

**Documentos**

ISSN 0104-6187

Número, 94

Novembro, 1999



**BIODIVERSIDADE DO RIZÓBIO QUE NODULA O  
FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.) E OS PRINCIPAIS  
FATORES QUE AFETAM A SIMBIOSE**



---

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Agrobiologia  
Ministério da Agricultura e do Abastecimento**

***República Federativa do Brasil***

***Presidente***

*Fernando Henrique Cardoso*

***Ministério da Agricultura e do Abastecimento***

***Ministro***

*Marcus Vinicius Pratini de Moraes*

***Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa***

***Diretor Presidente***

*Alberto Duque Portugal*

***Diretores***

*Elza Ângela Battaggia Brito da Cunha*

*Dante Daniel Giacomelli Scolari*

*José Roberto Rodrigues Peres*

***Embrapa Agrobiologia***

***Chefe Geral***

*Maria Cristina Prata Neves*

***Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento***

*Sebastião Manhães Souto*

***Chefe Adjunto Administrativo***

*Vanderlei Pinto*

**DOCUMENTO Nº 94**

**ISSN 0104-6187**  
Novembro, 1999

**BIODIVERSIDADE DO RIZÓBIO QUE NODULA O  
FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.) E OS PRINCIPAIS  
FATORES QUE AFETAM A SIMBIOSE**

Rosangela Stralotto  
Norma Gouvea Rumjanek

**Seropédica - RJ**  
1999

Exemplares desta publicação podem ser solicitadas à:

Embrapa **Agrobiologia**

Caixa Postal: 74505

23851-970 – Seropédica – RJ

Telefone: (021) 682-1500

Fax: (021) 682-1230

e-mail: sac@cnpab.embrapa.br

**Expediente:**

Revisor e/ou ad hoc: João Carlos Pereira

Normalização Bibliográfica/Confecção/Padronização: Dorimar dos Santos Felix

Tiragem: 50 exemplares

Comitê de Publicações: Sebastião Manhães Souto (Presidente)

Johanna Döbereiner

José Ivo Baldani

Norma Gouvêa Rumjanek

José Antonio Ramos Pereira

Robert Michael Boddey

Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

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, nov. 99. 51p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 94).

ISSN 0104-6187

1. Feijão. 2. Biodiversidade. 3. Simbiose. 4. *Rhizobium*. 5. *Phaseolus vulgaris*.  
I. Rumjanek, N.G., colab. II. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). III. Título. IV. Série.

CDD 641.356.5

# SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>4</b>  |
| <b>2. BIODIVERSIDADE DO RIZÓBIO QUE NODULA O FEIJOEIRO.....</b>  | <b>5</b>  |
| <b>3. FATORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS QUE AFETAM A SIMBIOSE<br/>FEIJOEIRO-RIZÓBIO.....</b>  | <b>17</b> |
| <b>4. FATORES ABIÓTICOS QUE INTERFEREM NAS DIFERENTES<br/>ETAPAS DA NODULAÇÃO E NA EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA.....</b>  | <b>18</b> |
| 4.1 O EFEITO DO pH DO SOLO E SUAS INTERAÇÕES COM OUTROS NUTRIENTES..   | 18        |
| 4.2 A DISPONIBILIDADE DE NUTRIENTES NO SOLO E SUAS INTERAÇÕES COM A<br>SIMBIOSE E O RIZÓBIO .....  | 20        |
| 4.3 EFEITOS DA UMIDADE DO SOLO E DO ESTRESSE OSMÓTICO .....  | 22        |
| 4.4 A SENSIBILIDADE À TEMPERATURA ELEVADA .....  | 24        |
| <b>5. INFLUÊNCIA DOS FATORES BIÓTICOS DO SOLO NA<br/>SOBREVIVÊNCIA SAPROFÍTICA NO SOLO E NA COMPETITIVIDADE<br/>DO RIZÓBIO NA RIZOSFERA DO FEIJOEIRO .....</b> | <b>29</b> |
| <b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>   | <b>31</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>   | <b>32</b> |

# BIODIVERSIDADE DO RIZÓBIO QUE NODULA O FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.) E OS PRINCIPAIS FATORES QUE AFETAM A SIMBIOSE

Rosangela Stralio<sup>1</sup>  
Norma Gouvea Rumjanek<sup>1</sup>

## 1. INTRODUÇÃO

Há um conceito geral de que o feijoeiro possui baixa capacidade fixadora de nitrogênio em associação com as bactérias do gênero *Rhizobium*. Este conceito resulta de diversos resultados experimentais, tanto a nível nacional quanto internacional, onde, quando se considera os valores médios de produtividade, a baixa capacidade da planta em atingir seu potencial produtivo dependente apenas da fixação biológica do nitrogênio fica evidenciada. Apesar desta constatação, verifica-se que há uma grande variabilidade na capacidade fixadora desta planta quando se analisa individualmente estes resultados experimentais (Hardarson et al., 1993; Araújo, 1994; Vargas et al., 1994), sendo que a existência desta variabilidade justifica e aponta caminhos para a pesquisa visando a melhoria na eficiência desta interação. A pesquisa dos fatores que afetam a produtividade do feijoeiro sob condições simbióticas reveste-se de significativa relevância sócio-econômica, pela grande importância da cultura na dieta alimentar de nossa população e pela adequação desta tecnologia ao sistema agrícola de subsistência, predominante no cultivo do feijoeiro no Brasil. Esta tecnologia também se adapta à alguns sistemas de produção associados à agricultura familiar, de melhor nível tecnológico, e em ascensão em várias regiões produtoras especialmente no Sul do Brasil (M.G.Teixeira, comunicação pessoal).

A pesquisa sobre a simbiose do feijoeiro teve bastante progresso nos últimos anos, especialmente no conhecimento do microsimbionte e no estudo de novas abordagens buscando maior variabilidade no macrosimbionte para maior eficiência na fixação biológica de nitrogênio (Andriolo et al., 1994; Franco, 1998; Nodari et al.,

---

<sup>1</sup> Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia, Caixa Postal 74505, CEP 23851-970, Seropédica-RJ.

1993). Recentemente percebeu-se a inadequação do rizóbio que vinha tradicionalmente sendo recomendado como inoculante às condições tropicais, e novas espécies de rizóbio capazes de nodular esta planta foram identificadas e caracterizadas como resultado de diversos levantamentos. Isto significa que os estudos envolvendo os fatores que afetam esta simbiose precisam ser refeitos levando em consideração a diversidade do rizóbio presente nas diferentes regiões produtoras. A combinação favorável dos vários fatores bióticos e abióticos presentes no ecossistema em estudo vai determinar o sucesso da inoculação, sendo que é preciso partir do conhecimento das características do microrganismo a ser introduzido, sua adaptabilidade e capacidade competitiva. Os estudos da diversidade e taxonomia bacteriana, especialmente aplicados aos simbiontes do feijoeiro apresentou uma grande evolução nos últimos anos devido às novas metodologias moleculares de avaliação e caracterização. Os recentes estudos taxonômicos que identificaram estes novos grupos de microrganismos, sua caracterização e abrangência geográfica são o primeiro objetivo desta revisão. A seguir serão destacados os principais fatores bióticos e abióticos que afetam a simbiose feijoeiro-rizóbio, buscando relacionar os trabalhos envolvendo estes diferentes grupos de rizóbio quanto à sua eficiência simbiótica frente à diferentes fatores de estresse bióticos e abióticos.

## **2. BIODIVERSIDADE DO RIZÓBIO QUE NODULA O FEIJOEIRO**

A classificação taxonômica do rizóbio foi inicialmente baseada em sua especificidade hospedeira, a qual, embora ambígua, tinha um aspecto prático pela sua utilidade para os usuários e fabricantes de inoculantes. Baseado essencialmente nesta especificidade, as bactérias que nodulam o feijoeiro foram classificadas como pertencentes à espécie *R. phaseoli* (Fred et al., 1932). A classificação posterior, proposta por Jordan (1984), levando em consideração o relacionamento entre certas características fisiológicas e ainda a especificidade hospedeira, dividiu o gênero *Rhizobium* em três espécies, englobando as bactérias de crescimento rápido em meio de cultura específico, *R. meliloti*, *R. loti* e *R. leguminosarum*. *R. leguminosarum* foi então dividido em três biovars, definidos com base na hospedeira que nodulam, *R. leguminosarum* bv. *viciae* que nodula ervilha, ervilhaca e fava (*Pisum sativum*,

*Vicia sativa*, *V. fava*), *R. leguminosarum* bv. *trifolii* que nodula os trevos (*Trifolium* spp.) e *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, o feijoeiro.

As bases para esta classificação em biovares foram: (1) os simbiossomas de ervilha, trevo e feijoeiro não podiam ser distintos facilmente com base em características fenotípicas (Graham, 1964); (2) em condições de laboratório, a recombinação dos genes cromossômicos através da conjugação pode ser facilmente obtida entre estirpes de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* e *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Kondorosi et al., 1980); (3) os determinantes genéticos de círculo de hospedeiras e outras funções simbióticas são em grande parte, quando não totalmente, codificadas por plasmídeos os quais permanecem funcionais quando transferidos entre estirpes isoladas de ervilha, trevo e feijoeiro (Lamb et al., 1982); e (4) em média, há um maior nível de similaridade nas seqüências de nucleotídeos do DNA total entre estirpes pertencentes aos três biovares de *R. leguminosarum* do que entre estes biovares e outras espécies como *R. meliloti* ou *R. loti* (Crow et al., 1981).

Baseado nesta classificação, todas as estirpes de rizóbio isoladas do feijoeiro passaram a ser indistintamente considerados como pertencentes à espécie *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. No entanto, este novo arranjo taxonômico não foi totalmente aceito, sendo que muitas evidências contrárias, resultantes de diversos estudos de diversidade dos simbiossomas do feijoeiro foram a seguir levantadas. Uma delas é a reconhecida diversidade genética dos simbiossomas de *P. vulgaris*, a qual é bem maior do que a presente nos demais biovares (Graham & Parker, 1964; Jarvis et al., 1980; Jordan, 1984). Inicialmente estudos de hibridização de DNA demonstraram que havia uma marcante heterogeneidade na seqüência de nucleotídeos cromossômicos entre estirpes de cada um dos biovares de *R. leguminosarum* (Crow et al., 1981). Dados de eletroforese bidimensional de proteínas celulares totais não permitiram diferenciar entre isolados de *R. leguminosarum* bv. *viciae* e *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, mas mostraram que os isolados de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* são bem distintos e bastante diversos geneticamente (Roberts et al., 1980). Finalmente foi demonstrado que estirpes de rizóbio de diversos grupos de homologia são capazes de nodular o feijoeiro (Crow et al., 1981); de fato, diversas estirpes de *Rhizobium* spp. de nódulos obtidos de diferentes gêneros e espécies de leguminosas selvagens são capazes de nodular o feijoeiro (Graham & Parker, 1964).



Além disso, todos estes primeiros estudos de taxonomia deste grupo de estirpes foram baseados em isolados de rizóbio que nodulam o feijoeiro que tem ocorrência natural em solos de países de clima temperado, resultando de comparações com o rizóbio isolado de plantas originárias destas regiões, como ervilha e trevo. Sabe-se que o feijoeiro é originário das regiões andinas e mexicanas, portanto os isolados objeto destes estudos iniciais foram provavelmente introduzidos nestes países juntamente com as sementes levadas após o período de colonização das Américas. A partir de 1985, foi publicada uma série de estudos sobre os simbiontes de feijoeiro isolados nas Américas, incluindo os provenientes das regiões de Cerrado brasileiras, liderados pelo grupo de pesquisa da Universidade Autônoma do México (UNAM), com a colaboração do Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia (CNPAB).

Em 1988, um extensivo estudo de diversidade dos isolados que nodulam o feijoeiro coletados no México e América do Sul, até então classificados como *R. leguminosarum* bv. phaseoli, revelou um complexo de estirpes bastante heterogêneo, composto de diferentes linhagens filogenéticas bem diferenciadas (Piñero et al., 1988). Esta diversidade contrastou com o fraco polimorfismo detectado entre os isolados que nodulam o feijoeiro coletados nos campos da Inglaterra (Young, 1985). Utilizando dados de análise por eletroforese de isoenzimas (MLEE – Multilocus Enzyme Electrophoresis) estes autores observaram as variações alélicas de 15 locus enzimáticos em 51 isolados de *R. leguminosarum* bv. phaseoli obtidas de várias regiões geográficas, principalmente do México. Os resultados destas análises mostraram que as estirpes deste biovar eram muito heterogêneas em seus genes estruturais cromossomais e que havia um nível de diversidade e divergência genotípica muito maior do que os até então reportados para qualquer espécie de bactéria, inclusive *E.coli*. Foram distintos 46 tipos eletroforéticos (ET's) com base nos perfis alélicos dos locus enzimáticos analisados sendo que a diversidade genotípica média por locus enzimático entre estes ET's foi de 0,691. A grande diversidade no genoma cromossomal detectada neste estudo levantou a possibilidade de que *R. leguminosarum* bv. phaseoli consistia na verdade de uma mistura polifilética de estirpes e não numa unidade monofilética. Como outros autores já haviam sugerido, ficou claro que a inclusão de todas as estirpes que nodulam o feijoeiro numa única espécie ou biovar era geneticamente irreal e taxonomicamente confuso (Mendes, 1995). Baseados na convenção adotada para

os membros da família Enterobacteriaceae, as estimativas de distância genética entre os pares de ET's de *R. leguminosarum* bv. phaseoli indicaram que cerca de sete espécies poderiam ser distintas entre as estirpes analisadas.

Piñero et al. (1988) sugeriram que uma classificação biologicamente mais representativa de *Rhizobium* spp. deveria ser baseada na análise da variação dos genes cromossomais mais do que em características fenotípicas, especialmente as codificadas total ou parcialmente por plasmídeos, tais como círculo de hospedeiras. A classificação proposta por Jordan em 1984 mostrou-se deficiente no sentido de que baseou-se em critérios fisiológicos e ecológicos, e não em critérios genéticos e evolucionários que refletissem a similaridade total das estirpes e suas prováveis linhas genealógicas de evolução. Devido ao fato de que a transferência horizontal de genes cromossomais, embora ocorra, é menos provável do que a freqüente transferência de genes codificados por plasmídeos, os genótipos definidos por MLEE refletem muito melhor a história genealógica destas estirpes. De acordo com Piñero et al. (1988), uma hipótese que explicaria esta diversidade neste grupo de estirpes seria de que, através do tempo evolucionário, numerosas linhagens clonais divergentes de rizóbio, associadas com várias espécies de leguminosas, tenham adquirido a capacidade de colonizar *Phaseolus* spp pela aquisição de plasmídeos conferindo genes para nodulação desta planta.

Estes estudos levaram à separação das estirpes de *R. leguminosarum* bv. phaseoli em dois tipos, I e II, de acordo com diferenças nos plasmídeos simbóticos (pSym) como a presença ou ausência de reiteraões (múltiplas cópias) de genes ligados à fixação de nitrogênio e a capacidade de nodular outros hospedeiros (Martínez et al., 1985; Flores et al., 1987). Inicialmente acreditava-se que a presença destas reiteraões representassem uma vantagem evolutiva para este biovar (Martínez et al., 1985; Romero et al., 1988), no entanto, posteriormente verificou-se que estão relacionadas à constante variabilidade de diversos fenótipos (Sobéron-Chaves et al., 1986; Flores et al., 1988). As estirpes do tipo I possuem múltiplas cópias dos genes *nifH* e, acreditava-se, possuíam um círculo restrito de hospedeiras, centralizado no feijoeiro, enquanto que as estirpes do tipo II possuem uma única cópia destes genes e eram capazes de nodular também *Leucaena* spp (Martínez, et al., 1985; Brom et al., 1988). Posteriormente verificou-se que o círculo de hospedeiras destas espécies era bem menos restrito e definido do que se acreditava (Hernandez-Lucas et al., 1995). Estes grupos diferiam ainda na estrutura de seus

polissacarídeos extracelulares (Zevenhuizen & Bertocchi, 1989; Gil-Serrano et al., 1990).

Logo a seguir, as estirpes do tipo II foram reclassificadas como *R. tropici* (Martínez-Romero et al., 1991), a partir de uma caracterização genotípica baseada em dados de MLEE, no sequenciamento parcial do 16S rRNA, hibridização DNA-DNA e organização do DNA ribossomal. Dois subgrupos, IIA e IIB, foram descritos para esta espécie de modo a acomodar o baixo nível de homologia de DNA (36%) e diferenças em características fenotípicas e genotípicas, diferenças estas que foram recentemente enfatizadas pela presença de um megaplasmídeo específico em cada grupo (Geniaux et al., 1995). A espécie *R. etli* (Segovia et al., 1993) foi posteriormente descrita incluindo as estirpes anteriormente classificadas como *R. leguminosarum* bv. phaseoli do tipo I de origem americana (Martínez et al., 1988), os quais constituem um biovar, *R. etli* bv. phaseoli, e isolados não simbióticos originários do México (Segovia et al., 1991). O sequenciamento parcial do 16S rRNA foi utilizado para diferenciar *R. leguminosarum* de *R. etli* (Segovia et al., 1993), sendo que atualmente somente são consideradas como *R. leguminosarum* bv. phaseoli as estirpes que estiverem estreitamente relacionadas com os genes cromossomais dos outros biovares (bv. trifolii e bv. viceae) desta espécie (Lindström et al., 1995).

A definição da espécie *R. tropici* foi baseada em dados de MLEE de 64 estirpes do tipo II isoladas em diferentes regiões geográficas comparadas com outras espécies de rizóbio, seguida de uma caracterização fenotípica (Martínez-Romero et al., 1991). Através de MLEE foi possível subdividir as estirpes do tipo II nos dois subgrupos IIA e IIB, os quais mostraram-se distintos das estirpes do tipo I. As estirpes do tipo II ficaram a uma distância genética de 0,86 das do tipo I, enquanto que a distância entre os dois subgrupos foi de 0,79. As estirpes do tipo IIA mostraram maior homogeneidade do que as do tipo IIB, com um nível médio de diversidade de 0,289 enquanto que as do tipo IIB mostraram um índice de 0,363. Estirpes representativas foram escolhidas para hibridização de DNA total e ribossomal e para a determinação da seqüência parcial do 16S rRNA. Quatro estirpes do tipo IIA e cinco do tipo IIB constituíram grupos homogêneos, com níveis relativamente altos de homologia de DNA, 91,7% com a estirpe de referência do subgrupo IIA (CFN 299) e 81,4% para as estirpes do tipo IIB com a estirpe de referência deste subgrupo (CIAT 899). DNA's de outras espécies de *Rhizobium* (*R.*

*leguminosarum* bv. phaseoli, *R. leguminosarum* bv. viceae e *R. leguminosarum* bv. trifolii) mostraram menos de 30% de hibridização com o DNA total tanto da estirpe CFN 299 quanto da CIAT 899. Os dados de RFLP (restriction fragment length polymorphism – polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição) dos operons de rRNA foram determinados e revelaram que os padrões de hibridização para as estirpes do tipo I e tipos IIA e IIB são claramente distintos.

A caracterização fenotípica destes isolados foi baseada em 118 diferentes características incluindo diferentes fontes de carbono e nitrogênio, tolerância a antibióticos e metais pesados, temperatura máxima de crescimento entre outras. Os resultados da análise de agrupamento realizada mostrou que de modo geral os resultados estão de acordo com o dendrograma resultante da análise de MLEE, mas a distinção entre os dois agrupamentos (IIA e IIB) com base nos dados fenotípicos foi mais evidente. As estirpes do tipo IIA requerem cálcio para crescimento em meio PY e não crescem em meio LB, são imóveis em meio contendo 0,3% de agar e a temperatura máxima de crescimento é de 35 a 37<sup>o</sup>C. Entretanto, as estirpes do tipo IIB não requerem cálcio para crescimento e não crescem em meio LB, são móveis em meio 0,3% de agar e sua temperatura máxima de crescimento é de 40<sup>o</sup>C. As estirpes do tipo IIB são mais resistentes à antibióticos e metais pesados do que as do tipo IIA. Devido à todas estas diferenças, os autores sugerem que estes subgrupos devem ser futuramente considerados como subespécies.

As estirpes do tipo II, agora *R. tropici*, chamaram a atenção dos pesquisadores devido à uma série de características genéticas e outras de interesse agrônomo. Seu plasmídeo simbiótico, quando transferido para estirpes de *Agrobacterium tumefaciens* promove um processo simbiótico efetivo e completamente diferenciado (Brom et al., 1988; Martínez et al., 1987). Estas células recipientes são geneticamente estáveis, retendo seu plasmídeo mesmo depois de uma incubação prolongada à 37<sup>o</sup>C. Alguns isolados de *R. tropici* são tolerantes à altas temperaturas (Karanja & Wood, 1988b; Mercante, 1993), acidez e alumínio (Cunningham & Munns, 1984; Graham & Parker, 1964; Karanja & Wood, 1988a; Vargas et al., 1990).

A posição filogenética de *R. tropici* foi distinta de *R. leguminosarum* de acordo com as metodologias acima citadas, no entanto, a partir da definição de *R. tropici* até 1993, todas as estirpes isoladas de feijoeiro que não se enquadrassem na descrição desta espécie eram classificadas como *R. leguminosarum* bv. phaseoli. Analisando a

estrutura genética de uma população não simbiótica de *R. leguminosarum* por eletroforese de isoenzimas, Segovia et al. (1991) observou que as estirpes americanas de sua coleção, até então classificadas como *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, formavam um agrupamento separado de *R. leguminosarum* bv. *viciae* e *R. leguminosarum* bv. *trifolii*. Logo a seguir, foi observada uma grande diferença entre a seqüência parcial de nucleotídeos do 16S rDNA dos isolados de feijoeiro de origem americana e a seqüência da estirpe de referência de *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Eardly et al., 1992). Esta evidência levou os autores a sugerirem que as estirpes de feijoeiro de origem americana deveriam ser referidas como *Rhizobium* spp. do tipo I, e não *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. Um estudo mais detalhado de várias estirpes originárias de feijoeiro crescido nas Américas, baseado da determinação da seqüência parcial de nucleotídeos do 16S rRNA, onde foram incluídas diferentes estirpes representando as linhagens principais de *Rhizobium* spp. do tipo I e um isolado mexicano de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, levou à reclassificação de *Rhizobium* spp. do tipo I como *R. etli*.

Conforme já destacado acima, *R. etli* passou a incluir os isolados não simbióticos de *Rhizobium* spp do tipo I e pelo menos um biovar, *R. etli* biovar *phaseoli*, o qual nodula e fixa nitrogênio em *Phaseolus vulgaris* L., embora não exclusivamente como se acreditava (Hernandez-Lucas et al., 1995), possui reiteraões nos genes que codificam para a nitrogenase redutase e duas unidades transcricionais separadas para os genes *nodA* e *nodBC* (Segovia et al., 1993). *R. etli* também apresenta hibridização com o gene *psi* (polysacharide inhibition) e pode ser distinto das outras espécies a nível molecular pelos resultados de hibridização de DNA, isoenzimas e seqüenciamento dos genes ribossomais (Segovia et al., 1993).

Os limites interespecíficos entre *R. leguminosarum* e *R. etli* são bastante flexíveis. O nível de homologia de DNA (45%) e a homologia entre várias regiões cromossômicas, tais como para os genes *lac* e os que codificam para lipopolissacarídeos, observada para as duas espécies (Laguerre et al., 1993a), sugere que possam ter ocorrido transferências gênicas e recombinações entre estas duas espécies (Amarger et al., 1997). Além disso, os genes dos plasmídeos simbióticos destas duas espécies são homólogos e organizados similarmente (Davis & Johnston, 1990; Vasquez et al., 1991). Acredita-se que *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* possa ter surgido através da transferência horizontal do plasmídeo

simbiótico de *R. etli* para *R. leguminosarum* (Segovia et al., 1993). Seja qual for sua origem, estas duas espécies mostram-se mais proximamente relacionadas do que os dois subgrupos de *R. tropici*.

Estudando o relacionamento genético evolucionário entre isolados de rizóbio que nodulam o feijoeiro, Eardly et al. (1995) observou a presença de um alelo do 16S rRNA de *R. leguminosarum* (alelo *l*) em isolados pertencentes ao tipo eletroforético (analisado por MLEE) característico de *R. etli*, bem como em isolados pertencentes à outras duas linhagens divergentes. Várias cópias dos genes ribossomais são encontradas no genoma bacteriano, sendo que a bactéria possui diversos mecanismos de conservação e recombinação genética de genes presentes em múltiplas cópias. Como através da análise de MLEE os isolados possuindo os alelos *l* não foram puderam ser agrupados dentro do mesmo tipo eletroforético, o que caracteriza a sua divergência a nível cromossomal, a explicação encontrada para estes resultados seria a ocorrência de transferência horizontal e recombinação do gene, completo ou em parte, entre estas linhagens de relacionamento distante. É relevante observar que os alelos *l* e *e* (este de *R. etli*) também ocorrem em estirpes atualmente classificadas como *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, divergentes pela análise de MLEE a uma distância genética de 0,55 (Eardly, 1993). Pela análise destes dados fica evidente que maiores estudos envolvendo variações alélicas dos genes ribossomais, e mesmo de outros genes cromossomais, são necessários para elucidar as relações evolucionárias entre as estirpes de *Rhizobium* que nodulam o feijoeiro, e determinar o envolvimento dos eventos de recombinação de genes que sofrem transferência horizontal, na evolução destas espécies e das espécies relacionadas como *R. leguminosarum* bv. *trifolii* e *viciae* (Eardly et al., 1995).

Filogeneticamente, uma análise da seqüência total do 16S rRNA indica que *R. etli*, *R. leguminosarum* e *R. tropici* formam um grupo monofilético coerente, o qual também inclui uma linhagem independente contendo um único isolado de nódulos de feijoeiro (van Berkum et al., 1996) e *Agrobacterium rhizogenes*, a qual é proximamente relacionada a *R. tropici* (Willems & Collins, 1993).

*R. etli* é considerada como a espécie que, mais provavelmente, coevoluiu com o feijoeiro, pelo seu freqüente isolamento nas regiões consideradas como centro de diversificação da espécie, tendo sido relatada a presença de bactérias relacionadas à esta espécie nodulando diferentes leguminosas mesoamericanas (Hernandez-Lucas et al., 1995). Estas bactérias são consideradas linhagens divergentes que

provavelmente tiveram um ancestral comum com *R. etli* (Martínez-Romero & Caballero-Mellado, 1996). Num estudo de diversidade de populações de *R. etli* associadas ao feijoeiro nos altiplanos mexicanos, numa mesma área, esta espécie foi relatada nodulando tanto *Phaseolus vulgaris*, quanto *Phaseolus coccineus* assim como feijoeiros selvagens (Souza et al., 1994). Quanto à sua distribuição geográfica, acredita-se que *R. etli* tenha sido introduzido na Europa juntamente com as sementes de feijoeiro, através da Espanha no século XVI, período de colonização das Américas. Sabe-se que há abundantes populações nativas de *R. etli* neste país, sendo que o alelo do 16S rRNA de *R. etli* também é encontrado na França (Amarger, dados não publicados, citada por Amarger et al., 1997) bem como na Indonésia e África (Tjahjolenksono, 1993, citado por Amarger et al., 1997; Anyango et al., 1995).

*R. tropici* foi originalmente isolado de *P. vulgaris* e *Leucaena* em solos ácidos do Cerrado brasileiro (Martínez-Romero et al., 1991; Mercante et al., 1998). Uma vez que tanto o feijoeiro quanto a leucena são plantas introduzidas nas regiões do Cerrado, acredita-se que *R. tropici* fosse originalmente simbiote de alguma outra leguminosa destas regiões. Esta espécie foi recuperada de nódulos de *Bolusanthus* e *Spartium* (Dagutat & Stein, 1995) em solos africanos, tendo sido isolada de feijoeiro em solos do Kenya (Anyango et al., 1995). Uma hipótese para sua dispersão em solos africanos teria sido a sua introdução pelos portugueses juntamente com as sementes do feijoeiro (Martínez-Romero & Caballero-Mellado, 1996). *R. tropici* foi recuperado de nódulos de feijoeiro em três diferentes localidades da França, em áreas caracterizadas como de solos arenosos e ácidos (Amarger et al., 1994).

Isolados bastante diversos e eficientes de rizóbio capazes de nodular o feijoeiro tem sido detectados em solos africanos sem nenhum histórico de cultivo anterior ou inoculação (Anyango et al., 1995). Além disso, em solos franceses foram detectados quatro grupos distintos de rizóbio nodulando o feijoeiro, *R. leguminosarum* bv. phaseoli, as espécies genômicas 1 e 2, descritas a seguir (Geniaux et al., 1993; Laguerre et al., 1993c) e *R. tropici* (Amarger et al., 1994). Embora o feijoeiro não seja originário da Europa Ocidental, continente que possui um histórico de cultivo de cerca de 500 anos, a grande diversidade de microsimbiontes existentes nestes solos sugere que *Rhizobium* spp capaz de

nodular o feijoeiro são pré-existentes nestas regiões, o que explicaria a rápida disseminação da cultura na Europa.

A especificidade hospedeira em *R. etli* e *R. tropici*, inicialmente descrita, onde *R. etli* nodularia apenas o feijoeiro e *R. tropici* teria um círculo de hospedeiras maior, nodulando feijoeiro e leucena, foi totalmente descartada. Estirpes identificadas como *R. etli* através do padrão de proteínas, foram isoladas de *Desmodium*, *Memolobium* e *Indigofera* além das leguminosas arbóreas *Acacia melonoxylon* e *Chamaecrista stricta* na África do Sul (Dagutat & Stein, 1995). Atualmente estas espécies são consideradas como possuidoras de um amplo círculo de hospedeiras, embora distinto entre si (Martínez-Romero et al., 1991; Hernandez-Lucas et al., 1995). Os dados de Hernandez-Lucas et al. (1995) permitiram que se tirassem algumas conclusões importantes sobre o círculo de hospedeiras destas duas espécies: (a) nenhuma das espécies é simbioticamente restrita às duas leguminosas que haviam até então sido testadas, *P. vulgaris* e *L. leucocephala*; (b) a habilidade de nodulação, embora algumas vezes específica da estirpe, é bem mais ampla do que estas duas leguminosas e envolve diversas outras leguminosas, sendo que todos os isolados testados tanto de *R. etli* como de *R. tropici* nodularam *Albizia lebeck*, *Gliricidia maculata* e *Leucaena leucocephala*; (c) a resposta de *L. leucocephala* às estirpes testadas foi bem diferente dos resultados anteriores em que apenas as estirpes de *R. tropici* e não as de *R. etli* nodulariam esta planta. Embora a estirpe padrão de *R. etli* (CFN 42) forme apenas nódulos pequenos e sem leghemoglobina nesta planta, outra estirpe pertencente à mesma espécie, F16, induziu uma nodulação bastante semelhante à de *R. tropici*. Consequentemente tanto *R. tropici* quanto *R. etli* podem ser considerados como simbiontes desta leguminosa, e, sendo assim estas bactérias passaram a possuir uma hospedeira em comum com os rizóbios isolados de um grupo bastante diverso de leguminosas: *Astragalus onobrychis*, *Calliandra* spp., *Coronilla varia*, *Gliricidia maculata*, *Lablab atropurpureus*, *Lotus divaricatus*, *Onobrychis viciifolia* e outros (Bromfield & Barran, 1990; Jarvis, 1983; Trinick, 1980; Turk & Keyser, 1992).

Estudos da diversidade de rizóbio que nodula o feijoeiro na França (Laguerre et al., 1993a, b e c) levaram à descrição de duas novas espécies *R. gallicum* e *R. giardinii* (Amarger et al., 1997). Inicialmente estes isolados formaram dois agrupamentos que diferiam de *R. leguminosarum*, *R. etli* e *R. tropici* principalmente pela análise de restrição do DNA total utilizando-se diferentes sondas de DNA



(Geniaux et al., 1993; Laguerre et al., 1993c). Análises de hibridização de DNA-DNA e sequenciamento parcial do 16S rRNA mostrou que estes isolados constituíam espécies genômicas distintas, sendo que para a espécie genômica 1, a espécie mais próxima era *R. etli* e os microrganismos mais próximos à espécie genômica 2 eram *R. galegae* e *R. loti*. Amarger et al. (1997) procederam um estudo das características fenotípicas de 90 estirpes isoladas de nódulos de *Phaseolus* spp., previamente caracterizadas como pertencentes à cada uma das duas espécies genômicas ou à uma das três espécies até então descritas de rizóbio que nodula o feijoeiro. Os dados fenotípicos destas estirpes foram comparados à estirpes de referência de rizóbio por taxonomia numérica, de modo a preencher os requisitos listados por Graham et al. (1991) dentro da abordagem polifásica para a descrição de novas espécies de rizóbio. A posição filogenética de cada uma das espécies genômicas dentro do subgrupo alfa-2 de *Proteobacteria* foi determinada pelo sequenciamento total de nucleotídeos do 16S rRNA de uma estirpe representativa.

Através destas análises, os isolados de *R. gallicum* agruparam-se com as espécies que nodulam o feijoeiro, *R. leguminosarum*, *R. etli* e *R. tropici*, enquanto que *R. giardinii* apresentou um relacionamento distante com as outras espécies de *Rhizobium*, e foi mais proximamente relacionado com *R. galegae* e várias espécies de *Agrobacterium*. Cada uma destas espécies foi dividida em dois subgrupos com base em características simbióticas, de acordo com os dados fenotípicos (círculo de hospedeiros e efetividade na fixação de nitrogênio) e genotípicos. A análise genotípica foi baseada no polimorfismo dos fragmentos de restrição das regiões simbióticas, onde as espécies genômicas 1 e 2 foram associadas à dois genótipos distintos (Geniaux et al., 1993). Um desses genótipos é característico da espécie, e o outro comum à ambas. Sendo assim, *R. gallicum* foi subdividido em dois biovares: *R. gallicum* bv. *gallicum* e *R. gallicum* bv. *phaseoli*; semelhantemente, *R. giardinii* compõe-se dos biovares *R. giardinii* bv. *giardinii* e *R. giardinii* bv. *phaseoli*. Os biovares *phaseoli*, com características simbióticas comuns à ambas espécies, tem as mesmas características simbióticas de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e *R. etli* bv. *phaseoli*, ou seja: homologia à sonda *nodB* de CFN 42, usada para identificar o plasmídeo simbiótico desses biovares; três cópias dos genes *nifH*; nodulação do gênero *Phaseolus* e nodulação tardia em *Macroptilium atropurpureum*. Estes dois biovares, de ambas espécies, com características genotípicas simbióticas e fenotípicas de nodulação semelhantes à *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e *R. etli* bv.

phaseoli, provavelmente receberam seus plasmídeos simbióticos através de transferência horizontal de estirpes de *R. leguminosarum* presentes nos locais de onde foram isolados.

Estas novas espécies podem ser diferenciadas das outras espécies de rizóbio relacionadas através de hibridização de DNA, sequenciamento do 16S rRNA e análise de restrição do DNA ribossomal amplificado (Amarger et al., 1997). A descrição das espécies inclui as seguintes características (Amarger et al., 1997): os isolados de *R. gallicum* bv. *gallicum* nodulam o feijoeiro e também *Leucena leucocephala*, *Macroptilium atropurpureum* e *Onobrychis viciifolia*. Ambos biovars desta espécie fixam nitrogênio em *P. vulgaris* e a nível molecular *R. gallicum* bv. *gallicum* pode ser distinto do outro biovar por possuir apenas uma cópia do gene *nifH*. *R. giardinii* bv. *giardinii* nodula os mesmos hospedeiros do bv. *gallicum*, mas os biovars desta espécie não fixam nitrogênio em *P. vulgaris* (*R. giardinii* bv. *giardinii*) ou são muito pouco eficientes (*R. giardinii* bv. *phaseoli*). A nível molecular este biovar pode ser distinto do outro pela ausência de hibridização com uma sonda contendo os genes *nifH*, mesmo em condições de baixa estrigência.

A abrangência geográfica das novas espécies isoladas na França, *R. gallicum* e *R. giardini*, ainda precisa ser estabelecida, tendo sido relatada a ocorrência de *R. gallicum* bv. *gallicum* em solos da Áustria (Sessitsch et al., 1997). Foi proposto por Sessitsch et al. (1997) que o isolado mexicano FL27 seja classificado como *R. gallicum* bv. *gallicum*, pelos dados de homologia de DNA e seqüenciamento do 16S rRNA. Apesar dos dados de homologia de DNA poderem ser considerados baixos (35 a 61%), estão dentro dos padrões sugeridos por Stackebrandt & Goebel (1994), sendo que esta baixa homologia pode estar relacionada à presença de plasmídeos nesta estirpe, os quais podem carregar até 25% da informação genética em *Rhizobium* (Prakash & Atherly, 1986). Novamente, a presença desta espécie em solos europeus, devido à similaridade com este isolado mesoamericano, foi associada à importação como contaminante das sementes de feijoeiro. No entanto a baixa eficiência simbiótica desta espécie em simbiose com o feijoeiro levanta a hipótese de que esta planta não seja o verdadeiro hospedeiro original de *R. gallicum* bv. *gallicum*, considerando-se ainda que o isolado FL27 foi obtido de plantas de feijoeiro crescidas em um campo de cultivo de leucena (Sessitsch et al., 1997).

No Brasil, três espécies distintas de rizóbio são de reconhecida importância ecológica como simbioses do feijoeiro, *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. etli* e *R.*

*tropici*. Além do gênero *Rhizobium*, um número bastante representativo de isolados que, através de análise genética de restrição do 16S rDNA, foram incluídos dentro do gênero *Sinorhizobium* foram isoladas de nódulos de feijoeiro ocorrendo naturalmente em solos tropicais do Brasil e África (Stralio et al., 1997; Murphy et al., 1997). Diversas espécies de *Rhizobium* e *Sinorhizobium* assim como estirpes isoladas de leguminosas florestais foram relatadas como capazes de nodular esta planta, embora não se conheça sua importância ecológica, uma vez que resultam de experimentos de inoculação artificial em laboratório e não de ocorrência natural a nível de campo (Wilson, 1944; Eardly et al., 1985; Bromfield & Barran, 1990; Sadowsky et al., 1988; Lange, 1961, Bal et al., 1982; Herrera et al., 1985; Martínez-Romero et al., 1991; Hungria et al., 1993; Thomas et al., 1994; Hernandez-Lucas et al., 1995).

### **3. FATORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS QUE AFETAM A SIMBIOSE FEIJOEIRO-RIZÓBIO**

A inoculação do feijoeiro a nível de campo no Brasil foi durante muito tempo feita com inoculante produzido utilizando-se estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e *R. etli*, sendo que muitas delas obtidas do exterior e testadas pelas instituições de pesquisa no Brasil. Com a evolução dos estudos taxonômicos, revelando os diferentes agrupamentos de isolados com características simbióticas e adaptação ecológica distinta, inclusive envolvendo isolados obtidos nas regiões de clima tropical, revelou-se a inequação das estirpes tradicionalmente recomendadas para as condições de cultivo brasileiras. Atualmente sabe-se, conforme detalhado acima, que as estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e *R. etli* estão sujeitas a um elevado grau de instabilidade genética (Soberón-Chaves et al., 1986; Flores et al., 1988), o que pode explicar, pelo menos parcialmente, a grande variabilidade na eficiência simbiótica verificada nestes experimentos.

Vários fatores interferem na eficiência simbiótica das estirpes de rizóbio a nível de campo. Alguns são intrínsecos da bactéria, outros são extrínsecos, envolvendo outros microrganismos do solo, fatores de clima e solo ou determinados pela planta hospedeira. A discussão dos aspectos relativos à planta hospedeira, cuja

importância começa a ser enfatizada diante dos resultados práticos até agora obtidos, foi discutida em capítulo anterior. Nos tópicos a seguir serão descritos os principais fatores que interferem no sucesso da inoculação do feijoeiro com o rizóbio a nível de campo, considerando-se as diferentes espécies de rizóbio que nodulam esta hospedeira, suas principais características e interações com os fatores do ambiente, tanto bióticos como abióticos.

#### **4. FATORES ABIÓTICOS QUE INTERFEREM NAS DIFERENTES ETAPAS DA NODULAÇÃO E NA EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA**

##### **4.1 O efeito do pH do solo e suas interações com outros nutrientes**

O feijoeiro tem sido cultivado extensivamente em solos ácidos das regiões tropicais, embora seja considerada uma cultura sensível às condições ácidas, exigindo a correção do pH para garantir a sua produtividade. Além do efeito da acidez em si, dependendo do tipo de solo, as deficiências nutricionais normalmente associadas às condições ácidas do solo, como de cálcio, magnésio, molibdênio e fósforo e a toxidez provocada pela elevação nos níveis de alumínio e manganês são fatores limitantes à cultura e conseqüentemente à simbiose.

Entre nove leguminosas tropicais e sete de clima temperado testadas em solos deficientes em nitrogênio por Munns & Fox (1977), o feijoeiro foi a terceira leguminosa mais responsiva à calagem, ficando à frente da alfafa, considerada como altamente sensível à acidez do solo. Neste experimento clássico, os valores máximos de nodulação e produtividade só foram atingidos em níveis de pH acima de 6,0. A acidez do solo afeta todos os aspectos da nodulação e fixação biológica de nitrogênio, desde a sobrevivência e multiplicação do rizóbio no solo, até o processo de infecção e desenvolvimento do nódulo e finalmente a atividade de fixação biológica do nitrogênio (Graham, 1992). Os estágios iniciais de desenvolvimento dos nódulos são mais afetados por níveis baixos de pH do solo (Vassileva et al., 1997).

Foi sugerida uma relação entre a acidez do solo e a concentração de poliaminas nas raízes de feijoeiro (Wolf et al., 1995). Estas moléculas estão presentes na maioria dos organismos, encontrando-se ligadas à macromoléculas, tais como ácidos nucleicos, fosfolípídeos e proteínas sendo esta ligação associada à

mecanismos de regulação de processos fisiológicos básicos como a fotossíntese, divisão celular, morfogênese, senescência e resposta a estresses (Slocum et al., 1984; Kotzabasis et al., 1993). Em plantas e microrganismos, vários estresses abióticos, tais como baixo pH, provocam mudanças nos níveis de poliaminas (Wolf et al., 1993). Os resultados de Wolf et al. (1995) utilizando 6 cultivares de feijoeiro crescidas em dois níveis de pH, indicam que a concentração de poliaminas nas raízes está negativamente relacionada com o número de nódulos nos estágios iniciais de desenvolvimento da planta. As correlações entre os níveis de poliaminas e de taninos e o número de nódulos sugerem que mecanismos de defesa, desencadeados em resposta ao estresse abiótico podem ser parcialmente responsáveis pela fraca nodulação em solos ácidos.

A tolerância à acidez do solo não é necessariamente correlacionada à tolerância ao alumínio do solo. Níveis elevados de alumínio no solo diminuem a taxa de crescimento de quase todas as estirpes de rizóbio que apresentam tolerância à baixos níveis de pH do solo (Keyser & Munns, 1979b). A toxidez de alumínio só se torna importante a pH 5,0 ou mais baixo, onde vai interferir principalmente nas simbioses onde a planta e o rizóbio sejam tolerantes a estes níveis de pH.

Poucos isolados de rizóbio são capazes de crescer à níveis de pH menores do que 4,5 (Keyser & Munns, 1979a,b; Graham et al., 1982; Karanja & Wood, 1988a). Os rizóbios de crescimento rápido são geralmente considerados menos tolerantes à pH ácido do que os de crescimento lento, mas isolados de *R. loti*, agora designados *Mesorhizobium loti* (Cooper, 1982; Wood et al., 1988) e estirpes de *R. tropici* são tolerantes à acidez elevada do solo (Cunningham & Munns, 1984; Karanja & Wood, 1988a; Vargas & Graham, 1988; Martínez-Romero et al., 1991). No caso de *R. tropici*, alguns isolados são capazes de crescer em níveis de pH próximo de 4,0 (Martínez-Romero et al., 1991; Graham et al., 1994) sendo que esta tolerância tem sido associada à maior competitividade de estirpes pertencentes à esta espécie na nodulação do feijoeiro sob condições de acidez elevadas (Vargas & Graham, 1989; Wolf et al., 1991).

## 4.2 A disponibilidade de nutrientes no solo e suas interações com a simbiose e o rizóbio

O feijoeiro é uma planta bastante exigente em termos nutricionais, uma vez que não tolera a acidez do solo, tendo seu crescimento limitado, conforme destacado acima, pelas deficiências nutricionais decorrentes desta condição. Sob condições simbióticas, torna-se crítico o suprimento de cálcio, fósforo e molibdênio.

A calagem, procedimento indispensável na maioria dos solos ácidos tropicais visando o cultivo de leguminosas, normalmente fornece níveis adequados de cálcio, aumentando a sobrevivência do rizóbio no solo (Nahiz et al., 1993; Slattery and Coventry, 1993), não apenas pela correção da acidez do solo como também pelo efeito direto do cálcio no rizóbio e no estabelecimento da simbiose.

O fósforo, deficiente na maioria dos solos tropicais, é um nutriente que tem efeito marcante sobre a atividade da nitrogenase, devido ao alto dispêndio energético promovido pela atividade de fixação biológica de nitrogênio. Diversos experimentos tem sido conduzidos a nível de campo e casa de vegetação visando avaliar o efeito de diferentes níveis deste nutriente na eficiência simbiótica e produtividade das plantas sob condições simbióticas (Pereira & Bliss, 1987, 1989), sendo que sempre há uma resposta positiva à fertilização com fósforo. Há uma distribuição diferencial do fósforo absorvido entre os diferentes órgãos da planta quando em simbiose, sob condições de limitação ou de suprimento adequado do nutriente (Al-Niemi et al., 1997). Em feijoeiro nodulado por *R. tropici*, ocorre um acúmulo maior de fósforo nos bacteróides em plantas crescidas sob condições limitantes de fósforo, enquanto que, quando este nutriente é fornecido em quantidades adequadas, o maior acúmulo ocorre nas folhas (Al-Niemi et al., 1997). Yan et al. (1995a,b) comparando genótipos contrastantes de feijoeiro quanto à tolerância à baixa disponibilidade de P no solo, observaram que o “ranking” dos genótipos para todos os níveis de P não foi afetado pelo tipo de solo ou pelo nível de infecção pelo rizóbio ou micorrizas. A adaptação de um dado genótipo à baixa disponibilidade de P, em relação à outros genótipos, é independente da infecção micorrízica, sendo determinada pelos parâmetros radiculares inerentes à planta, mais do que pela eficiência simbiótica. Nielsen et al. (1998) observaram que o custo de construção (em termos de carbono) das raízes também não é afetado pela infecção micorrízica mas que a análise da arquitetura radicular e da alocação de

carbono para os custos de manutenção e construção das raízes, pode ser um meio quantitativo de avaliar a eficiência fisiológica de sistemas radiculares contrastantes. Este método é útil para avaliar os mecanismos específicos de utilização de P, constituindo-se num parâmetro importante no processo de seleção visando o melhoramento de cultivares para maior eficiência na utilização de P.

Atualmente tem-se buscado uma maior variabilidade genotípica para os parâmetros de fixação biológica de nitrogênio nos genótipos selvagens de feijoeiro (Andriolo et al., 1994). A eficiência na absorção de fósforo tem sido estudada nestes genótipos (Araújo et al., 1997,1998) e os resultados indicam que os acessos selvagens embora não se mostrem mais tolerantes à baixos níveis de P no solo (Araújo et al., 1997), apresentam uma maior variabilidade para os parâmetros de absorção de P do que os genótipos cultivados, constituindo-se numa fonte de diversidade genética para os programas de melhoramento (Araújo et al., 1998). Yan et al. (1995a) ainda verificaram diferenças quanto à origem das cultivares em relação à nutrição de P e parâmetros de produtividade. As cultivares Andinas de sementes grandes foram superiores às Meso-americanas de sementes pequenas, especialmente em condições de baixa disponibilidade de P. Uma vez que outros estudos estão sendo conduzidos visando buscar maior variabilidade quanto aos parâmetros de fixação biológica de nitrogênio em cultivares de diferentes origens (Franco, 1998), o equacionamento dos resultados obtidos a partir destes estudos complementares poderá permitir um avanço na otimização da fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro.

O molibdênio é um micronutriente que tem efeito marcante sobre a eficiência da simbiose (Franco & Day, 1980), sendo um constituinte estrutural de pelo menos duas enzimas relacionadas ao metabolismo do nitrogênio, a nitrogenase e a nitrato redutase. Em experimentos a nível de campo, a aplicação foliar de Mo provocou um aumento considerável na atividade de redução de acetileno aos 32 e 46 dias após a emergência (Vieira et al., 1998) sendo que neste período estes valores foram 129 a 274% maiores do que os valores obtidos em plantas de feijoeiro não pulverizadas com este micronutriente. O efeito do Mo na atividade específica da nitrogenase (atividade da nitrogenase.g<sup>-1</sup> de nódulos secos) neste experimento perdurou até o estágio de enchimento de grãos (60 dias após a emergência). O aumento da atividade da nitrogenase especialmente nos estágios de florescimento e início de desenvolvimento das vagens é importante para contrabalançar a deficiência de

nitrogênio normalmente observada no feijoeiro nos estágios iniciais de desenvolvimento da planta (Barradas & Hungria, 1989). Além disso, o decréscimo na atividade da nitrogenase observada nesta simbiose após o florescimento, pode ser menos acentuada (Vieira et al., 1998) ou mesmo, em alguns casos, evitada (Jacob-Neto et al., 1988) pela aplicação deste micronutriente. Os efeitos da aplicação de molibdênio tem sido bastante marcantes nos solos férteis mas intensamente cultivados da região da Zona da Mata Mineira, no entanto, não podem ser generalizados para todos os tipos de solos, uma vez que experimentos realizados em outros tipos de solo mostram efeitos menos evidentes ou mesmo não significativos (Hungria et al., 1997).

Historicamente, os programas de melhoramento do feijoeiro na América Latina visando altas produtividades, tem selecionado cultivares responsivas a fertilização nitrogenada. O nitrogênio mineral presente no solo tem um efeito inibitório sobre a atividade de fixação biológica de nitrogênio, sendo a simbiose de feijoeiro-rizóbio particularmente sensível, e as quantidades de nitrogênio recomendadas são capazes de suprimir a nodulação e o funcionamento dos nódulos nesta cultura (Graham, 1981; Ruschel & Saito, 1977; Silva et al., 1993). Bliss (1993) sugere que os programas de melhoramento levem em consideração a capacidade dos genótipos em nodular e fixar nitrogênio na presença de nitrato no solo. Pequenos níveis de nitrogênio mineral, entretanto, podem estimular a nodulação do feijoeiro em certas condições de solo (Ruschel et al., 1979). Foi observado por Tsai et al. (1993) que um balanço adequado de nutrientes no solo pode aliviar os efeitos deletérios da fertilização com nitrogênio neste processo biológico, e aumentar significativamente as taxas de nitrogênio fixado pela planta. Neste estudo foi demonstrado que a fixação de nitrogênio pode ser expressa em uma cultivar comercial, se o fornecimento de nitrogênio para o crescimento da planta for mínimo e se níveis adequados de P, K e S forem supridos.

#### 4.3 Efeitos da umidade do solo e do estresse osmótico

A ocorrência de deficiências hídricas durante o ciclo de cultivo do feijoeiro tem efeito negativo em diferentes etapas do processo de nodulação e na atividade nodular (Ramos et al., 1995), além de afetar a sobrevivência do rizóbio no solo



(Mary et al., 1994; Leung & Bottomley, 1994). As flutuações osmóticas associadas aos períodos de déficit hídrico resultam em diminuição da sobrevivência das populações de rizóbio no solo ou redução no seu crescimento (Saxena & Rewari, 1992). As estirpes de rizóbio apresentam diferentes níveis de tolerância ao estresse osmótico, muitas são inibidas por concentrações salinas de 100mM outras toleram até 500mM de NaCl (Graham, 1992). Serraj et al. (1998) verificaram que a exposição de raízes noduladas de soja, feijoeiro e alfafa a um estresse de 100 mM de NaCl resultou em uma inibição do crescimento nodular e da atividade da nitrogenase avaliada através da atividade de redução de acetileno. O efeito do NaCl foi maior no feijoeiro do que na soja ou na alfafa. A maior sensibilidade do feijoeiro foi associada a um maior acúmulo de sais nos nódulos e a uma pequena diferença na resposta da atividade de redução de acetileno a aumentos na pressão de O<sub>2</sub> na rizosfera. Esta menor resposta ao oxigênio implica em um efeito deletério na barreira a difusão de oxigênio nos nódulos.

Issa & Wood (1995) avaliaram a sobrevivência de estirpes de rizóbio que nodulam *Cicer arietinum* e *Phaseolus vulgaris* em solos com diferentes texturas sob diferentes potenciais matriciais constantes (-0,03, -0,1, -1,5 e 5,0 MPa). Houve diferenças altamente significativas na multiplicação e sobrevivência do rizóbio em resposta ao potencial matricial, estirpes de rizóbio, tipo de solo e às interações entre estes fatores. Os maiores efeitos foram devidos às estirpes e tipos de solo. Os resultados destes autores mostraram que a influência do potencial matricial no número de células que sobrevivem reduz à medida que se aumenta o tempo de incubação do solo nos diferentes potenciais. Entretanto o efeito do tipo de solo e da estirpe foi muito maior do que o do potencial matricial quando se considera todos os níveis de potencial matricial testados. Uma conclusão importante foi de que todas as estirpes testadas foram capazes de sobreviver sob potenciais matriciais abaixo daqueles em que as plantas já estariam experimentando o déficit hídrico.

Vários trabalhos indicam que as leguminosas e o processo de iniciação nodular são mais afetados pelos estresses osmótico e hídrico do que o rizóbio (Russel, 1976; Tu, 1981; Zahran & Sprent, 1986). Além disso, os efeitos do estresse hídrico na produtividade das plantas sob condições simbióticas são distintos conforme o estágio fenológico da planta durante o período de estresse. Peña-Cabriales & Castellanos (1993) observaram que se o período de estresse ocorre durante o período reprodutivo das plantas, a produtividade é mais afetada do que

durante o período vegetativo. Quanto à nodulação, se o estresse ocorre durante o período vegetativo, ocorre uma recuperação total do número de nódulos após o molhamento das plantas, havendo inclusive um aumento da nodulação em relação à testemunha. No entanto, se este ocorre durante o estágio reprodutivo, há um decréscimo na nodulação e esta não se recupera com o molhamento posterior. Em feijoeiro, há diferenças entre cultivares quanto à tolerância ao estresse hídrico (Ramos et al., 1995), e esta variabilidade pode ser utilizada em programas de melhoramento, como os conduzidos no Instituto de Pesquisa Agropecuária de Pernambuco, gerando as cultivares IPA7, IPA8 e outras com bom potencial de tolerância a este estresse.

#### 4.4 A sensibilidade à temperatura elevada

Um dos fatores limitantes à simbiose rizóbio-leguminosas em condições tropicais é a ocorrência de altas temperaturas no solo, as quais atingem médias superiores a 38°C, considerando-se as camadas superficiais do solo (Mercante, 1993), região onde se concentra a nodulação de leguminosas como o feijoeiro e a soja. Altas temperaturas afetam a sobrevivência do rizóbio no solo, o processo de infecção, formação dos nódulos e ainda a atividade de fixação biológica de nitrogênio. Além disso, quando se considera o rizóbio no inoculante, afeta a sua sobrevivência no veículo tanto durante o transporte quanto no armazenamento.

As leguminosas diferem quanto à sua tolerância ao estresse térmico, sendo a soja uma planta bastante tolerante, cuja fixação de nitrogênio só é limitada por temperaturas diurnas acima de 41°C, e estimulada a 36°C (La Favre & Eaglesham, 1987). Com base em diversos dados de literatura, a temperatura crítica para a fixação biológica de nitrogênio varia entre 30°C para trevo e ervilha, e na faixa de 35 a 40°C para soja, amendoim e caupi. O funcionamento dos nódulos de feijoeiro encontra seu ótimo entre 25 e 30°C e é limitada por temperaturas do solo entre 30 e 33°C (Hernandez-Armenta et al., 1989; Pankhurst & Sprent, 1976; Piha & Munns, 1987b; Hungria et al., 1985). O feijoeiro é por isso considerada uma hospedeira bastante sensível, havendo diferenças entre as diferentes espécies de *Phaseolus* (Piha & Munns, 1987b) e entre as espécies de rizóbio que nodulam esta planta

quanto à tolerância a este estresse (Mercante, 1993), o que abre perspectivas para o melhoramento desta simbiose visando sua melhor adequação ao clima tropical.

Vários genótipos de feijoeiro foram testados quanto à tolerância à altas temperaturas em simbiose por Piha & Munns (1987b), sendo que o peso seco da parte aérea dos genótipos cultivados foi consideravelmente reduzido quando as plantas foram crescidas a 33°C em comparação com 27°C. Uma redução similar foi observada para linhagens provenientes de cruzamentos entre *P. vulgaris* e *P. acutifolius*. Outras espécies de *Phaseolus*, como *P. acutifolius*, *P. lunatus* e *P. filiformis*, assim como caupi e soja foram menos sensíveis à altas temperaturas no sistema radicular. Plantas de feijoeiro crescidas com nitrogênio mineral não foram afetadas pelas altas temperaturas, indicando que a assimilação de nitrogênio via fixação biológica é mais sensível do que as vias de assimilação de nitrogênio mineral.

Para a maioria das espécies de rizóbio a temperatura ótima de crescimento está entre 28 e 31°C, com muitas incapazes de crescer abaixo de 10°C ou acima de 31°C (Graham, 1992). No caso de feijoeiro, já foram detectadas estirpes capazes de crescerem a temperaturas médias mais elevadas do que a hospedeira (Graham, 1979; Josephson & Pepper, 1984; Piha & Munns, 1987b; Karanja & Wood, 1988b; Gitonga et al., 1989; Hungria et al., 1993). Estirpes de rizóbio capazes de nodular o feijoeiro e fixar nitrogênio em um regime térmico de 40/23°C (dia/noite) foram descritas (Hungria et al., 1993). Espécies de *R. tropici* parecem suportar melhor as condições de temperaturas elevadas em simbiose, e os resultados obtidos por Mercante (1993) indicam que plantas inoculadas com estas estirpes recuperam a atividade da nitrogenase mais rapidamente do que as demais espécies, após serem submetidas a um estresse de altas temperaturas (38°C, durante 5 horas por dia), por um período de três dias. Por outro lado, quando esta mesma cultivar é submetida a este estresse, inoculada com estirpes de *R. etli*, a recuperação da atividade é lenta, dependente da formação de nódulos novos, uma vez que o choque térmico provoca senescência dos nódulos formados por estas estirpes (Straliotto et al., 1992). Este efeito drástico na redução da atividade da nitrogenase e conseqüentemente no acúmulo de nitrogênio total em plantas bem noduladas foi também observado por Hungria & Franco (1993).

O crescimento *in vitro* a altas temperaturas é um dos parâmetros que diferenciam as espécies de rizóbio que nodulam o feijoeiro (Hungria et al., 1997),

sendo que, de modo geral, considera-se que as estirpes anteriormente classificadas como de tipo I (*R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e *R. etli*) são menos tolerantes a altas temperaturas em meio de cultivo, sendo sua temperatura máxima de crescimento em torno de 35°C. Já *R. tropici* é mais tolerante, sendo que as estirpes do tipo IIA toleram até 37°C e as do tipo IIB, até 40°C. Atualmente a capacidade de nodular leucena não é mais um parâmetro confiável na separação das espécies de rizóbio que nodulam o feijoeiro, no entanto é interessante observar que dados de diversos autores, estudando populações de rizóbio dos Cerrados (Vargas et al., dados não publicados; Mercante, 1993) ou de regiões de clima semi-árido (Stralio et al., 1995) mostram que os isolados que nodulam o feijoeiro recuperados do solo utilizando leucena com planta-isca, são mais tolerantes a altas temperaturas *in vitro*. Mercante (1993) observou uma correlação entre a temperatura máxima de crescimento *in vitro* e *in vivo*, sendo que estes isolados de leucena mostraram-se mais tolerantes a temperaturas elevadas em simbiose. Embora este e outros autores (Munévar & Wollum II, 1981; Kishinevsky et al., 1992) apontem para uma correlação positiva entre estas avaliações, outros trabalhos demonstram que não há uma correlação significativa entre o crescimento *in vitro* a altas temperaturas e a infectividade da bactéria e sua capacidade de fixar nitrogênio nestas condições (La Favre & Eaglesham, 1986; Kluson et al., 1986; Karanja & Wood, 1988b).

Raghuwanshi et al. (1994) observaram que há uma modificação na concentração e na qualidade dos flavonóides excretados pelas raízes de guandu (*Cajanus cajan* (L) Millsp) em diferentes temperaturas. Além de afetar a sinalização molecular a nível da hospedeira, a temperatura afeta também a expressão dos genes *nod* da bactéria (McKay & Djordjevic, 1993; Hungria, 1995). A indução de proteínas do tipo "heat shock", tanto na bactéria (Krishan & Pueppke, 1991; Fischer et al., 1993; Ogawa & Long, 1995) quanto na hospedeira (Araújo, 1997) tem sido investigada como uma alternativa na busca de genótipos resistentes. Estas proteínas foram estudadas em diferentes cultivares de feijoeiro, selecionadas em condições de estresse (Araújo, 1997) como também em *R. tropici* e *R. etli* (Michiels et al., 1994), embora o significado da presença destas proteínas e sua possível ligação com uma maior tolerância da simbiose ao estresse térmico ainda necessita ser elucidada. A temperatura afeta um outro nível de expressão gênica, que são os eventos de recombinação e deleção, especialmente a nível do plasmídeo simbiótico (Zurkowsky, 1982; Trevors, 1986; Toro & Olivares, 1986). A cura de plasmídeos foi

observada em *R. leguminosarum* bv. phaseoli (Soberón-Chaves et al., 1986; Karanja & Wood, 1988b), enquanto que as estirpes de *R. tropici* IIB são consideradas como geneticamente mais estáveis, retendo o seu plasmídeo simbiótico mesmo após prolongada incubação a 37°C (Martínez-Romero et al., 1991). Este fator pode ser em parte responsável pela maior competitividade da estirpe de *R. tropici* IIB, CIAT 899 (de Oliveira & Graham, 1990). Karanja & Wood (1988b) encontraram uma alta porcentagem de estirpes que são capazes de sobreviver a uma temperatura de 45°C mas que no entanto perdem sua infectividade, o que foi atribuído à cura de plasmídeos. Mesmo à temperaturas de 37°C foi observada a perda das propriedades simbióticas (Soberón-Chaves et al., 1986) a qual pode ser atribuída a estes rearranjos genômicos. Segovia et al. (1991) observou um grande número de isolados de rizóbio não simbióticos na rizosfera do feijoeiro, em número muito superior aos simbióticos, afetando diretamente a competitividade das estirpes inoculadas. A ocorrência de altas temperaturas nos solos tropicais, aliada à predominância de estirpes mais susceptíveis à estas perdas, podem estar contribuindo para a alta frequência de isolados não infectivos

Altas temperaturas do solo provocam um retardo na nodulação ou a restringem às zonas subsuperficiais do solo, onde as temperaturas não são tão extremas. Munns et al. (1977) observaram que em zonas desérticas a nodulação é muito mais expressiva abaixo dos 5 cm de solo. A exposição do solo em plantios mais espaçados também provoca uma redução no número de nódulos superficiais (Graham & Rosas, 1978). Por outro lado, na prática do plantio direto, as temperaturas do solo são de 5 a 10°C inferiores às encontradas no plantio convencional (Hungria et al., 1997), favorecendo a sobrevivência do rizóbio, a nodulação e a eficiência da fixação biológica de nitrogênio (Hungria et al., 1995).

Muitos estudos sobre o efeito de altas temperaturas não utilizam flutuações diurnas havendo ainda diferenças entre os autores quanto às temperaturas utilizadas e aos períodos de altas/baixas temperaturas, dificultando a interpretação dos resultados. Experimentos que envolvem flutuações entre as temperaturas diurnas e noturnas apresentam diferenças marcantes na resposta simbiótica. Um ciclo diurno de 8 horas a 38°C inibiu completamente a nodulação de feijoeiro, mesmo inoculado com estirpes tolerantes (Stralio et al., dados não publicados), no entanto, quando este período é reduzido para 5 horas não há este efeito inibitório, apesar da drástica redução no acúmulo de matéria seca da parte

aérea das plantas (Mercante, 1993). Experimentos envolvendo um choque térmico durante o período de crescimento das plantas parecem simular mais aproximadamente as condições de campo. Hernandez-Armenta et al. (1989) observou que a transferência das plantas noduladas de feijoeiro de uma temperatura diurna de 26 para 35°C provocou uma inibição drástica na fixação de nitrogênio, sendo que Hungria & Franco (1993) observaram o mesmo efeito para todas as estirpes inoculadas, transferindo feijoeiros nodulados de um ciclo diurno a 28°C para 40°C. Mercante (1993) conseguiu detectar diferenças na tolerância ao estresse térmico entre estirpes pertencentes à espécies distintas, transferindo as plantas de 28 para 38° durante 5 horas por dia, por 2 a 3 dias durante o período reprodutivo das plantas, procedimento que tornou-se um padrão para a seleção de estirpes mais tolerantes nos trabalhos subsequentes deste grupo de pesquisa (Straliotto et al., 1997).

Os efeitos das altas temperaturas nas plantas noduladas são diversos, provocando decréscimo na atividade da nitrogenase, no nitrogênio total acumulado na planta, na eficiência relativa da nitrogenase, na atividade da GS e GOGAT, no transporte de nitrogênio e na concentração de ureídos na seiva xilemática (Piha & Munns, 1987a,b; Hernandez-Armenta et al., 1989; Hungria & Franco, 1993; Hungria et al., 1993; Hungria et al., 1989). É também um dos fatores associados à senescência precoce dos nódulos (Sutton, 1983; Hungria et al., 1993). Conforme destacado acima, as plantas noduladas com estirpes tolerantes ao estresse térmico recuperam a atividade nodular mais rapidamente, não havendo a senescência dos nódulos após um período de estresse térmico (Straliotto et al., 1992).

O estabelecimento no solo destas estirpes tolerantes é um problema à parte que precisa ser equacionado, onde concorrem todos os fatores relativos à sobrevivência e competitividade da estirpe não relacionados à tolerância ao estresse térmico. Estudos de diversidade do rizóbio em solos tropicais indicam que além de *R. tropici*, estirpes de *Sinorhizobium* sp. também apresentam tolerância ao estresse térmico em simbiose (Straliotto et al., 1997). Maiores estudos são agora necessários visando o estabelecimento destes isolados nas condições de cultivo uma vez que foi observada uma baixa sobrevivência verificada em *R. tropici* após sucessivos cultivos (Vlassak et al., 1996). Esta característica pode ser inclusive benéfica, porque permite a substituição do rizóbio no inoculante à medida que os estudos indiquem estirpes cada vez mais adequadas.

## 5. INFLUÊNCIA DOS FATORES BIÓTICOS DO SOLO NA SOBREVIVÊNCIA SAPROFÍTICA NO SOLO E NA COMPETITIVIDADE DO RIZÓBIO NA RIZOSFERA DO FEIJOEIRO

A população do rizóbio inoculado que consegue se estabelecer no solo é bastante variável dependendo da combinação entre uma série de fatores abióticos, exemplificados acima, e bióticos determinados pelas interações sinérgicas ou antagônicas com os outros representantes da biota do solo e com o próprio rizóbio, na sobrevivência e competição pela nodulação da hospedeira. Fica evidente a influência dos fatores bióticos quando se observa o comportamento diferencial de populações de rizóbio no solo estéril, onde os estresses bióticos são eliminados, em comparação com solo não estéril (Vidor & Miller, 1980; Postma et al., 1990). Vários microrganismos presentes na comunidade microbiana do solo são antagônicos ou parasitas ao rizóbio (Pugashetti et al., 1982) e seu efeito principal está na alteração do tamanho e composição da população microbiana, o qual pode resultar em uma vantagem numérica para certas estirpes ou grupos de rizóbio, podendo levar a uma alteração na ocupação nodular.

O parasitismo microbiano pode ser exemplificado pela predação sobre a população do rizóbio exercida por protozoários, um dos mais importantes e mais bem estudados grupos de organismos do solo que interagem com o rizóbio, e por *Bdellovibrio* (Keya & Alexander, 1975). A predação exercida por estes organismos nunca destrói completamente a população de rizóbio no solo, no entanto a reduz aos níveis normalmente encontrados em solos não estéreis, o que diminui a vantagem competitiva em termos numéricos provocada pela inoculação com o rizóbio. Como há uma certa seleção para alimentação destes predadores com certas estirpes de rizóbio, é interessante verificar a susceptibilidade do rizóbio presente no inoculante à atividade predatória presente no solo.

Outras interações como antagonismo e sinérgismo bacteriano que ocorrem na rizosfera são bastante complexas e muito pouco estudadas. Vários fatores estão envolvidos, e os efeitos na sobrevivência do rizóbio e nodulação são muitas vezes correlacionados com a competição por substratos de carbono, produção de substâncias antibióticas, sideróforos ou substâncias estimuladoras do crescimento

vegetal (Li & Alexander, 1986; Polonenko et al., 1987; Fuhrmann & Wollum II, 1989; Itzigsohn et al., 1993; Rumjanek et al., 1995).

Todos estes fatores vão influenciar na competitividade da estirpe inoculada, e, em feijoeiro, tradicionalmente a baixa ocupação nodular pelas estirpes inoculadas é associadas à existência de uma população indígena abundante, embora ineficiente na maioria dos casos, mas bem adaptada às condições ecológicas prevalentes, sendo difícil o seu deslocamento pela simples inoculação das sementes. A alta adaptabilidade das estirpes indígenas resulta em uma vantagem numérica destas em relação ao rizóbio inoculado, vantagem esta que pode estar refletindo em maior competitividade pela ocupação nodular. Neste aspecto são muito importantes os estudos de levantamento da diversidade das populações de rizóbio presentes nos diferentes tipos de solo, o que se constitui numa primeira etapa na busca de inoculantes mais eficientes e competitivos.

Diversos fatores estão envolvidos na competitividade do rizóbio, como sua mobilidade no solo, resposta às substâncias indutoras dos genes de nodulação excretadas pela hospedeira (flavonóides) ou outros compostos como açúcares, amino ácidos e ácidos orgânicos identificados como quimioatrativos para o rizóbio (Aguillar et al., 1988). Além disso, tem sido levantado o envolvimento de substâncias como as lectinas, que atuam na adesão das células do rizóbio às células radiculares da hospedeira (Truchet et al., 1986), bem como o efeito de polissacarídeos extracelulares (Araújo et al., 1994) na competitividade de diferentes estirpes de rizóbio. Correlações entre a velocidade de adesão às células radiculares de diferentes espécies de rizóbio foi correlacionada à capacidade competitiva destas estirpes (Smith & Wollum II, 1991; van Rensburg & Strijdom, 1982a), embora os mecanismos específicos que atuam nesta maior velocidade de adesão não tenham sido descritos. Muitos outros estudos visando estabelecer os mecanismos genéticos envolvidos na competitividade de estirpes de rizóbio tem sido desenvolvidos embora as respostas ainda sejam em grande parte especulativas (Beattie & Handelsman, 1993).

Muitos estudos de competitividade visando comparar estirpes de *R. tropici* com outras espécies de rizóbio que nodulam o feijoeiro tem sido conduzidos, devido ao interesse levantado em torno das características de tolerância a acidez e altas temperaturas daquela espécie. Martínez & Rosenblueth (1990) inicialmente estabeleceram que esta espécie seria menos competitiva do que as demais estirpes



do tipo I, que inclui *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* e *R. etli*, o que justificaria a baixa presença de isolados pertencentes à esta espécie nas coleções de culturas analisadas pelos autores. Neste experimento foi avaliado um isolado da estirpe CIAT 899 resistente a rifampicina. No entanto, experimentos posteriores conduzidos por Stralio et al. (1991, 1993) mostraram que estirpes classificadas como *R. tropici*, inclusive o isolado original da CIAT 899, são mais competitivas do que as do tipo I. Estes resultados foram posteriormente confirmados em dois cultivares de feijoeiro e, utilizando-se diversas concentrações de inóculo da CIAT 899 em competição com a estirpe padrão de *R. etli*, a CFN 42 (Stralio et al., 1993). Em experimentos em vasos a estirpe CIAT 899 mostrou-se mais competitiva em condições de baixo pH (Streit et al., 1995) e altas temperaturas (Oliveira & Graham, 1990). A nível de campo os resultados são variáveis, tendo apresentado baixa competitividade em solos do Havaí (Thies et al., 1992) e em solos ácidos da Colômbia (Wolff et al., 1991), e altamente competitiva em solo arenoso de baixa fertilidade no Brasil (Vlassak et al., 1996, 1997), sendo que atualmente é a estirpe utilizada no inoculante comercial recomendado para o feijoeiro no Brasil.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

São muitos os estudos básicos e aplicados já desenvolvidos sobre esta simbiose, metodologias visando aumentar o teor de fósforo e molibdênio na semente tem demonstrado eficientes no estabelecimento do rizóbio inoculado, aumentando a nodulação e a produção do feijoeiro. Outros estudos que envolvem substâncias indutoras da nodulação, as quais podem ser adicionadas ao veículo inoculante, como a turfa, podem também contribuir para aumentar a nodulação inicial pelo rizóbio inoculado, suplantando as estirpes do solo, na maioria ineficientes. O trabalho de seleção de estirpes já resultou em um significativo avanço, conforme discutido acima, sendo que hoje são indicadas estirpes mais competitivas e estáveis geneticamente. Uma área ainda em fase de desenvolvimento, que visa a construção de um mapa genético do feijoeiro, visando facilitar os programas de melhoramento para fixação biológica de nitrogênio deve dar o impulso mais significativo dentro do objetivo de maximizar a FBN nesta planta. Sua otimização, visando alcançar os patamares de fixação já atingidos pela soja brasileira, ainda depende destes estudos

básicos, embora a planta apresente este potencial baseado nos resultados de experimentos conduzidos em condições controladas.

Com certeza é uma tecnologia que, mesmo no estágio atual de desenvolvimento, encontra alta aplicabilidade para os pequenos produtores brasileiros e aqueles ligados à agricultura familiar. No entanto, falta uma concentração de esforços, baseado nas metodologias já estabelecidas, visando o aproveitamento de todo este conhecimento em experimentos a nível de campo, nas nossas condições tropicais, onde se possa definir o potencial de utilização de cada uma destas técnicas, com o objetivo de melhor atender aos níveis de produtividade destes agricultores.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR, M.M.; ASHBY, A.M.; RICHARDS, A.J.M.; LOAKE, G.J.; WATSON, M.D.; SHAW, C.H. Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* towards flavonoid inducers of the symbiotic nodulation genes. **Journal of General Microbiology**, London, v.134, p.2741-2746, 1988.
- AL-NIEMI, T.S.; KAHN, M.L.; McDERMOTT, T.R. P metabolism in the bean-*Rhizobium tropici* symbiosis. **Plant Physiology**, Rockville, v.113, p.1233-1242, 1997.
- AMARGER, N.; BOURS, M.; REVOY, F.; ALLARD, M.R.; LAGUERRE, G. *Rhizobium tropici* nodulates field-grown *Phaseolus vulgaris* in France. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.161, p.147-156, 1994.
- 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, p.996-1006, 1997.
- ANDRIOLO, J.; PEREIRA, P.A.A.; HENSON, R.A. Variabilidade entre linhas de formas silvestres de *Phaseolus vulgaris* quanto à características relacionadas com a fixação biológica de N<sub>2</sub>. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.29, p.831-837, 1994.

- ANYANGO, B.; WILSON, K.J.; BEYNON, J.L.; GILLER, K.E. Diversity of rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pHs. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.4016-4021, 1995.
- ARAÚJO, A.P.; TEIXEIRA, M.G.; ALMEIDA, D.L. Phosphorus efficiency of wild and cultivated genotypes of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under biological nitrogen fixation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, p.951-957, 1997.
- ARAÚJO, A.P.; TEIXEIRA, M.G.; ALMEIDA, D.L. Variability of traits associated with phosphorus efficiency in wild and cultivated genotypes of common bean. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.203, p.173-182, 1998.
- ARAÚJO, J.L.S. **Síntese de proteínas de choque térmico (heat shock proteins) em feijoeiro sob altas temperaturas**. Rio de Janeiro: UFRRJ, 1997. Tese de Mestrado.
- ARAÚJO, R.S. Fixação biológica do nitrogênio em feijão. In: ARAÚJO, R.S.; HUNGRIA, M., eds. **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.91-120.
- ARAÚJO, R.S.; ROBLETO, E.A.; HANDELSMAN, J. A hydrophobic mutant of *Rhizobium etli* altered in nodulation competitiveness and growth in the rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p. 430-436, 1994.
- BAL, A.K.; SHANTHARAM, S.; WONG, P.P. Nodulation of pole bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Rhizobium* species of two cross-inoculation groups. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.44, p.965-971, 1982.
- BARRADAS, C.A.A.; HUNGRIA, M. Seleção de estirpes de *Rhizobium* para o feijoeiro. I. Precocidade da nodulação e fixação do nitrogênio. **Turrialba**, Costa Rica, v.14, p.236-242, 1989.
- BEATTIE, G.A.; HANDELSMAN, J. Evaluation of a strategy for identifying nodulation competitiveness genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli. **Journal of General Microbiology**, London, v.139, p.529-538, 1993.
- BLISS, F.A. Breeding common bean for improved biological nitrogen fixation. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.152, p.71-79, 1993.

- BROM, S.; MARTÍNEZ, E.; DÁVILA, G.; PALACIOS, R. Narrow- and broad-host-range symbiotic plasmids of *Rhizobium* spp. strains that nodulate *Phaseolus vulgaris*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, p.1280-1283, 1988.
- BROMFIELD, E.S.; BARRAN, L.R. Promiscuous nodulation of *Phaseolus vulgaris*, *Macroptilium atropurpureum* and *Leucaena leucocephala* by indigenous *R. meliloti*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.36, p.369-372, 1990.
- COOPER, J.E. Acid production, acid tolerance and growth rate of *Lotus* rhizobia in laboratory media. **Soil and Biology Biochemistry**, Oxford, v.14, p.127-131, 1982.
- CROW, V.L.; JARVIS, B.D.W.; GREENWOOD, R.M. Deoxyribonucleic acid homologies among acid-producing strains of *Rhizobium*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.31, p.152-172, 1981.
- CUNNINGHAM, S.D.; MUNNS, D.A. The correlation between extracellular polysaccharide production and acid tolerance in *Rhizobium*. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.48, p.1273-1276, 1984.
- DAGUTAT, H.; STEYN, P.L. Taxonomy and distribution of rhizobia indigenous to South African soils. In: TIKONOVICH, I.A.; PROVOPOROV, N.A.; ROMANOV, V.I.; NEWTON, W.E., eds. **Nitrogen fixation: fundamentals and applications**. Dordrecht: Kluwer, 1995. p.683.
- DAVIS, E.O.; JOHNSTON, A.W.B. Analysis of three *nodD* genes in *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli; *nodD* is preceded by *nolE*, a gene whose product is secreted from the cytoplasm. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.4, p.921-932, 1990.
- OLIVEIRA, L.A. de; GRAHAM, P.H. Evaluation of strain competitiveness in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* using a *nod<sup>+</sup> fix<sup>-</sup>* natural mutant. **Archives in Microbiology**, Berlin, v.153, p.305-310, 1990.
- EARDLY, B.D. Restriction fragment length polymorphism in a 16S rRNA gene segment in *Rhizobium* isolated from 38 species of *Trifolium*. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W.E., eds. **New horizons in nitrogen fixation**. Dordrecht: Kluwer, 1993. p.610.

- EARDLY, B.D.; HANNAWAY, B.; BOTTOMLEY, P.J. Characterization of rhizobia from ineffective alfalfa nodules; ability to nodulate bean plants (*Phaseolus vulgaris* (L.) Savi.). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.50, p.1422-1427, 1985.
- EARDLY, B.D.; WANG, F.-S.; WHITTAM, T.S.; SELANDER, R.K. Species limits in *Rhizobium* populations that nodulate the common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.507-512, 1995.
- EARDLY, B.D.; YOUNG, J.P.W.; SELANDER, R.K. Phylogenetic position of *Rhizobium* sp. or 191, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, based on partial sequences of the 16S rRNA and *nifH* genes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.1809-1815, 1992.
- FISCHER, H.M.; BABST, M.; KASPAR, T.; ACUNA, G.; ARIGONI, F.; HENNECKE, H. One member of a *groESL*-like chaperonin multigene family in *Bradyrhizobium japonicum* is co-regulated with symbiotic nitrogen fixation genes. **EMBO Journal**, Oxford, v.12, p.2901-2912, 1993.
- FLORES, M.; GONZÁLES, V.; BROM, S.; MARTÍNEZ, E.; PIÑERO, D.; ROMERO, D.; DÁVILA, G.; PALACIOS, R. Reiterated DNA sequences in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.169, p.5782-5788, 1987.
- FLORES, M.; GONZÁLES, V.; PARDO, M.A.; LEIJA, A.; MARTÍNEZ, E.; ROMERO, D.; PIÑERO, D.; DAVILA, G.; PALACIOS, R. Genomic instability in *Rhizobium phaseoli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.170, p.1191-1196, 1988.
- FRANCO, A.A.; DAY, J.M. Effect of lime and molybdenum on nodulation and nitrogen fixation of *Phaseolus vulgaris* L. in acid soils of Brazil. **Turrialba**, Costa Rica, v.30, p.99-105, 1990
- FRANCO, M.C. **Análise da divergência genética em cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): resistência a bacterioses, nodulação e capacidade combinatória**. Viçosa: UFV, 1998. 91p. Tese de Doutorado.
- FRED, E.B.; BALDWIN, I.L.; MCCOY, W. **Root nodule bacteria and leguminous plants**. Madison: University of Wisconsin, 1932. 343p.
- FUHRMANN, J.; WOLLUM II, A.G. Nodulation competition among *Bradyrhizobium japonicum* strains as influenced by rhizosphere bacteria and iron availability. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.7, p.108-112, 1989.

- GENIAUX, E.; FLORES, M.; PALACIOS, R.; MARTÍNEZ, E. Presence of megaplastids in *Rhizobium tropici* and further evidence of differences between the two *Rhizobium tropici* subtypes. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.45, p.392-394, 1995.
- GENIAUX, E.; LAGUERRE, G.; AMARGER, N. Comparison of geographically distant populations of *Rhizobium* isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris*. **Molecular Ecology**, v.2, p.295-302, 1993.
- GIL-SERRANO, A.; SÁNCHEZ DEL JUNCO, A.; TEJERO-MATEO, P.; MEGIAS, M.; CAVIEDES, M.A. Structure of the extracellular polysaccharide secreted by *Rhizobium leguminosarum* var. phaseoli CIAT 899. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v.204, p.103-107, 1990.
- GITONGA, N.M.; WIDDOWSON, D.; KEYA, S.O. Interaction of *Phaseolus vulgaris* with termotolerant isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli from Kenyan soils. **MIRCEN Journal**, Oxford, v.5, p.493-504, 1989.
- GRAHAM, P.H. The application of computer techniques to the taxonomy of the root nodule bacteria of legumes. **Journal of General Microbiology**, London, v.35, p. 511-517, 1964.
- GRAHAM, P.H. Some problems of nodulation and symbiotic fixation in *Phaseolus vulgaris*: a review. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.4, p.93-112, 1981.
- GRAHAM, P.H. Influence of temperature on growth and nitrogen fixation in cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. inoculated with *Rhizobium*. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.93, p.365-370, 1979.
- GRAHAM, P.H. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.38, p.485-492, 1992.
- GRAHAM, P.H.; DRAEGER, K.J.; FERREY, M.L.; CONROY, M.J.; HAMMER, B.E.; MARTÍNEZ, E.; AARONS, 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 of Microbiology**, Ottawa, v.40, p.198-207, 1994.
- GRAHAM, P.H.; PARKER, C.A. Diagnostic features in the characterization of the root nodule bacteria of legumes **Plant and Soil**, The Hague, v.20, p.383-396, 1964.

- GRAHAM, P.H.; ROSAS, J.C. Nodule development and nitrogen fixation in cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. as influenced by planting density. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v.90, p.19-29, 1978.
- GRAHAM, P.H.; SADOWSKI, M.J.; KEYSER, H.H.; BARNET, Y.M.; BRADLEY, R.S.; COOPER, J.E.; De LEY, D.J.; JARVIS, B.D.W.; ROSLYCKY, E.B.; STRIJDOM, B.W.; YOUNG, J.P.W. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root- and stem-nodulating bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.41, p.582-587, 1991.
- GRAHAM, P.H.; VITERI, S.E.; MACKIE, F.; VARGAS, A.A.T.; PALACIOS, A. Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. **Field Crops Research**, Amsterdam, v.5, p.121-128, 1982.
- HARDARSON, G.; BLISS, F.A.; CIGALES-RIVERO, M.R.; HENSON, R.A.; KIPE-NOLT, J.A.; LONGERI, L.; MANRIQUE, A.; PEÑA-CABRIALES, J.J.; PEREIRA, P.A.A.; SANABRIA, C.A.; TSAI, S.M. Genotypic variation in biological nitrogen fixation by common bean. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.152, p.59-70, 1993.
- HERNANDEZ-ARMENTA, R.; WIEN, H.C.; EAGLESHAM, A.R.J. Maximum temperature for nitrogen fixation in common bean. **Crop Science**, Madison, v.29, p.1260-1265, 1989.
- HERNANDEZ-LUCAS, I.; SEGOVIA, L.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; PUEPPLE, S.G. Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.2775-2779, 1995.
- HERRERA, M.A.; BEDMAR, E.J.; OLIVARES, J. Host specificity of *Rhizobium* strains isolated from nitrogen-fixing trees and nitrogenase activities of strain GRH2 in symbiosis with *Prosopis chilensis*. **Plant Science**, Calcutta, v.42, p.177-182, 1985.
- HUNGRIA, M. Efeito das temperaturas elevadas na exsudação dos indutores dos genes nod pelo feijoeiro e soja. In: HUNGRIA, M.; BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S., eds. **Microbiologia do Solo: desafios para o século XXI**. Londrina: IAPAR/EMBRAPA-CNPSO, 1995. p. 368-373.

- HUNGRIA, M.; ANDRADE, D.S.; COLOZZI-FILHO, A.; BALOTA, E.L.; SANTOS, J.C.F. Ecologia microbiana em solos sob cultivo na Região Sul do Brasil. In: HUNGRIA, M.; BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S., eds. **Microbiologia do Solo: desafios para o século XXI**. Londrina: IAPAR/EMBRAPA-CNPSO, 1995. p.234-270.
- HUNGRIA, M.; FRANCO, A.A. Effects of high temperatures on nodulation and N<sub>2</sub> fixation in *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.149, p.95-102, 1993.
- HUNGRIA, M.; FRANCO, A.A.; SPRENT, J.I. New sources of high temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.149, p. 103-109, 1993.
- HUNGRIA, M.; HARDY, R.W.F.; EAGLESHAM, A.R.J. Nitrogen fixation and assimilation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown at high temperature. In: NORTH AMERICAN SYMBIOTIC NITROGEN FIXATION CONFERENCE, 12, 1989, Ames. **Proceedings...** Ames: Iowa State University, 1989. p.106.
- HUNGRIA, M.; THOMAS, R.J.; DÖBEREINER, J. Efeito do sombreamento na fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.20, p.1143-1156, 1985.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; ARAÚJO, R.S. Fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M., eds. **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p.188-294.
- ISSA, S.; WOOD, M. Multiplication and survival of chickpea and bean rhizobia in dry soils: the influence of strains, matric potential and soil texture. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.27, p.785-792, 1995.
- ITZIGSOHN, R.; KAPULNIK, Y.; OKON, Y.; DOVRAT, A. Physiological and morphological aspects of interactions between *Rhizobium meliloti* and alfalfa (*Medicago sativa*) in association with *Azospirillum brasilense*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.39, p.610-615, 1993.
- JACOB-NETO, J.; THOMAS, R.J.; FRANCO, A.A. Variação estacional da concentração de molibdênio nos nódulos e demais partes da planta de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Turrialba**, Costa Rica, v.38, p.51-58, 1988.
- JARVIS, B.D.W. Genetic diversity of *Rhizobium* strains which nodulate *Leucaena leucocephala*. **Current Microbiology**, New York, v.8, p.153-158, 1983.



- JARVIS, B.D.W.; DICK, A.G.; GREENWOOD, R.M. Deoxyribonucleic acid homology among strains of *Rhizobium trifolii* and related species. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.30, p.42-52, 1980.
- JORDAN, D.C. Family III Rhizobiaceae. CONN. 1938. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G., eds. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams, 1984. p.234-256.
- JOSEPHSON, K.L.; PEPPER, I.L. Competitiveness and effectiveness of strains of *Rhizobium phaseoli* isolated from the Sonoran Desert. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.16, p.651-655, 1984.
- 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, p.7-13, 1988a.
- KARANJA, N.K.; WOOD, M. Selecting *Rhizobium phaseoli* strains for use with beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Kenya: tolerance of high soil temperatures and antibiotic resistance. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.112, p.15-22, 1988b.
- KEYA, S.O.; ALEXANDER, M. Regulation of parasitism by host density; the *Bdellovibrio-Rhizobium* interrelationship. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.7, p.231-237, 1975.
- KEYSER, H.H.; MUNNS, D.N. Effects of calcium, manganese, aluminum on growth of rhizobia in acid media. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.43, p.500-503, 1979a.
- KEYSER, H.H.; MUNNS, D.N. Tolerance of rhizobia to acidity, aluminum and phosphate. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.43, p.519-523, 1979b.
- KISHINEVSKY, B.D.; SEM, D.; WEAVER, R.W. Effect of high root temperature on *Bradyrhizobium*-peanut symbiosis. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.143, p.275-282, 1992.
- KLUSON, R.A.; KENWORTH, W.J.; WEBER, D.F. Soil temperature effects on competitiveness and growth of *Rhizobium japonicum* and *Rhizobium* induced chlorosis of soybean. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.95, p.201-207, 1986.
- KONDOROSI, A.E.; VINCZE, E.; JOHNSTON, A.W.B.; BERINGER, J.E. A comparison of three *Rhizobium* linkage maps. **Molecular and General Genetics**, New York, v.178, p.403-408, 1980.

- KOTZABASIS, K.; CHRISTAKIS-HAMPSAS, M.D.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A. A narrow bore HPLC method for the identification and quantification of free, conjugated and bound polyamines. **Analytical Biochemistry**, New York, v.214, p.484-489, 1993.
- KRISHNAN, H.B.; PUEPPKE, S.G. *nodC*, a *Rhizobium fredii* gene involved in cultivar-specific nodulation of soybean, shares homology with a heat shock gene. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.5, p.737-745, 1991.
- LA FAVRE, A.K.; EAGLESHAM, A.R.J. The effects of high soil temperatures and starter nitrogen on the growth and nodulation of soybean. **Crop Science**, Madison, v.27, p.742-745, 1987.
- LA FAVRE, A.K.; EAGLESHAM, A.R.J. The effects of high temperatures on soybean nodulation and growth with different strains of bradyrhizobia. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 32, p.22-27, 1986.
- LAGUERRE, G.; BARDIN, M.; AMARGER, N. Isolation from soil of symbiotic and nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum* by DNA hybridization. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.39, p.1142-1149, 1993a.
- LAGUERRE, G.; FERNANDEZ, M.P.; EDEL, V.; NORMAND, P.; AMARGER, N. Genomic heterogeneity among French *Rhizobium* strains isolated from *Phaseolus vulgaris*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.43, p.761-767, 1993b.
- LAGUERRE, G.; GENIAUX, E.; MAZURIER, S.I.; RODRIGUEZ-CASARTELLI, R.; AMARGER, N. Conformity and diversity among field isolates of *R. leguminosarum* bv. *viciae*, bv. *trifolii*, and bv. *phaseoli* revealed by DNA hybridization using chromosome and plasmid probes. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 39, p.412-419, 1993c.
- LAMB, J.W.; HOMBRECHER, G.; JOHNSTON, A.W.B.; BERINGER, J.E. Plasmid determined nodulation and nitrogen fixation abilities in *Rhizobium phaseoli*. **Molecular and General Genetics**, New York, v.186, p.449-452, 1982.
- LANGE, R.T. Nodule bacteria associated with the indigenous Leguminosae of southwestern Australia. **Journal of General Microbiology**, London, v.26, p.351-359, 1961.
- LEUNG, K.; BOTTOMLEY, P.J. Growth and nodulation characteristics of subclover (*Trifolium subterraneum* L.) and *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* at different water potentials. **Soil and Biology Biochemistry**, Oxford, v.26, p.805-812, 1994.

- LI, D.-M.; ALEXANDER, M. Bacterial growth rates and competition affect nodulation and root colonization by *Rhizobium meliloti*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.52, p.807-811, 1986.
- LINDSTRÖM, K.; van BERKUM, P.; GILLIS, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; NOVIKOVA, N.; JARVIS, B.D.W. Report from the roundtable on *Rhizobium* taxonomy. In: TIKONOVICH, I.A.; PROVOPOROV, N.A.; ROMANOV, V.I.; NEWTON, W.E., eds. **Nitrogen fixation: fundamentals and applications**. Dordrecht: Kluwer, 1995. p.807-810.
- MARTÍNEZ, E.; FLORES, S.; BROM, S.; ROMERO, D.; DÁVILA, G.; PALACIOS, R. *Rhizobium phaseoli*: a molecular genetics view. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.108, p.179-184, 1988.
- MARTÍNEZ, E.; PALACIOS, R.; SÁNCHEZ, F. Nitrogen-fixing nodules induced by *Agrobacterium tumefaciens* harboring *Rhizobium phaseoli* plasmids. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.169, p.2828-2834, 1987.
- MARTÍNEZ, E.; PARDO, M.A.; PALACIOS, R.; CEVALLOS, M.A. Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. **Journal of General Microbiology**, London, v.131, p.1779-1786, 1985.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. *Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. **CRC Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v.15, p.113-140, 1996.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; ROSENBLUETH, M. Increased bean (*Phaseolus vulgaris* L.) nodulation competitiveness of genetically modified *Rhizobium* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, p.2384-2388, 1990.
- 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**, Washington, v.41, p.417-426, 1991.
- MARY, P.; DUPUY, N.; DOHLHEM-BIREMON, C.; DEFIVES, C.; TAILLIEZ, R. Differences among *Rhizobium meliloti* and *Bradyrhizobium japonicum* strains in tolerance to desiccation and storage at different relative humidities. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.26, p.1125-1132, 1994.

- McKAY, I.A.; DJORDJEVIC, M.A. Production and excretion of Nod metabolites by *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii are disrupted by the same environmental factors that reduce nodulation in the field. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.3385-3392, 1993.
- MENDES, I. Genetic diversity of *Rhizobium* strains nodulating *Phaseolus vulgaris* L. Oregon State University, Department of Microbiology, mimeo. 1995.
- MERCANTE, F.M. **Uso de *Leucaena leucocephala* na obtenção de *Rhizobium* tolerante a temperatura elevada para inoculação do feijoeiro.** Itaguaí: UFRRJ, 1993. 149p. Tese de Mestrado.
- MERCANTE, F.M.; CUNHA, C.O.; STRALIOTTO, R.; RIBEIRO-JÚNIOR, W.Q.; VANDERLEYDEN, J.; FRANCO, A.A. *Leucaena leucocephala* as a trap-host for *Rhizobium tropici* strains from the Brazilian "Cerrado" region. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.29, p.49-58, 1998.
- MICHIELS, J.; VERRETH, C.; VANDERLEYDEN, J. Effects of temperature stress on bean-nodulating *Rhizobium* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.1206-1212, 1994.
- MUNÉVAR, F.; WOLLUM II, A.G. Effect of high root temperature and *Rhizobium* strain on nodulation, nitrogen fixation and growth of soybeans. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.45, p.1113-1120, 1981.
- MUNNS, D.N.; FOGLE, V.W.; HALLOCK, B.G. Alfalfa root nodule distribution and inhibition of nitrogen fixation by heat. **Agronomy Journal**, Madison, v.69, p.377-380, 1977.
- MUNNS, D.N.; FOX, R.L. Comparative lime requirement of tropical and temperate legumes. **Plant and Soil**, The Hague, v.46, p.533-548, 1977.
- MURPHY, P.J.; WILSON, K.J.; ANYANGO, B.; GILLER, K.E. *Rhizobium tropici*, *R. leguminosarum* and *Sinorhizobium fredii* are all *Phaseolus*-nodulating rhizobia indigenous to Keyan soils. In: CONGRÈS INTERNATIONAL DE FIXATION DE L'AZOTE, 11., 1997, Paris. **Résumés...** Paris: Institut Pasteur, INRA, CNRS, CEA, ORSTOM, CIRAD, 1997. Abstract 01-11.
- NAHIZ, N.; SEM, D.; WEAVER, R.W. Population densities of clover rhizobia in Texas pastures and response to liming. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.15, p.45-49, 1993.

- NIELSEN, K.L.; BOUMA, T.J.; LYNCH, J.P.; EISSENSTAT, D.M. Effect of phosphorus availability and vesicular-arbuscular mycorrhizas on the carbon budget of common bean (*Phaseolus vulgaris*). **New Phytologist**, Oxford, v.139, p.647-656, 1998.
- NODARI, R.O.; TSAI, S.M.; GILBERTSON, R.L.; GEPTS, P. Towards an integrated linkage map of common bean. III. Mapping genetic factors controlling host-bacteria interactions. **Genetics**, Maryland, v.134, p.341-350, 1993.
- OGAWA, J.; LONG, S. The *Rhizobium meliloti* *groELc* locus is required for regulation of early *nod* genes by the transcription activator NodD. **Genes and Development**, New York, v.9, p.714-729, 1995.
- OLIVEIRA, L.A.; GRAHAM, P.H. Evaluation of strain competitiveness in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* using a *nod<sup>+</sup>fix<sup>-</sup>* natural mutant. **Archives of Microbiology**, London, v.153, p.305-310, 1990.
- PANKHURST, C.E.; SPRENT, J.I. Effects of temperature and oxygen tension on the nitrogenase and respiratory activities of turgid and water-stressed soybeans and French bean root nodules. **Journal of Experimental Botany**, London, v.27, p.1-9, 1976.
- PEÑA-CABRIALES, J.J.; CASTELLANOS, J.Z. Effects of water stress on N<sub>2</sub> fixation and grain yield of *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.152, p.151-155, 1993.
- PEREIRA, P.A.A.; BLISS, F.A. Nitrogen fixation and plant growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) at different levels of phosphorus availability. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.104, p.79-84, 1987.
- PEREIRA, P.A.A.; BLISS, F.A. Selection of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) for N<sub>2</sub> fixation at different levels of available phosphorus under field and environmentally controlled conditions. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.115, p.75-82, 1989.
- PIHA, M.I.; MUNNS, D.N. Nitrogen fixation potential of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) compared with other grain legumes under controlled conditions. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.98, p.169-182, 1987a.
- PIHA, M.I.; MUNNS, D.N. Sensitivity of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) symbiosis to high soil temperature. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.98, p.183-194, 1987b.

- PIÑERO, D.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SELANDER, R. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, p.2825-2832, 1988.
- POLONENKO, D.R.; SCHER, F.M.; KOEPPER, J.W.; SINGLETON, C.A.; LALIBERTE, M.; ZALESKA, I. Effects of root colonizing bacteria on nodulation of soybean roots by *Bradyrhizobium japonicum*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.33, p.498-503, 1987.
- POSTMA, J.; HOK-A-HIN, C.H.; van VEEN, J.A. Role of microniches in protecting introduced *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* against competition and predation in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, p. 495-502, 1990.
- PRAKASH, R.K.; ATHERLY, A.G. Plasmids of *Rhizobium* and their role in symbiotic nitrogen fixation. **International Review of Cytology**, v. 104, p. 1-24. 1986.
- PUGASHETTI, B.K.; ANLE, J.S.; WAGNER, G.H. Soil microorganisms antagonistic towards *Rhizobium japonicum*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 14, p. 45-49. 1982.
- RAGHUWANSHI, A.; DUDEJA, S.S.; KHURANA, A.L. Effect of temperature on flavonoid production in pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) in relation to nodulation. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 17, p. 314-316. 1994.
- RAMOS, M.L.G.; PARSONS, P.; JAMES, E.K.; SPRENT, J.I. Effect of water stress on nitrogen-fixation of two cultivars of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: TIKONOVICH, I.A.; PROVOROV, N.A.; NEWTON, W.E., eds. **Nitrogen Fixation: fundamentals and applications**. Dordrecht: Kluwer, 1995. p. 728.
- ROBERTS, G.P.; LEPS, W.T.; SILVER, L.E.; BRILL, W.J. Use of two dimensional polyacrilamide gel eletrophoresis to identify and classify *Rhizobium* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 39, p. 414-422. 1980.
- ROMERO, D.; SINGLETON, P.W.; SEGOVIA, L.; MORETT, E.; BOHLOOL, B.B.; PALACIOS, R.; DÁVILA, G. Effect of naturally occurring *nif* reiterations on symbiotic effectiveness in *Rhizobium phaseoli*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, p. 848-850. 1988.

- RUMJANEK, N.G.; GAMA, S.A.; TRIPLETT, E.W. Bacteriocin production by *Bradyrhizobium* strains. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON NITROGEN FIXATION, 10, 1995, Saint-Petersburg, Russia. **Abstracts**. p. 433.1995.
- RUSCHEL, A.P.; SAITO, S.M.T. Efeito da inoculação de *Rhizobium*, nitrogênio e matéria orgânica na fixação simbiótica de nitrogênio em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 1, p. 21-24, 1977.
- RUSCHEL, A.P.; SAITO, S.M.T.; TULMANN NETO, A. Efficiency of *Rhizobium* inoculation on *Phaseolus vulgaris*. I. Effects of nitrogen sources and plant variety. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 3, p. 13-17, 1979.
- RUSSEL, J.S. Comparative salt tolerance of some tropical and temperate legumes and tropical grasses. **Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry**, Victoria, iv. 16, p. 103-109, 1976.
- SADOWSKI, M.J.; CREGAN, P.B.; KEYSER, H.H. Nodulation and nitrogen fixation efficacy of *Rhizobium fredii* with *Phaseolus vulgaris* genotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 54, p. 1907-1910. 1988.
- SAXENA, A.K.; REWARI, R.B. Differential response of chickpea (*Cicer arietinum* L.) – *Rhizobium* combinations to saline soil conditions. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 13, p. 31-34, 1992.
- SEGOVIA, L.; PIÑERO, D.; PALACIOS, R.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Genetic structure of a soil population of nonsymbiotic *Rhizobium leguminosarum*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 426-433, 1991.
- SEGOVIA, L.; YOUNG, P.W.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v. 43, p. 374-377, 1993.
- SERRAJ, R.; VASQUEZ-DIAZ, H.; DREVON, J.J. Effects of salt stress on nitrogen fixation, oxygen diffusion, and ion distribution in soybean, common bean and alfalfa. **Journal of Plant Nutrition**, Tokyo, v. 21, p. 475-488, 1988.
- SESSITSCH, A.; RAMÍREZ-SAAD, H.; HARDARSON, G.; AKKERMANS, A.D.L.; de VOS, W.M. Classification of Austrian rhizobia and the mexican isolate FL27 obtained from *Phaseolus vulgaris* L. as *Rhizobium gallicum*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v. 47, p. 1097-1101, 1997.

- SILVA, P.M.; TSAI, S.M.; BONETTI, R. Response to inoculation and N fertilization for increased yield and biological nitrogen fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 152, p. 123-130, 1993.
- SLATTERY, J.F.; COVENTRY, D.R. Variation of soil populations of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii and the occurrence of inoculant rhizobia in nodules of subterranean clover after pasture renovation in North-eastern Victoria. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 25, p. 1725-1730, 1993.
- SLOCUM, R.D.S.; KAUR-SAWHNEY, R.; GALSTON, A.W. The physiology and biochemistry of polyamines in plants. **Archives in Biochemistry and Biophysics**, v. 235, p.283-303, 1984.
- SMITH, G.B.; WOLLUM II, A.G. Bacterial culture history affects the attachment of *Bradyrhizobium japonicum* to host Glycine max roots. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 37, p. 730-736, 1991.
- SOBERÓN-CHAVES, G.; NAJERA, R.; OLIVEIRA, H.; SEGOVIA, L. Genetic rearrangements of a *Rhizobium phaseoli* symbiotic plasmid. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 167, p. 487-491, 1986.
- SOUZA, V.; EGUIARTE, L; AVILA, G.; CAPELLO, R.; GALLARDO, C.; MONTOYA, J.; PIÑERO, D. Genetic structure of *Rhizobium etli* biovar phaseoli associated with wild and cultivated bean plants (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*) in Morelos, Mexico. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 1260-1268, 1994.
- STACKEBRANDT, E.; GOEBEL, B.M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v. 44, p. 846-849, 1994.
- STRALIOTTO, R.; CUNHA, C.O.; FERREIRA, M.E.; RUMJANEK, N.G. Diversidade genética de rizóbio que nodula o feijoeiro em condições tropicais: *Sinorhizobium*, um novo gênero nodulando eficientemente o feijoeiro em condições de estresse térmico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 19, 1997, Rio de Janeiro. **Abstracts**. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1997, Abst. MS-069.



- STRALIOTTO, R.; CUNHA, C.O.; MERCANTE, F.M.; RUMJANEK, N.G.; FRANCO, A.A. Genotypic diversity of rhizobia nodulating common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) isolated from Brazilian tropical soils. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON SUSTAINABLE AGRICULTURE FOR THE TROPICS: THE ROLE OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION, 1995, Angra dos Reis. **Abstracts**. S.I.: Embrapa-CNPAB, 1995, p. 185-186.
- STRALIOTTO, R.; MERCANTE, F.M.; JAMES, E.K.; NEVES, M.C.P.; FRANCO, A.A. Tolerance of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) symbiosis with *Rhizobium tropici* to heat shock. In: PALACIOS, R.; MORA, J.; NEWTON, W.E., Ed. **New Horizons in Nitrogen Fixation**. Dordrecht: Kluwer, 1992. p. 745.
- STRALIOTTO, R.; FRANCO, A.A. Competitividade entre estirpes de *Rhizobium tropici* e *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* e uso de mutantes glucuronidase positivos. In: XXIV Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, 24, Goiânia-GO, 1993. **Resumos...** Goiânia, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1993.
- STRALIOTTO, R.; YUNDA, A.L.; FRANCO, A.A.; BALDANI, J.I. Estirpes de rizóbio do tipo II tolerantes a altas temperaturas e competitivas para inoculação do feijoeiro. In: FEIRA NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA, 2, 1991, São Paulo, **Resumos...** São Paulo: Associação Brasileira de Empresas de Biotecnologia, 1991, p. 17.
- STREIT, W.; BOTERO, L.; WERNER, D.; BECK, D. Competition for nodule occupancy on *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium etli* and *Rhizobium tropici* strains can be efficiently monitored in an ultisol during early stages of growth using a constitutive GUS gene fusion. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, p. 1075-1081. 1995.
- SUTTON, W.D. Nodule development and senescence. In: BROUGHTON, W.J., ed., **Nitrogen fixation**. Oxford: Clarendon, 1983. p. 144-212.
- THIES, J.E.; BOHLOOL, B.B.; SINGLETON, P.W. Environmental effects on competition for nodule occupancy between introduced and indigenous rhizobia and among introduced strains. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, p. 493-500. 1992.

- THOMAS, P.M.; GOLLY, K.F.; ZYSKIND, J.W.; VIRGINIA, R.A. Variation of clonal, mesquite-associated rhizobial and bradyrhizobial populations from surface and deep soils by simbiotic gene region restriction fragment length polymorphism and plasmid profile analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p. 1146-1153,1994.
- TORO, N.; OLIVARES, J. Analysis of *Rhizobium meliloti* sym mutants obtained by heat treatment. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 51, p. 1148-1150, 1986.
- TREVORS, J.T. Plasmid curing in bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, p.149-157, 1986.
- TRINICK, M.J. Relationships amongst the fast-growing rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rhizobial groups. **Journal of Applied Bacteriology**, Baltimore, v. 49, p. 39-53, 1980.
- TRUCHET, G.L.; SHERWOOD, J.E.; PANKRATZ, H.S.; DAZZO, F.B. Clover root exsudate contains a pariculate form of the lectin, trifoliin A, which binds *Rhizobium trifolii*. **Physiologia Plantarum**, v. 66, p. 575-582, 1986.
- TSAI, S.M.; BONETTI, R.; AGBALA, S.M.; ROSSETTO, R. Minimizing the effect of mineral nitrogen on biological nitrogen fixation in common bean by increasing nutrient levels. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 152, p. 131-138, 1993.
- TU, J.C. Effect of salinity on *Rhizobium* root-hair interaction, nodulation and growth of soybean. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 61, p. 231-239, 1981.
- TURK, D.; KEYSER, H.H. Rhizobia that nodulate tree legumes: specificity of the host for nodulation and effectiveness. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, p. 451-460, 1992.
- van BERKUM, P.; BEYENE, D.; EARDLY, B.D. Phylogenetic relationships among *Rhizobium* species nodulating the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **International Journal of Systematic Bacteriology**, Baltimore, v. 46, p. 240-244, 1996.
- van RENSBURG, H.J.; STRIJDOM, B.W. Competitive abilities of *Rhizobium meliloti* strains considered to have potencial as inoculants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washingtonn, v. 44, p. 98-106, 1982.

- VARGAS, A.A.T.; GRAHAM, P.H. Cultivar and pH effects on competition for nodule sites between isolates of *Rhizobium* in beans. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 117, p. 195-200, 1989.
- VARGAS, A.A.T.; GRAHAM, P.H. *Phaseolus vulgaris* cultivar and *Rhizobium* strain variation in acid-pH tolerance and nodulation under acidic conditions. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 19, p. 91-101, 1988.
- VARGAS, C.L.; MARTÍNEZ, M.; MEGIAS, M.; QUINTO, C. Identification and cloning of nodulation genes and host specificity determinants of the broad host-range *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli strain CIAT 899. **Molecular Microbiology**, v. 4, p. 1899-1910, 1990.
- VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R.; MENDES, I.C.; PERES, J.R.R. Feijoeiro. In: **Fixação Biológica de Nitrogênio em solos de Cerrados**. Brasília: EMBRAPA-CPAC: EMBRAPA-SPI, 1994. p.41-53.
- VASQUEZ, M.; DAVALOS, A.; De Las PENAS, A.; SANCHEZ, F.; QUINTO, C. Novel organization of the common nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli strains. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 173, p. 1250-1258, 1991.
- 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**, Tokyo, v. 20, p. 279-294, 1997.
- VIDOR, C.; MILLER, R.H. Relative saprophytic competence of *Rhizobium japonicum* strains in soils as determined by the quantitative fluorescent antibody technique (FA). **Soil and Biology Biochemistry**, Oxford, v. 12, p. 483-487, 1980.
- VIEIRA, R.F.; CARDOSO, E.J.B.N.; VIEIRA, C.; CASSINI, S.T.A. Foliar application of molybdenum in common beans. I. Nitrogenase and reductase activities in a soil of high fertility. **Journal of Plant Nutrition**, Tokyo, v. 21, p. 169-180, 1998.
- VLASSAK, K.; MERCANTE, F.; STRALIOTTO, R.; FRANCO, A.A.; VUYLSTEKE, M.; VANDERLEYDEN, J. Evaluation of the intrinsic competitiveness and saprophytic competence of *Rhizobium tropici* IIB strains. **Biologogy and Fertility of Soils**, Berlin, v. 24, p. 274-282, 1997.
- VLASSAK, K.; VANDERLEYDEN, J.; FRANCO, A.A. Competition and persistence of *Rhizobium tropici* and *Rhizobium etli* in a tropical soil during successive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultures. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 21, p. 61-68, 1996.

- WILLEMS, A.; COLLINS, M.D. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based upon 16S rRNA gene sequences. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 43, p.305-313, 1993.
- WILSON, J.K. Over five hundred reasons for abandoning the cross-inoculation groups of the legumes. **Soil Science**, Baltimore, v. 58, p. 61-69, 1944.
- WOLFF, A.B.; SIDIRELLI, M.; PARADELLIS, C.; KOTZABASIS, K. Influence of acid soil on nodule numbers in relation to polyamine and tannin concentrations in roots of *Phaseolus vulgaris*. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 20, p. 249-252, 1995.
- WOLFF, A.B.; SINGLETON, P.W.; SIDIRELLI, M.; BOHLOOL, B.B. Influence of acid soil on nodulation and interstrain competitiveness in relation to tanin concentrations in seeds and roots of *Phaseolus vulgaris*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 25, p. 715-721, 1993.
- WOLFF, A.B.; STREIT, W.; KIPE-NOLT, J.A.; VARGAS, H.; WENER, H. Competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli strains in relation to environmental stress and plant defense mechanisms. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 12, p. 170-176, 1991.
- WOOD, M.; COOPER, J.E.; BJOURSON, A.J. Response of *Lotus* rhizobia to acidity and aluminum in liquid culture and in soil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 107, p. 227-231, 1988.
- YAN, X.; BEEBE, S.E.; LYNCH, J.P. Genetic variation for phosphorus efficiency of common bean in contrasting soil types: II. Yield response. **Crop Science**, Madison, v. 35, p. 1094-1099, 1995b.
- YAN, X.; LYNCH, J.P.; BEEBE, S.P. Genetic variation for phosphorus efficiency of common bean in contrasting soil types: I. Vegetative response. **Crop Science**, Madison, v. 35, p. 1086-1093, 1995a.
- YOUNG, J.P.W. *Rhizobium* population genetics: enzyme polymorphism in isolates from peas, clover, beans and lucerne grown at the same site. **Journal of General Microbiology**, London, v. 131, p. 2399-2408, 1985.
- ZAHRAN, H.H.; SPRENT, J.I. Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on root-hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum*. **Planta**, v. 167, p. 303-309, 1986.

ZEVENHUIZEN, L.P.T.M.; BERTOCCHI, C. Polysaccharide production by *Rhizobium phaseoli* and the typing of their excreted anionic polysaccharides. **FEMS Microbiology Letters**, Haren, v. 65, p. 211-218, 1989.

ZURKOWSKI, W. Molecular mechanisms for loss of nodulation properties of *Rhizobium trifolii*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 150, p. 999-1007, 1982.