342K e a estirpe referência CIAT899 tiveram comportamento

equivalente ao da testemunha nitrogenada que recebeu 440 mg de N por vaso (Figura 3), certamente em função das diferenças na produção de matéria seca. Este resultado, Salvador et al. (1994) pode ser explicado pelo fato de que à medida que a planta cresce, há uma diluição dos teores de nutrientes, diminuindo a concentração dos mesmos.

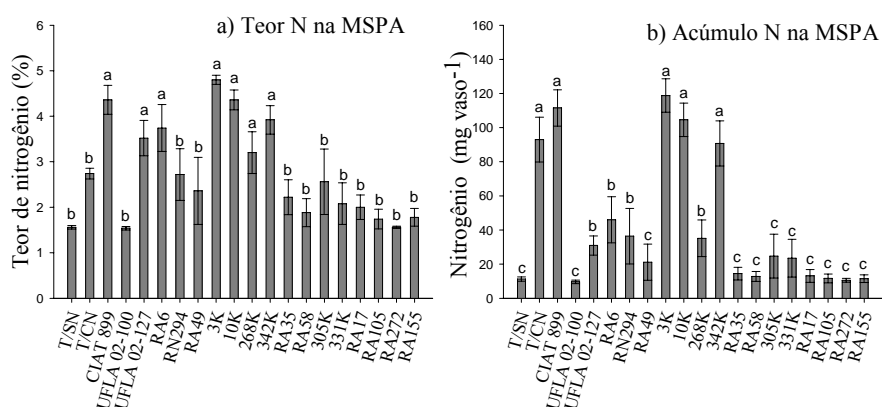


FIGURA 3. Teor de nitrogênio (a) e acúmulo de nitrogênio (b) do feijoeiro cv. Talismã inoculado com diferentes estirpes de rizóbio. Letras iguais indicam médias de um mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

As estirpes 3K, 10K, 342K e a CIAT899 apresentaram eficiência relativa inferior à da testemunha nitrogenada, variando de 68,0 a 77,0% (Figura 4), mas superaram os demais tratamentos. Barberi (2007), estudando algumas estirpes isoladas de solo da Amazônia na cultura do feijoeiro, também encontrou resultados semelhantes ao deste trabalho.

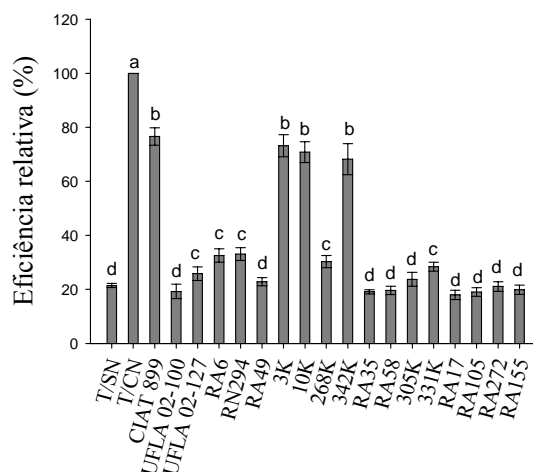


FIGURA 4. Eficiência relativa das estirpes inoculadas no feijoeiro cv. Talismã inoculado com diferentes estirpes de rizóbio. Letras iguais indicam médias de um mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

A matéria seca de nódulos correlacionou-se positivamente com ANPA ($r:0,82$; $p<0,01$), com TN ($r:0,75$; $p<0,01$). O número nódulos também apresentou uma boa correlação com ANPA ($r:0,72$; $p<0,01$), e com o TN ($r:0,77$; $p<0,01$). Correlações positivas e significativas entre a massa nodular e a quantidade de N fixado biologicamente foram relatadas também por Döbereiner et al. (1966), Bohrer & Hungria (1998) e Fernandes & Fernandes (2000).

Os resultados do experimento de casa de vegetação demonstram que as estirpes 3K, 10K e 342K obtiveram desempenho na simbiose com o feijoeiro semelhante ao da estirpe CIAT899 recomendada como inoculante, de acordo com os parâmetros de crescimento e nutrição mineral de N pelo feijoeiro. Essas estirpes são classificadas geneticamente como *Mesorhizobium* sp (Tabela 1), cujos genes de nodulação e FBN estão inseridos no cromossomo, indicando maior estabilidade genética, enquanto em *Rhizobium tropici* esses genes simbióticos estão no plasmídeo (pSym) e podem estar sujeitos a perdas em

condições adversas com altas temperaturas. As estirpes 3K, 10K e 342K, portanto apresentam maior potencialidade de uso como inoculante.

4.2 Tolerância a acidez e a Alumínio “in vitro”

As estirpes 3K, 10K e 342K, que apresentaram melhor eficiência simbiótica no ensaio em casa de vegetação e a estirpe CIAT899 (recomendada como inoculante) foram avaliadas quanto às suas respectivas tolerâncias a diferentes valores de pH e concentrações de Al^{3+} .

O máximo crescimento, determinado por meio das equações da Figura 5, foi obtido em pH 5,0 para as estirpes CIAT899, 3K, 10K e 342K nos tempos de 48, 72, 96 e 120 horas respectivamente (Tabela 2). Os números de UFC mL^{-1} analisados no tempo necessário para o máximo crescimento das estirpes foram bastante semelhantes entre os valores de pH, mas o tempo necessário para o máximo crescimento foi diferenciado. Essa diferença no tempo para atingir o máximo crescimento pode ser devido a mecanismos constitutivos, como a permeabilidade da membrana externa, junto com respostas adaptativas, incluindo o estado de crescimento bacteriano e mudanças na expressão de proteínas (Correa & Barneix, 1997), afetando o tempo de geração necessário para o crescimento das diferentes estirpes.

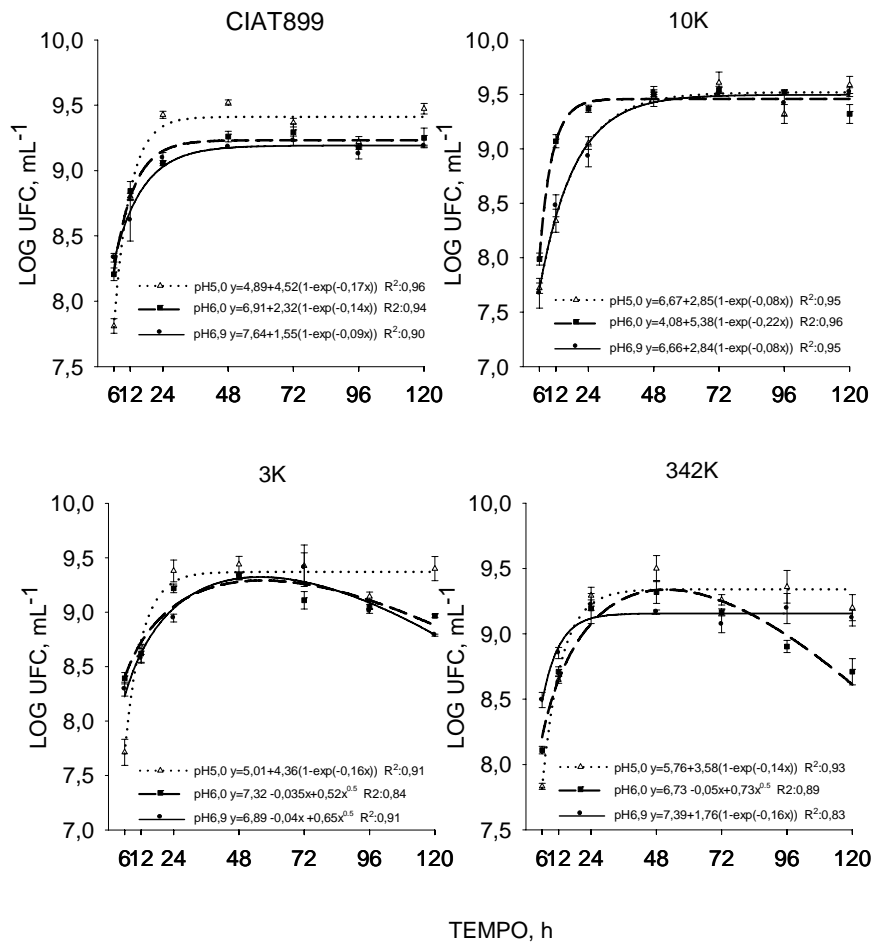


FIGURA 5. Crescimento das estirpes CIAT899, 10K, 3K e 342K em meio líquido em função do tempo e do pH de cultivo.

TABELA 2. Tempo necessário para o máximo crescimento das estirpes nos diferentes valores de pH do meio de cultivo.

Estirpes								
pH	CIAT899		10K		3K		342K	
	Tempo	UFC	Tempo	UFC	Tempo(h)	UFC	Tempo(h)	UFC
5,0	48	9,41	96	9,51	72	9,37	120	9,34
6,0	78	9,23	72	9,46	56,41	9,29	51,38	9,34
6,9	82	9,19	120	9,50	55,74	9,32	72	9,16

As estirpes 3K e 342K identificadas como *Mesorhizobium* sp., e a CIAT899 (*R. tropici*) tiveram melhor crescimento em pH 5,0, enquanto a estirpe 10K identificada como *Mesorhizobium loti* teve um crescimento diferenciado no pH 6,0 durante as primeiras 24 horas. Após 48 horas, o crescimento da estirpe 10K nos pH 5,0 e 6,9 assemelhou-se ao observado no pH 6,0 sendo que o crescimento bacteriano a partir deste período atingiu a fase estacionária (Figura 5 e Tabela 2).

A estirpe 3K no pH 5,0 também atingiu sua fase estacionária em 24 horas, entretanto para os pH 6, 0 e 6,9 este comportamento no crescimento não ocorreu, havendo um decréscimo na população bacteriana após 48 horas. Para a estirpe 342K, nos pH 5,0 e 6,9 a fase estacionária foi atingida após 24 horas de incubação, sendo que no pH 6,0 esta mesma fase não foi observada, ocorrendo uma diminuição no número de UFC mL⁻¹ a partir do período de 48 horas.

Após 120 horas foi medido o pH do meio e verificou-se que houve redução do pH inicial por todas as estirpes (Tabela 3). Isso pode ser explicado pelo fenômeno denominado “acid habituation” ou “adaptive tolerance response”, segundo Dilworth et al. (1999). Uma possível explicação para a tolerância a acidez apresentada pelos isolados 3K, 10K e 342K pode estar

relacionada com o fato de que as três estirpes foram isoladas de solos ácidos e com alto teor de Al^{3+} provenientes da região Amazônica Ocidental (Tabela 1).

TABELA 3. pH final do meio de cultivo após 120 horas de crescimento das estirpes nos diferentes valores iniciais de Ph

Estirpes				
pH	CIAT899	10K	3K	342K
5,0	4,65	4,72	4,61	4,67
6,0	4,75	4,80	4,80	4,70
6,9	6,37	6,26	6,30	6,30

Segundo Graham et al. (1994), estirpes ácido tolerantes de *R. tropici* possuem habilidade de manter o pH intracelular entre 7,2 e 7,5 quando o pH externo é ácido. Segundo Correa & Barneix (1997) a tolerância à acidez (pH 4,0) em *R. loti* está relacionada com a composição e estrutura da membrana celular e com a expressão de algumas proteínas. Alguns autores afirmam que a produção de algumas proteínas como glutatona fornecem proteção contra estresse oxidativo em *R. tropici*, são essenciais para o crescimento em condições ambientais extremas (Riccillo et al., 2000; Muglia et al., 2007).

Dessa maneira, pode-se constatar que as estirpes avaliadas no presente experimento devem possuir mecanismos intrínsecos de resistência a condições ácidas, uma vez que se mostraram tolerantes ao pH 5,0 quando crescidas em meio de cultivo líquido. Para um melhor entendimento dos fatores fisiológicos envolvidos nesta resistência a acidez das estirpes 3K, 342K e 10K identificadas pelo seqüenciamento do gene 16S rRNA como *Mesorhizobium* sp. (Lima 2007) avaliadas neste trabalho, seriam necessários novos testes para esclarecer os mecanismos envolvidos.

A densidade ótica é o resultado da soma do número de células presentes no meio de cultivo e da quantidade de exopolissacarídeos produzidos. Tomando-se como base o mesmo número de UFC para todas as estirpes na fase log ($10^{8,8}$ UFC mL⁻¹) e fazendo-se uso das equações de correlação da Tabela 4, foram obtidas as densidades óticas referentes apenas a produção quantitativa de exopolissacarídeos (Figura 6).

A produção de exopolissacarídeos foi diferenciada entre as estirpes, em função dos pH de cultivo (Figura 6). Em pH 6,9 as estirpes CIAT899, 3K e 10K apresentaram as maiores quantidades de exopolissacarídeos e quanto a estirpe 342K apresentou maior produção no pH de 6,0. A estirpe 3K, quando cultivada em pH 6,9, se destacou em relação as demais, com produção mais acentuada de exopolissacarídeos.

Nas condições de menor crescimento, com maior influência do pH na multiplicação celular das estirpes pode-se notar, no geral, maior produção de exopolissacarídeos (Figuras 5 e 6). Isto significa que as estirpes CIAT899 e 3K, que apresentaram menor crescimento em pH 6,9, produziram mais exopolissacarídeos neste pH. O mesmo pode ser visualizado para a estirpe 342K, que apresentou maior produção de exopolissacarídeos no pH em que o seu crescimento apresentou um decréscimo em função do tempo (pH 6,0). No caso da estirpe 10K a influência dos pH 5,0 e 6,9, reduzindo o seu crescimento até 48 horas, pode estar relacionada com uma maior produção de exopolissacarídeos nestes pH em relação ao pH 6,0.

Segundo Cunniihgan & Munns (1984), Miguel & Moreira (2001) e Barberi et al. (2004), a produção de polissacarídeos extracelulares está associada a maior tolerância a acidez. Os dados encontrados no presente trabalho indicaram que as três estirpes estudadas, por serem provenientes de ambiente com alta acidez, desenvolveram-se de maneira eficiente no pH 5,0. Ficou evidenciado que a maior produção de exopolissacarídeos está associada com o

pH onde o crescimento bacteriano foi mais inibido, o que diferencia em parte do relatado pelos autores citados acima. No entanto, estes resultados demonstram que uma maior produção de exopolissacarídeos pode estar relacionada com uma resposta adaptativa às condições ambientais estressantes para o desenvolvimento microbiano.

TABELA 4. Equações e coeficientes de correlação entre UFC/mL e densidade ótica das estirpes testadas a diferentes valores de pH do meio de cultivo.

Estirpes	pH: 5,0	pH: 6,0	pH: 6,9
CIAT899	Y=3,51x+7,58 r:0,96**	Y=1,67x+8,10 r:0,97**	Y=1,27+8,21 r:0,95**
3K	Y=3,91x+7,4 r:0,98**	Y=1,26+8,31 r:0,83**	Y=1,22+8,22 r:0,76**
10K	Y=2,79x+7,85 r:0,93**	Y=1,59+8,40 r:0,82**	Y=2,34+7,82 r:0,94**
342K	Y=3,13x+7,67 r:0,97**	Y=1,19+8,22 r:0,66 ^{ns}	Y=0,90x+8,52 r:0,86**

** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste de t.

^{ns} Não significativo a 1% de probabilidade.

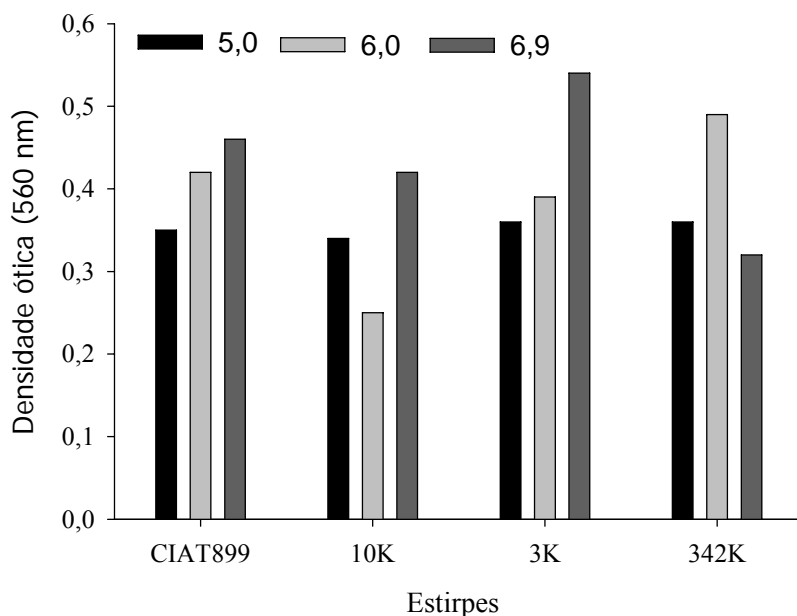


FIGURA 6. Densidade ótica das estirpes em $10^{8,8}$ UFC mL⁻¹, correspondente a produção de exopolissacarídeos em função do pH de cultivo

O efeito do aumento das concentrações de alumínio no meio de cultivo sobre o crescimento das estirpes selecionadas encontra-se na Figura 7. Verifica-se que as estirpes CIAT899, 342K e 3K tiveram crescimentos semelhantes nas concentrações 0,0 e 0,5 cmol_c L⁻¹ de Al³⁺, enquanto que em 0,5 cmol_c L⁻¹ de Al³⁺ a estirpe 10K demonstrou decréscimo no crescimento a partir de 48 horas.

Na concentração de 1,0 cmol_c L⁻¹ de Al³⁺ a estirpe CIAT899 apresentou crescimento exponencial até 72 horas, ocorrendo leve redução após este tempo. Para a estirpe 3K, um decréscimo em seu crescimento foi observado já a partir de 48 horas. A mesma multiplicação celular não foi observada para a estirpe 10K em 1,0 cmol_c L⁻¹ de Al³⁺, havendo uma redução brusca no número de UFC mL⁻¹ ao longo do período analisado. Com relação à estirpe 342K, o crescimento

constante a partir de 24 horas em 1,0 cmol_c L⁻¹ de Al³⁺, indica uma tolerância ao estresse de alumínio da mesma, quando avaliada nestas condições. Não houve crescimento das estirpes CIAT899, 342K, 10K e 3K na concentração de 2,0 cmol_c L⁻¹ de Al³⁺ havendo uma redução no número de UFC mL⁻¹ por tempo (Figura 7).

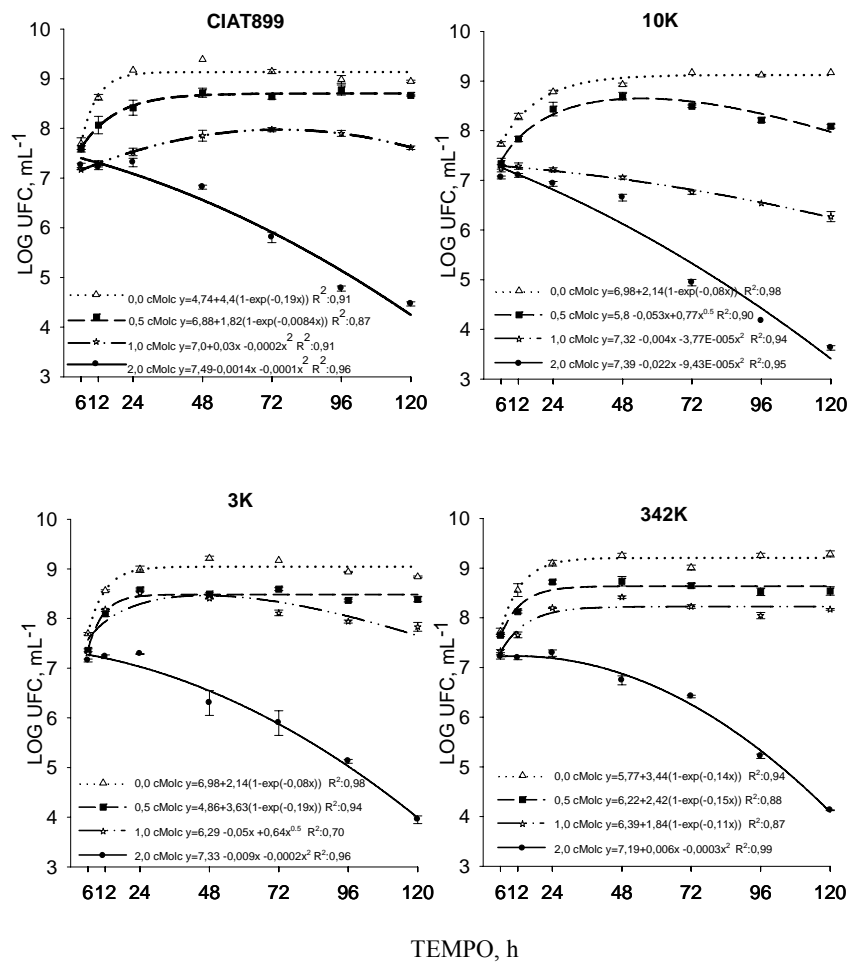


Figura 7. Crescimento das estirpes CIAT899, 10K, 3K e 342K em meio líquido em função das diferentes concentrações de Al³⁺ no meio de cultivo.

O crescimento máximo foi obtido na concentração de 0,0 $\text{cmol}_c \text{L}^{-1}$ de Al^{3+} , para as estirpes CIAT899, 10K, 3K e 342K nos tempos de 72, 120, 72 e 96 horas respectivamente (Tabela 5). O crescimento na concentração de 2,0 $\text{cmol}_c \text{L}^{-1}$ de Al^{3+} foi afetado, mostrando assim que alta concentração de alumínio em meio de cultura líquido é um fator limitante para o crescimento de estirpes de rizóbio.

TABELA 5. Tempo necessário para o máximo crescimento das estirpes em diferentes concentrações de Al em meio líquido.

Estirpes								
Al^{3+}	CIAT899		10K		3K		342K	
	Tempo(h)	UFC	Tempo(h)	UFC	Tempo(h)	UFC	Tempo(h)	UFC
0,0	72	9,13	120	9,12	72	9,04	96	9,21
0,5	120	8,70	54,26	8,64	72	8,48	72	8,64
1,0	74,53	7,98	6	7,29	46,31	8,46	96	8,23
2,0	6	7,40	6	7,26	6	7,27	11,61	7,23

Os resultados obtidos demonstraram que a estirpe 342K foi tolerante a concentrações de alumínio de até 1,0 $\text{cmol}_c \text{L}^{-1}$ de Al^{3+} , enquanto as estirpes CIAT899 e 3K, na mesma concentração, já tiveram afetado seu crescimento. Esta tolerância não pode ser, entretanto, observada para a estirpe 10K, que apresentou crescimento exponencial apenas em meio de cultura com 0,5 $\text{cmol}_c \text{L}^{-1}$ de Al^{3+} . Hara & Oliveira (2004 e 2005) também estudaram a tolerância de estirpes de rizóbio oriundas de solo ácidos da Amazônia, encontrando isolados que foram tolerantes a 2 $\text{cmol}_c \text{L}^{-1}$ de Al^{3+} em meio de cultura sólido. Vargas & Denardin (1992), estudando isolados de rizóbio de diferentes áreas de cultivo de feijoeiro, encontraram que 77 estirpes foram capazes de sobreviver em 100 μM de Al^{3+} em meio sólido. Karanja & Wood (1988) avaliando a tolerância de *R.*

phaseoli em diferentes concentrações de Al^{3+} em meio sólido e líquido, não encontraram relação positiva quanto ao comportamento das estirpes nos diferentes meios. Segundo estes autores, as estirpes que cresceram em meio sólido com 20 e 50 μ M de Al^{3+} não conseguiram crescer em meio líquido com as mesmas concentrações, mostrando maior atividade do alumínio no meio líquido. Em estudos de tolerância de rizóbios a metais, Angle et al. (1993) observaram que as estirpes que cresciam em meio sólido não cresciam em meio líquido devido a uma maior atividade dos metais neste meio. Avaliando a tolerância a Al^{3+} em meio líquido de 10 isolados de nódulos de plantas de acácia-negra, Vargas et al. (2007) encontraram que 50 μ M de Al^{3+} não afetou o crescimento dessas estirpes em meio de cultura líquido.

O pH foi medido após 120 horas e observou-se que na concentração de 0,0 $cmol_c L^{-1}$ de Al^{3+} o pH do meio de cultura ficou na faixa de 4,5 para as quatro estirpes, já nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 $cmol_c L^{-1}$ de Al^{3+} houve um redução no pH do meio (Tabela 6).

TABELA 6. pH final do meio de cultivo após 120 horas de crescimento das estirpes nos diferentes concentrações de Al^{3+}

Estirpes				
Al^{3+}	CIAT899	10K	3K	342K
0,0	4,43	4,38	4,35	4,35
0,5	3,9	3,96	3,95	3,95
1,0	4,2	4,00	4,10	3,95
2,0	4,11	4,16	4,08	4,19

Tomando-se como base o máximo crescimento das estirpes e fazendo-se uso das equações de correlação da tabela 7, os dados foram transformados pela equação $Y=-\text{LOG}(D.O/UFC)$ sendo obtidas densidades referentes apenas à

produção de exopolissacarídeos por UFC mL⁻¹. A produção de exopolissacarídeos mostrou-se constante para as estirpes 3K, 10K, 342K e CIAT899 em função das concentrações de alumínio no meio de cultivo avaliados neste trabalho (Figura 8).

TABELA 7. Equações e coeficientes de correlação da UFC e densidade ótica das estirpes testadas.

Estirpes	0,0 cMolc	0,5 cMolc	1,0 cMolc	2,0 cMolc
CIAT899	Y=3,21x+7,5 r:0,97**	Y=2,96x+7,5 r:0,99**	Y=2,37x+7,27 r:0,84**	Y=-72,92x+8,45 r:0,54 ^{ns}
10K	Y=2,84x+7,7 r:0,98**	Y=2,20x+7,6 r:0,70**	Y=-3,97x+7,44 r:0,89**	Y=-125,98x+9,81 r:0,89**
3K	Y=2,56x+7,8 r:0,90**	Y=1,90x+7,8 r:0,72**	Y=0,54x+7,99 r:0,14 ^{ns}	Y=-94,31x+9,04 r:0,61 ^{ns}
342K	Y=3,12x+7,6 r:0,94**	Y=2,35x+7,7 r:0,87**	Y=2,33x+7,56 r:0,76**	Y=-151,98x+10,6 r:0,91**

** Significativo a 1% de probabilidade pelo teste de t.

^{ns} Não significativo a 1% de probabilidade.

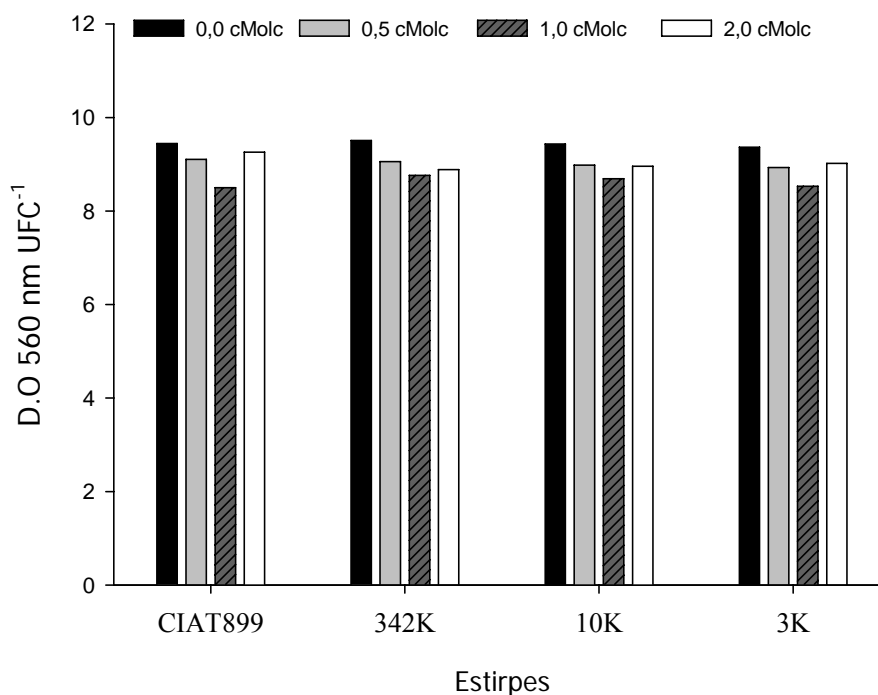


FIGURA 8. Densidade ótica das estirpes por UFC, considerando as diferentes concentrações de Al^{+3} no meio de cultivo

Resultados semelhantes foram encontrados por Kingsley & Bohlool (1992), que avaliando a produção de exopolissacarídeos em uma estirpe de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*, encontraram que em meios contendo de 0 a 300 μM de Al a estirpe alumínio tolerante não apresentou variações na produção destes compostos. Os mesmos autores analisando o comportamento de uma estirpe mutante para a produção de EPS observaram que esta estirpe *exo*⁻ foi igualmente tolerante ao Al quando comparada com a estirpe selvagem. Estes resultados sugerem que estes compostos não são intimamente relacionados à tolerância a toxicidade ao Al em estirpes ácido tolerantes, podendo ocorrer outros mecanismos que estejam atuando na tolerância a este elemento.

Os mecanismos de tolerância ao alumínio encontrados em isolados de rizóbio parecem estar relacionados com a diminuição da quantidade de carga negativa na superfície celular, diminuindo a ligação da célula com o alumínio (Bushby, 1990); acúmulo de fosfato inorgânico no interior da célula, neutralizando o efeito do alumínio pela formação de complexos insolúveis biologicamente não tóxicos (Mukherjee & Asanuma, 1998); e aumento dos níveis de potássio e fósforo ligados à manutenção do pH interno (Mukherjee & Asanuma, 1998; Watkin et al., 2003).

Os isolados avaliados neste estudo mostraram-se tolerantes à acidez e ao alumínio, porém estes isolados necessitam ser testados ainda em simbiose com a planta na presença destes fatores limitantes. A possibilidade de obtenção de estirpes tolerantes à acidez do solo, especialmente ao alumínio, pode proporcionar aumentos de rendimento da leguminosa hospedeira resultante de uma fixação mais eficiente do N₂, no entanto, é importante que a planta também esteja adaptada a essas condições de solo e, por isso, estudos relacionando a eficiência simbiótica e a tolerância a fatores ambientais adversos devem continuar.

Alguns autores afirmam que a espécie *Rhizobium tropici* é tolerante à acidez, como demonstrado em vários trabalhos para a estirpe CIAT899 (Martinez-Romero et al., 1991; Graham et al., 1994; Riccillo et al., 2000; Muglia et al., 2007). Entretanto, a partir dos resultados do presente trabalho, ficou evidenciado que outras espécies de rizóbio tais como *Mesorhizobium* sp. também apresentam esta característica de tolerância à acidez. Outro fato relevante é o baixo número de estirpes de *R. tropici* testadas nos trabalhos de Martinez-Romero et al. (1991) e Graham et al. (1994), o que impossibilita fazer generalizações sobre a tolerância desta espécie, podendo haver tolerâncias diferenciadas dentro da mesma espécie.

5 CONCLUSÕES

- A inoculação com as estirpes 3K, 10k e 342K proporcionou maior crescimento das plantas, maior nutrição de nitrogênio e boa nodulação no quando comparadas com a estirpe recomendada como inoculante e a testemunha nitrogenada.
- As estirpes 3K, 10K e 342K mostraram-se tolerantes à acidez em meio de cultura líquido.
- A estirpe 10K apresentou tolerância à acidez, esta estirpe mostrou-se sensível a presença de alumínio no meio de cultura.
- Concentrações acima de $1 \text{ cmol}_c \text{ Al}^{3+}$ inibiram o crescimento das estirpes 3K, 10k, 342K e CIAT899.
- A tolerância ao pH esta relacionada a maior produção de exopolissacarídeos pelas estirpes, o mesmo não ocorreu com relação ao Al^{3+} .

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALVA, A. K.; ASSHER, C. J.; EDWARDS, D. G. Effect of solution pH, external calcium concentration and aluminum activity on nodulation and early growth of cowpea. **Australian Journal Agricultural Resesearch**, Collingwood, v. 41, n. 2, p. 359–365, 1990

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

AMBROSANO, E. J.; TANAKA, R. T.; MASCARENHAS, H. A. A.; RAIJ, B. van; QUAGGIO, J. A.; CANTARELLA, H. Leguminosas e oleaginosas. In: RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI A. M. C. (Ed.). **Recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo**. 2. ed. Campinas: Instituto Agrônômico/Fundação IAC, 1997. Cap. 19, p. 187-199.

ANGLE, J. S.; McGRATH, S. P.; CHAUDRI, A. M.; CHANEY, R. L.; GILLER, K. E. Inoculation effects on legumes grown in soil previously treated with sewage sludge. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 25, n. 5, p. 575-580, May 1993.

BALLEN, K.G., GRAHAM, P. H., JONES, R. K., BOWERS, J. H. Acidity and calcium interaction affecting cell envelope stability in Rhizobium. **Canadian Journal Microbiology**, v. 44, n. 6, p. 582-587, June 1998.

BARBERI, A. **Diversidade e eficiência de bactérias que nodulam feijoeiro de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia ocidental**. 2007. 121 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

BARBERI, A.; MOREIRA, F. M. S.; FLORENTINO, L. A.; RODRIGUES, M. I. D. Crescimento de *Bradyrhizobium elkanii* estirpe BR 29 em meios de cultivo com diferentes valores de pH inicial. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 2, p. 397-405, mar./abr. 2004.

BOHRER, T. R. J.; HUNGRIA, M. Avaliação de cultivares de soja quanto à fixação biológica do nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 6, p. 937-952, jun. 1998.

BRASIL. Ministerio da Agricultura, Pecuaria e Abastecimento. 2008. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>.

BUSHBY, H. V. A. The role of bacterial surface charge in the ecology of root nodule bacteria: a hypothesis. **Soil Biology Biochemistry**, v. 22, n. 1, p. 1-9, 1990.

CAMPO, R. J.; WOOD, M. Residual effects of successive exposure of soybean *Bradyrhizobium* strains to aluminum on solid defined medium. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 11, p. 1399-1407, nov. 2001.

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ, V. V. H.; BARROS, N. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. SBCS. **Fertilidade do solo**. Viçosa, MG: UFV, 2007. 1017 p.

CARVALHO, E. A. **Avaliação agronômica da disponibilização de nitrogênio a cultura de feijão sob sistema de semeadura direta**. 2002. 80 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

CARVALHO, M. A. C.; ARF, O.; SÁ, M. E.; BUZETTI, S.; SANTOS, N. C. B.; BASSAN, D. A. Produtividade e qualidade de sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) sob influência de parcelamentos e fontes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, viçosa, MG, v. 25, n. 3, p. 617-624, ju./set. 2001.

CHEN, H. C.; RICHARDSON, A. E.; ROLFE, B. G. Studies on the physiological and genetic basis of acid tolerance in *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. , p. 1798–1804, June 1993a.

CHEN, H. C.; GARTNER, E.; ROLFE, B. G. Involvement of genes on a megaplasmid in the acid-tolerant phenotype of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, p. 1058–1064, Apr. 1993b.

CHEN, W. X.; LI, G. S.; QI, Y. L.; WANG, E. T.; YUAN, H. L.; LI, J. L. *Rhizobium huahuui* sp.nov. isolated from root nodules of *Astragalus sinicus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 41, n. 2, p. 275-280, Apr. 1991.

CORREA, O. S.; BARNEIX; A. J. Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loti*. **World Journal Microbiology Biotechnology**, London, v. 13, n. 2, p. 153–157, Mar. 1997.

CUNNINGHAM, S. D.; MUNNS, D. N. The correlation between extracellular polysaccharide production and acid tolerance in *Rhizobium*. **Soil Science Society America Journal**, Madison, v. 48, n. 6, p. 1213–1226, Nov./Dez. 1984.

DE MAAGD, R. A.; WIENTJES, F. B.; LUGTENBERG, B. J. J. Evidence for divalent cation (Ca²⁺) stabilized oligomeric proteins and covalently bound protein peptidoglycan complexes in the outer membrane for *Rhizobium leguminosarum*. **Journal Bacteriology**, Washington, v. 171, n. 7, p. 3899-3995, July 1989.

DILWORTH, M. J.; RYNNEF, G.; CASTELLI, J. M., VIVAS-MARFISI, A. I.; GLENN, A. R. Survival and exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti* WSM419 are affected by calcium and low pH. **Microbiology**, Reading, v. 45, n. 7, p.1585-1593, July 1999.

DÖBEREINER, J.; ARRUDA, N. B.; PENTEADO, A. F. Avaliação da fixação do nitrogênio em leguminosas pela regressão do N total das plantas sobre o peso de nódulos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 1, p. 233-237, 1966.

FERNANDES, M. F.; FERNANDES, R. P. M. Seleção inicial e caracterização parcial de rizóbios de tabuleiros costeiros quando associados ao guandu. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 24, n. 2, p. 321-327, abr./jun. 2000.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Programas e Resumos...**São Carlos: UFSCar, 2000. p. 235.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Disponível em: <<http://apps.fao.org>>. Acesso em: 21 jul. 2007.

FREY, S. D.; BLUM, L. K. Effect of pH on competition for nodule occupancy by type I and type II strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 163, n. 2, p. 157-164, June 1994.

FUJIHARA, S.; YONEYAMA, D. T. Effects of pH and osmotic stress on cellular polyamine contents in the soybean rhizobia *Rhizobium fredii* p220 and *Bradyrhizobium japonicum* A 1017. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 4, p. 1104–1109, Apr. 1993.

GOSS, T. J.; O'HARA, G. W.; M. J. DILWORTH, M. J.; GLENN, A. R. Cloning, characterization, and complementation of lesions causing acid sensitivity in Tn5-induced mutants of *Rhizobium meliloti* WSM419. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 172, n. 9, p. 5173–5179, Sept. 1990.

GRAHAM, P. H. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, n. 6, p. 475-484, June 1992.

GRAHAM, P. H.; DRAEGER, K.; FERREY, M. L.; CONROY, M. J.; HAMMER, B. E.; MARTINEZ, E.; NAARONS, S. R.; QUINTO, C. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. **Canadian Journal Microbiology**, Ottawa, v. 40, n. 3, p. 198–207, Mar. 1994.

GRAHAM, P.H. Some problems of nodulation; symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L.: review. **Field Crops Research**, v. 4, p. 93-112, 1981.

GRAHAM, P. H.; HALLIDAY, J. Inoculation; nitrogen fixation in the gender *Phaseolus*. In: REUNIAO LATINO AMERICANA DE RHIZOBIUM, 8., 1976, Cali. **Anais...** Cali: CIAT, 1976. p. 313-337.

GRAHAM, P. H.; ROSAS, J. C. Growth and development of indeterminate bush and climbing cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. inoculated with *Rhizobium*. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 88, p. 503-508, Apr. 1977.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 34, n. 3, p. 343-357, set. 2004.

HARA, F. A. S.; OLIVEIRA, L. A. Características fisiológicas e ecológicas de rizóbios oriundos de solos ácidos de Iranduba, Amazonas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 7, p. 667-672, jul. 2005.

HARDARSON, G.; BLISS, F. A.; CIGALES-RIVERO, M. R.; HENSON R. A.; KIPE-NOLT, J. A.; LONGERI, L.; MANRIQUE, A.; PENA-CABRIALES, J. J.; PEREIRA, P. A. A.; SANABRIA, C. A.; TSAI, S. M. Genotypic variation in biological nitrogen fixation by common bean. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 152, n. 1, p. 59-70, May 1993.

HICKEY, E. W.; HIRSHFIELD, I. N. Low-pH-induced effects on patterns of

protein synthesis and on internal pH in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, n. 1, p.1038–1045, May 1990.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: California Agricultural Experiment Station, 1950. 32 p.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CHUEIRE, L. M. de O.; MEGÍAS, M. Characterization of new efficient and competitive strains for the bean (*Phaseolus vulgaris* L.) crop in Brazil. In: MARTINEZ, E.; HERNANDEZ, G. (Ed.). **Highlights on Nitrogen Fixation Research**. New York: Plenum, 1999. p. 251-254.

HUNGRIA, M.; STACEY, G. Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: basic aspects and potential application in agriculture. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v. 29, n. 5-6, 519-830, May/June, 1997.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M. A. T.; ARAUJO, R. S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. In: VARGAS, M. A. T., HUNGRIA, M. (Ed.). **Biologia dos Solos dos Cerrados**. Planaltina: EMBRAPA/CPAC, 1997. p. 189-295.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CHUEIRE, L. M. O.; PROBANZA, A.; GUTTIERREZ-MAÑERO, F. J.; MEGIAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 32, n. 11/12, p. 1515-1528, Oct. 2000

IGUAL, J. M.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C.; CERVANTES, E. The effects of aluminum on nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Casuarina cunninghamiana* Miq. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 190, n. 1, p. 41-46, Mar. 1997.

JOHNSON, A. C.; WOOD, M. DNA, a possible site of action of aluminum in *Rhizobium* spp. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 56, n. 12, p.3629–3633, Dec. 1990.

JORDAN, D. C. Family III. Rhizobiaceae. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams and Wilkins, 1984. v. 1, p. 234-244.

KARANJA, N. K.; WOOD, M. Selecting *Rhizobium phaseoli* strains for use with beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Kenya: Infectiveness and tolerance of acidity and aluminium. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 112, n. 1, p. 7-13, Nov. 1988.

KINGSLEY, M. T.; BOHLOOL, B. B. Extracellular polysaccharide is not responsible for aluminum tolerance of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* CIAT899. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, n. 4, p.1095-1101, 1992.

LAWN, R.J.; BRUN, W. A. Symbiotic nitrogen fixation in soybean. Effect of photosynthetic source sink manipulations. **Crop Science**, Madison, v. 14, n. 1, p.11-16, Jan./Feb. 1974.

LEMOS, L. B.; FORNASIERI FILHO, D.; CAMARGO, M. B.; SILVA, T. R. B.; SORATTO, R. P. Inoculação de rizóbio e adubação nitrogenada em genótipos de feijoeiro. **Agronomia**, Seropédica, v. 37, n. 1, p. 27-32, 2003.

LIMA, A. S. **Diversidade e eficiência de bactérias fixadoras de N₂ que nodulam siratro de diferentes sistemas de uso da terra na Amazônia ocidental**. 2007. 167 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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

MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGOVIA, L.; MERCANTE, F. M.; FRANCO, A. A.; GRAHAM, P.; PARDO, M. A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 41, n. 3, p. 417-426, July 1991.

MCKAY, I. A.; DJORDJEVIC, M. Production and excretion of nod metabolites by *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* are disrupted by the same environmental factors that reduce nodulation in the field. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 59, n. 10, p. 3385-3392, Oct. 1993.

MENDES, I. C.; SUHET, A. R.; PERES, J. R. R.; VARGAS, M. A. T. Eficiência fixadora de estirpes de rizóbio em duas culturas de feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 421-425, set./dez. 1994.

MIGUEL, D. L.; MOREIRA, F. M. S. Influência do pH do meio de cultivo e da turfa no comportamento de estirpes de *Bradyrhizobium*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 25, n. 4, p. 873-883, out./dez. 2001.

MILES, A. A.; MISRA, S. S. The estimations of the bacteriocidal Power of the blood. **Journal Hygiene**, Cambridge, v.38, n.6, p.732-749, 1938.

MOREIRA, F. M. S.; CRUZ, L. M.; FARIA, S. M.; MARSH, T.; MARTINEZ-ROMERO, E.; PEDROSA, F. O.; PITARD, R.; YOUNG, P. J. W. *Azorhizobium doebereineriae* sp. Nov. microsymbiont of *Sesbania virgata* (Caz.) Pers. **Systematic and Applied Microbiology**, Oxford, v. 29, n. 3, p.197-206, Apr. 2006.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

MOREIRA, F. M. S. Fixação biológica de nitrogênio em espécies arbóreas. In: ARAÚJO R. S.; HUNGRIA, M. (Ed.). **Microorganismo de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA, 1994. P.121-150.

MORRISON, S. L.; BAIRD, L. M. Relationship of plant development to nodulation um determinate; indeterminate bean. **Journal of the American Society Horticultural Science**, Alexandria, v.112, n. 3, p. 510-513, May 1987.

MOSTASSO, L.; MOSTASSO, F. L.; DIAS, B. G.; VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. Selection of bean (*Phaseolous vulgaris* L.) rhizobial strains for the Brazilian Cerrados. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 73, n. 2/3, p. 121-132, Jan. 2001.

MUGLIA, C. I.; GRASSO, D. H.; AGUILAR, O. M. *Rhizobium tropici* response to acidity involves activation of glutathione synthesis. **Microbiology**, Readings, v. 153, n. 4, p. 1286-1296, Apr. 2007.

MUKHERJEE, S. K.; ASANUMA, S. Possible role of celular phosphate pool and subsequent accumulation of inorganic phosphate on the aluminum tolerance in

Bradyrhizobium japonicum. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v. 30, n. 12, p. 1511-1516, Oct. 1998.

MYTTON, L. R. Developing a breeding strategy to exploit quantitative variation in symbiotic nitrogen fixation. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 82, n. 3, p. 329-335, 1984.

NEHMI, I. M. D.; FERRAZ, J. V.; NEHMI FILHO, V. A.; SILVA, M. L. (Coords.). In: **AGRIANUAL 2000: anuário estatístico do Brasil**. São Paulo: Argos Comunicações, 1999. p. 507-520.

NOBREGA, R. S. A. **Ocorrência e Diversidade de Bactérias que Nodulam Caupi Isoladas de Solos da Amazônia Ocidental Sobre Diferentes Sistemas de Uso da Terra**. 2006. 94 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

NORRIS, V.; CHEN, M.; GOLDBERG, M.; VOSKUIL, J.; MCGURK, G. HOLLAND, I. B. Calcium in bacteria. A solution to which problem? **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 5, n. 4, p. 775-778, 1991.

O'HARA, G. W.; GOSS, T. J.; DILWORTH, M. J.; GLENN, A. R. Maintenance of intracellular pH and acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, n. 8, p. 1870-1876, Aug. 1989.

PEREIRA, P. A. A. Evidências de domesticação e disseminação do feijoeiro comum e conseqüências para o melhoramento genético da espécie. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 1, p. 19-23, jan. 1990.

PERES, J. R. R.; SUHET, A. R.; MENDES, I. C.; VARGAS, M. A. T. Efeito da inoculação com rizóbio e da adubação nitrogenada em sete cultivares de feijão em solo de cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 415-420, set./dez. 1994.

RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. F. B.; CARNEIRO, J. E. S.; GONCALVES, F. M. A.; SANTOS, J. B.; PELOSO, M. J. D.; FARIA, L. C.; CARNEIRO, G. E. S. **O "Talismã" de sua Lavoura de Feijoeiro**. Brasília, DF: EMBRAPA/CNPAP, 2002. 4 p. (Comunicado Técnico, 36).

RENNIE, R. J.; KEMP, G. A. N₂ fixation in field beans quantified by ¹⁵N dilution. I. Effect of strains of *Rhizobium phaseoly*. **Agronomy Journal**, Madison, v. 75, n. 4, p. 640-644, July/Aug. 1983.

RICCILLO, P. M.; MUGLIA, C. I.; BRUIJN, F. J.; ROE, A. J.; BOOTH, I. R.; AGUILAR, O. M. Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 182, n. 6, p. 1748-1753, Mar. 2000.

RICHARDSON, A. E.; SIMPSON, R. J.; DJORDJEVIC, M. A.; ROLFE, B. J. Expression of nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* is affected by low pH and by Ca²⁺ and Al ions. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, n. 10, p. 2541-2548, Oct. 1988.

ROSALEM, C. A.; MARUBAYASHI, O. M. Seja o doutor do seu feijoeiro. **Informações Agronômicas**, n. 68, dez. 1994. Encarte.

RUSCHEL, A. P.; VOSE, R. B.; MATSUI, E.; VICTORIA, R. L.; SAITO, S. M. T. Field evaluation of N₂ fixation and N utilization by *Phaseolus* bean varieties determined by ¹⁵N isotope dilution. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 65, n. 3, p. 367-407, 1982.

SA, T. M.; ISRAEL, D. W. Nitrogen assimilation in nitrogen fixing soybean plants during phosphorus deficiency. **Crop Science**, Madison, v. 35, n. 3, p. 814-820, May/June 1995.

SAITO, S. M. T. Avaliação em campo da capacidade de fixação simbiótica de estirpes de *Rhizobium phaseoli*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 17, n. 7, p. 999-1006, jul. 1982.

SALVADOR, J. O.; MURAOKA, T.; ROSSETO, R.; RIBEIRO, G. A. Sintomas de deficiências nutricionais em cupuaçuzeiro (*Theobroma grandiflorum*) cultivado em solução nutritiva. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 51, n. 3, p. 407-414, set./dez. 1994.

SARRUGE, J. R.; HAAG, H. P. **Análises químicas em plantas**. Piracicaba: ESALQ/USP, 1979. 27 p.

SCHOLLA, L.; ELKAN, G. H. *Rhizobium fredii* sp.nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybean. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 34, n. 4, p. 484-486, 1984.

SEGOVIA, L.; YOUNG, J.P.W.; MARTINEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. Nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 43, n. 2, p. 374-377, Apr. 1993

SOARES, A. L. de L.; FERREIRA, P. A. A.; PEREIRA, J. P. A. R.; VALE, H. M. M. do; LIMA, A. S.; ANDRADE, M. J. B. de; MOREIRA, F. M. de S. Eficiência Agronômica de Rizóbios selecionados e diversidade de populações nativas nodulíferas em Perdões, MG. II-Feijoeiro. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, MG, v. 30, n 5, p. 803-811, 2006.

STRALIOTTO, R. **A importância da inoculação com rizóbio na cultura do feijoeiro**. [S.l.]: Embrapa/CNPAB, 2002. Disponível em: <http://www.cnpab.embrapa.br/pesquisas/fbnl_inocula_feijoeiro.html#>. Acesso em: 15 jul. 2003.

STRALIOTTO, R.; RUMJANEK, N. G. **Biodiversidade do rizóbio que nodula o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e os principais fatores que afetam a simbiose**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1999. 51 p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 94).

TAN, Z. Y.; KAN, G. X.; WANG, E. T.; REINHOLD-HUREK, B.; CHEN, W. X. *Rhizobium yanglingense* sp. nov. isolated from arid and semi-arid regions in China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, n.3, p. 901-914, May 2001.

TOLEDO, I.; LLORET, L.; MARTINEZ-ROMERO, E. *Sinorhizobium americanum* sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico. **Systematic and Applied Microbiology**, Jena, v. 26, n. 1, p. 54-64, Mar. 2003.

TSAI, S. M.; BONETTI, R.; AGBALA, S. M.; ROSSETO, R. Minimizing the effect of mineral nitrogen on biological nitrogen fixation in common bean by increasing nutrient levels. **Plant and Soil**, The Hague, v. 152, n. 1, p. 131-138, May 1993.

Van BERKUN, P.; BEYENE, D.; BAO, G.; CAMPBELL, T. A.; EARDLY, B. *Rhizobium mongolense* sp. nov. is one of three rhizobial genotypes identified which nodulate and from nitrogen fixing symbioses with medicago ruthenica

[(L.)] ledebour. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 48, n. 1, p.13-22, Jan. 1998.

VARGAS, A. A. T.; DENARDIN, N. D. Tolerancia à acidez e ao alumínio do solo, de cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv. *Phaseoli* isoladas no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Campinas, v. 16, n. 3, p. 337-342, set./dez. 1992

VARGAS, A. A. T.; GRAHAM, P. H. Phaseolus vulgaris variety and Rhizobium strain variation in acid-pH tolerance and nodulation under acid conditions. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.19, p.91-101, 1998.

VARGAS, L. K.; LISBOA, B.B.; SCHOLLES, D.; SILVEIRA, J. R. P.; JUNG, G. C.; GRANADA, C. E. NEVES, G.; BRAGA, M. M.; NEGREIROS, T. Diversidade genética e eficiência simbiótica de rizóbios nodulares de acácia-negra de solos do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, MG, v. 31, n. 4, p. 647-654, jul/ago. 2007.

VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. **Biologia dos Solos dos Cerrado**. Planaltina: EMBRAPAC, 1997. 524 p.

VASSILEVA, V.; MILANOV, G.; IGNATOV, G.; NIKOLOV, B. Effect of low pH on nitrogen fixation of common bean grown at various calcium and nitrate levels. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 20, n. 2-3, p. 279-294, 1997.

VINCENT, J. M. A. **Manual for the Pratical Study of root-nodule bacteria**. IBP Handbook, 1970. 164p.

WANG, E. T.; ROGEL-HERNANDEZ, A.; SANTOS, A. G.; MARTINEZ-ROMERO, J.; CEVALLOS, M.; MARTINEZ-ROMERO, E. *Rhizobium etli* bv. *mimosae*, a móvel biovar isolated from mimosae affinis. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Reading, v. 49, n. 4, p.1479-1491, Oct. 1999.

WATKIN, E. L. J.; O'HARA, G. W.; GLENN, A. R. Physiological responses to acid stress of an acid-soil tolerant and acid-soil sensitive strain of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v. 35, n. 4, p.621-624, Apr. 2003.

WOOD, M. A mechanism of aluminum toxicity to soil bacteria and possible ecological implications. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 171, n. 1, p. 63-69, Apr. 1995.

WOOD, M.; COOPER, J. E.; BJOURSON, A. J.. Response of *Lotus rhizobia* to acidity and aluminum in liquid culture and in soil. **Plant Soil**, Dordrecht, v. 107, n. 2, p. 227–231, 1988.

ZILLI, J. E.; ALMEIDA, D. L.; RUMJANEK, N. G.; NEVES, M. C. P.
Levantamento da biodiversidade de rizóbio em diferentes áreas de um sistema integrado de produção agroecológica. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 1998. 15 p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 69).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)