

Isolamento e Seleção Inicial de Rizóbios Obtidos de Solos de Mato Grosso do Sul para Inoculação em Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)



República Federativa do Brasil
Luiz Inácio Lula da Silva
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Roberto Rodrigues
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração
Luis Carlos Guedes Pinto
Presidente

Clayton Campanhola
Vice-Presidente
Alexandre Kalil Pires
Ernesto Paterniani
Hélio Tollini
Marcelo Barbosa Saintive
Membros

Diretoria-Executiva
Clayton Campanhola
Diretor-Presidente

Gustavo Kauark Chianca
Herbert Cavalcante de Lima
Mariza Marilena T. Luz Barbosa
Diretores-Executivos

Embrapa Agropecuária Oeste
Mário Artemio Urchei
Chefe-Geral
Renato Roscoe
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento
Auro Akio Otsubo
Chefe-Adjunto de Administração



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agropecuária do Oeste
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ISSN 1679-043X

Dezembro, 2004

Documentos67

Isolamento e Seleção Inicial de Rizóbios Obtidos de Solos de Mato Grosso do Sul para Inoculação em Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)

Fábio Martins Mercante
Auro Akio Otsubo
Aroldo da Silva Júnior
Fernanda Veraldo

Dourados, MS
2004

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agropecuária Oeste

BR 163, km 253,6 - Trecho Dourados-Caarapó

Caixa Postal 661

79804-970 Dourados, MS

Fone: (67) 425-5122

Fax: (67) 425-0811

www.cpao.embrapa.br

E-mail: sac@cpao.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Renato Roscoe*

Secretário-Executivo: *Rômulo Penna Scorza Júnior*

Membros: *Amoacy Carvalho Fabricio, Clarice Zanoni Fontes, Eli de Lourdes Vasconcelos, Fernando Mendes Lamas e Gessi Ceccon*

Editoração eletrônica, Revisão de texto e Supervisão editorial:

Eliete do Nascimento Ferreira

Normalização bibliográfica: *Eli de Lourdes Vasconcelos*

Fotos da capa: *Fábio Martins Mercante*

1ª edição

1ª impressão (2004): online

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei Nº 9.610).

CIP-Catálogo-na-Publicação.

Embrapa Agropecuária Oeste.

Isolamento e seleção inicial de rizóbios obtidos de solos de Mato Grosso do Sul para inoculação em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) / Fábio Martins Mercante ... [et al.]. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 24 p. : il. ; 21 cm. (Documentos / Embrapa Agropecuária Oeste, ISSN 1679-043X ; 67).

1. Rizóbio - Seleção - Feijoeiro - Brasil - Mato Grosso do Sul. 2. Feijoeiro - Rizóbio - Seleção - Brasil - Mato Grosso do Sul. I. Mercante, Fábio Martins. II. Embrapa Agropecuária Oeste. III. Título. IV. Série.

Autores

Fábio Martins Mercante

Eng. Agrôn., Pesquisador, Dr.,
Embrapa Agropecuária Oeste,
Caixa Postal 661, 79804-970 Dourados, MS.
Fone: (67) 425-5122, Fax: (67) 425-0811
E-mail: mercante@cpao.embrapa.br

Auro Akio Otsubo

Eng. Agrôn., Pesquisador, M.Sc.,
Embrapa Agropecuária Oeste,
Caixa Postal 661, 79804-970 Dourados, MS.
Fone: (67) 425-5122, Fax: (67) 425-0811
E-mail: auro@cpao.embrapa.br

Aroldo da Silva Júnior

Biólogo, Embrapa Agropecuária Oeste,
Caixa Postal 661, 79804-970 Dourados, MS.
Fone: (67) 425-5122, Fax: (67) 425-0811
E-mail: aroldo@cpao.embrapa.br

Fernanda Veraldo

Bióloga, bolsista do CNPq/Embrapa Agropecuária
Oeste.

Apresentação

Diversos estudos vêm sendo conduzidos na *Embrapa Agropecuária Oeste*, visando atender a demanda de diferentes setores da sociedade, quanto à geração de conhecimento e desenvolvimento de tecnologias para maximizar a contribuição da fixação biológica de nitrogênio na cultura do feijoeiro e, conseqüentemente, elevar os níveis de produtividade média da cultura, sem onerar o custo de produção e mantendo a sustentabilidade ambiental.

Neste sentido, foi implantada a Coleção de Culturas de Bactérias Diazotróficas Simbióticas na *Embrapa Agropecuária Oeste*, com o objetivo de promover a avaliação e conservação dos recursos genéticos dessas bactérias, obtidas de solos do Estado de Mato Grosso do Sul. Nesta publicação são apresentados os resultados do isolamento e da etapa inicial de seleção de estirpes de rizóbio eficientes e adaptadas às condições locais, que são de grande importância para o incremento do potencial simbiótico na cultura do feijoeiro.

Mário Artemio Urchei
Chefe-Geral
Embrapa Agropecuária Oeste

Sumário

- 7..... **Isolamento e Seleção Inicial de Rizóbios Obtidos de Solos de Mato Grosso do Sul para Inoculação em Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**
- 7 **Resumo**
- 11..... **Introdução**
- 14..... **Material e Métodos**
- 14..... Isolamento e seleção de estirpes de *Rhizobium*
- 15..... Caracterização morfológica dos isolados de rizóbio
- 16..... **Resultados**
- 16..... Obtenção dos isolados de rizóbio
- 18..... Caracterização morfológica dos isolados de rizóbio
- 19..... Eficiência simbiótica das estirpes de rizóbio inoculadas em feijoeiro, sob condições controladas
- 21..... **Conclusões**
- 21..... **Agradecimentos**
- 22..... **Referências Bibliográficas**

Isolamento e Seleção Inicial de Rizóbios Obtidos de Solos de Mato Grosso do Sul para Inoculação em Feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)

Fábio Martins Mercante

Auro Akio Otsubo

Aroldo da Silva Júnior

Fernanda Veraldo

Resumo

Existe uma demanda eminente por tecnologias apropriadas para a cultura do feijoeiro, de menor risco, menos exigentes em insumos e que sejam capazes de promover aumentos no rendimento e redução dos custos. Assim, este estudo tem como objetivo a formação de um banco de germoplasma de rizóbio e a seleção de estirpes mais eficientes e adaptadas às condições locais para inoculação em feijoeiro. Os ensaios foram conduzidos na *Embrapa Agropecuária Oeste* e constou de experimentos de laboratório e casa de vegetação. Nestes estudos, *Leucaena leucocephala* e feijoeiro, cv. Carioca, foram utilizados para recuperar estirpes de rizóbio de solos de 34 municípios produtores de feijão do Estado de Mato Grosso do Sul e um município de Mato Grosso, abrangendo 87 locais diferentes. Foram obtidos 1.526 isolados de rizóbio, sendo 65% oriundos de nódulos de leucena e 35% de nódulos de feijoeiro. Avaliaram-se, em laboratório, 263 isolados de rizóbio obtidos de nódulos de leucena quanto ao crescimento em meio LB ("Luria-Bertani") e crescimento a 40°C "in-vitro". Do total de

isolados, 60% cresceram em meio LB, dos quais cerca de 82% também cresceram a 40°C, demonstrando uma elevada correlação entre essas duas características dos isolados. A eficiência simbiótica de 232 isolados de rizóbio inoculados em feijoeiro, cv. Carioca, foi avaliada sob condições controladas de casa de vegetação, sendo comparada com tratamentos-controle sem inoculação e com adubação com N-uréia, sem inoculação. Além disso, a eficiência dos isolados obtidos foi comparada com a eficiência das estirpes CIAT 899 e PRF 81, recomendadas para produção do inoculante comercial para o feijoeiro no Brasil. Cerca de 50%, 76% e 78% dos isolados de rizóbio nativos avaliados foram mais eficientes do que a inoculação com a estirpe CIAT 899, quanto ao número de nódulos, peso de nódulos secos e produção de matéria seca da parte aérea dos feijoeiros, respectivamente. Estes resultados preliminares demonstram o grande potencial simbiótico de isolados de rizóbio nativos para a obtenção de inoculantes mais eficazes para a cultura do feijoeiro no país.

Palavras-chave: Fixação biológica de nitrogênio, simbiose, *Phaseolus vulgaris*, *Leucaena leucocephala*.

Introdução

A importância social e econômica da cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) no Estado de Mato Grosso do Sul é evidenciada pelo contingente de pequenos produtores, que praticam agricultura familiar, de baixa utilização de insumos. De acordo com os levantamentos anuais realizados pelo IBGE, a cultura do feijoeiro vem sendo produzida em todas as microrregiões homogêneas do Estado, ocupando uma área total de 30.873 ha na Safra Agrícola de 1998 (Levantamento Sistemático da Safra Agrícola de Mato Grosso do Sul, 1998). A mesorregião sudoeste de Mato Grosso do Sul, que abrange as microrregiões homogêneas de Bodoquena, Dourados e Iguatemi, concentra mais de 70% da produção de feijão do Estado, destacando-se a microrregião de Dourados com produção de 16.767 toneladas, equivalente a 50% da produção total do Estado.

A estimativa atual em Mato Grosso do Sul é da existência de 38 mil agricultores familiares, que representam um segmento produtivo com grande potencial para geração de emprego, renda e responsável, em grande parte, pelo abastecimento do mercado interno com alimentos básicos (IBGE, 2004).

Contudo, o setor de produção agrícola familiar necessita de tecnologias apropriadas, que sejam de baixo custo e capazes de aumentar seus rendimentos. Dentro deste contexto, um dos fatores que mais contribuem na elevação do custo de produção das lavouras de feijão refere-se aos fertilizantes minerais, principalmente, os nitrogenados, que são exigidos em maior quantidade pelas plantas e podem ser perdidos facilmente por lixiviação (NO_3^-), volatilizado na forma de NH_3 ou perdido por desnitrificação (redução microbiológica do NO_3^- a N_2O e N_2).

Considerando-se a baixa eficiência de uso do fertilizante nitrogenado pela cultura do feijoeiro e os problemas ambientais ocasionados pelo excesso de sua utilização, a fixação biológica de nitrogênio assume uma importância ainda mais evidente, representando a alternativa mais viável para o fornecimento de nitrogênio à cultura. Assim, o suprimento de nitrogênio à cultura via fertilizante mineral exige aplicações cada vez mais freqüentes e, conseqüentemente, representa um aumento significativo nos custos de produção. Entretanto, em muitos casos, tem-se observado baixa freqüência de resposta à inoculação do feijoeiro em condições de campo, que tem sido atribuída à susceptibilidade de ambos parceiros simbióticos a estresses ambientais, como deficiência hídrica e temperatura elevada do solo (Martínez-Romero et al., 1991; Mercante, 1993; Hungria et al., 1993), ao ataque de pragas e doenças (Teixeira et al., 1996), ao ciclo curto da cultura (Hardarson, 1993) e à baixa competitividade das bactérias inoculadas em relação às estirpes de rizóbio nativas dos solos (Martínez-Romero et al., 1991; Thies et al., 1991; Vlassak et al., 1997; Mercante et al., 1999).

Alguns estudos realizados no Brasil detectaram um elevado nível de diversidade entre isolados de rizóbio que nodulam o feijoeiro (Mercante et al., 1998; Stralioetto et al., 1999). Entretanto, o conhecimento sobre a diversidade de rizóbio que nodula o feijoeiro ainda é bastante limitado em solos brasileiros, apesar dos avanços verificados nos últimos anos. Atualmente, entre as espécies descritas capazes de nodular e fixar nitrogênio em feijoeiros, incluem-se: *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (Jordan, 1984), *R. tropici* (Martínez-Romero et al., 1991), *R. etli* (Segovia et al., 1993), *R. gallicum* e *R. giardinii* (Amarger et al., 1997). O conhecimento de que *R. tropici* apresenta maior estabilidade genética, pela menor reiteração dos genes *nif*, surgiu como a solução para a obtenção de estirpes que apresentassem menor

alteração das características simbióticas (Flores et al., 1988; Martínez-Romero et al., 1991). Assim, na “VI Reunião da Rede de Laboratórios para a Recomendação de Estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* - RELARE”, realizada em 1994, decidiu-se que, a partir de então, apenas a espécie *R. tropici* deveria ser recomendada em inoculantes comerciais brasileiros (Hungria & Araújo, 1995).

Neste sentido, a recomendação de inoculantes para o feijoeiro com estirpes de *R. tropici* tem contribuído significativamente para o aumento da fixação de N₂ nessa cultura, uma vez que apresentam, além de maior estabilidade genética, outras características agronomicamente importantes para as condições dos solos tropicais, como tolerância a temperaturas elevadas, toxidez de alumínio, acidez elevada e tolerância a altos níveis de antibiótico (Martínez-Romero et al., 1991). Contudo, a recomendação generalizada de inoculante para o feijoeiro com as mesmas estirpes de rizóbio para todas as regiões do país, independente das cultivares utilizadas e das condições ambientais locais, tem ocasionado ampla variabilidade de resposta à inoculação em condições de campo, demonstrando, freqüentemente, limitações do potencial simbiótico nesta interação.

Assim, o presente estudo teve como objetivo a formação de um banco de germoplasma e a seleção de estirpes de rizóbio mais eficientes e adaptadas às condições locais para inoculação em feijoeiro.

Material e Métodos

Isolamento e seleção de estirpes de Rhizobium

Os isolados de rizóbio foram obtidos de nódulos de plantas de *Leucaena leucocephala*, var. K-72, e feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), cv. Carioca, crescidas em vasos de "Leonard" (Vincent, 1970). Cada vaso, contendo uma mistura de areia e vermiculita (2:1, v:v) foi esterilizado e, posteriormente, inoculado com 50 g de solo coletado em diversas regiões tradicionalmente produtoras de feijão em Mato Grosso do Sul. Inicialmente, plantas de feijoeiro foram cultivadas nestes vasos de "Leonard" e, após 35-40 dias da germinação, as plantas foram colhidas, os substratos devolvidos aos respectivos vasos e os nódulos separados para o isolamento. Em seguida, plantas de *Leucaena* foram cultivadas nos mesmos vasos de "Leonard" até 65 dias após a semeadura, selecionando-se cerca de 20 nódulos em cada vaso, dos quais foram realizados os isolamentos de rizóbio. Para o isolamento das estirpes de rizóbio, os nódulos foram esterilizados superficialmente com uma solução de hipoclorito de sódio (10%) e os isolados obtidos, purificados em meio "yeast mannitol agar"- YMA (Vincent, 1970).

A eficiência simbiótica dos isolados de rizóbio foi avaliada em condições controladas de casa de vegetação, utilizando-se vasos de "Leonard" esterilizados, conforme descrito anteriormente. Nessa avaliação, culturas puras de rizóbio foram crescidas em meio YM (Vincent, 1970) a 30°C, por três dias, com agitação. Cada semente foi inoculada com 0,5 ml de suspensão, contendo cerca de 10^8 células de rizóbio. ml⁻¹. Em todos os ensaios, foram incluídos tratamentos sem inoculação e outro recebendo apenas N-NH₄NO₃, que serviram de controle para comparação. Além disso, a eficiência

dos isolados obtidos foi comparada com a eficiência das estirpes CIAT 899 e PRF 81, recomendadas para produção do inoculante comercial para o feijoeiro no Brasil. Durante o período de crescimento, as plantas foram supridas com solução nutritiva sem nitrogênio (Norris & T`Mannetje, 1964, modificada), conforme descrito em Mercante (1997). O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, com três repetições. No início do florescimento, as plantas foram colhidas, sendo analisados parâmetros relacionados à nodulação e parte aérea das plantas.

Caracterização morfológica dos isolados de rizóbio

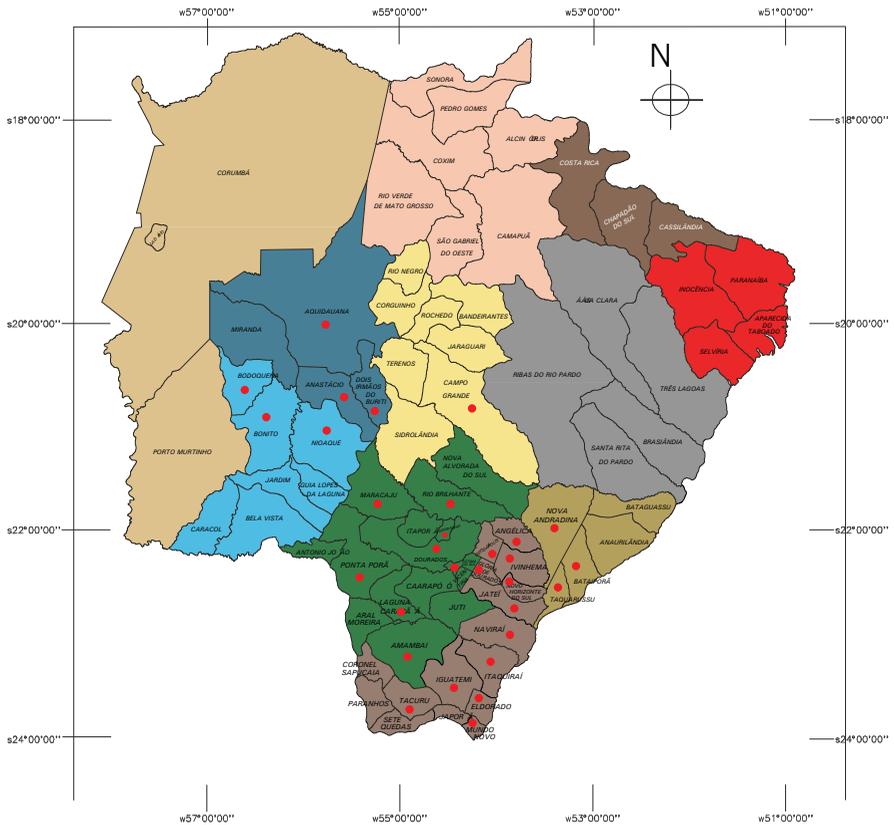
Avaliaram-se 263 isolados de rizóbio obtidos de nódulos de leucena quanto ao crescimento em meio LB ("Luria-Bertani") e crescimento "in vitro" a 40°C em meio de cultura YMA (Vincent, 1970).

Resultados

Obtenção dos isolados de rizóbio

Foram obtidos 1.526 isolados de rizóbio, sendo 65% oriundos de nódulos de leucena e 35% de nódulos de feijoeiro. Os municípios e os respectivos números de locais amostrados (apresentados entre parênteses) foram os seguintes: Amambai (2), Anastácio (4), Angélica (1), Aquidauana (2), Bataiporã (2), Bodoquena (2), Bonito (3), Campo Grande (3), Corumbá (5), Deodópolis (2), Dois Irmãos do Buriti (12), Douradina (2), Dourados (3), Eldorado (2), Fátima do Sul (3), Glória de Dourados (1), Guia Lopes da Laguna (2), Iguatemi (1), Itaporã (4), Itaquiraí (3), Ivinhema (1), Laguna Carapã (3), Maracaju (2), Mundo Novo (2), Naviraí (1), Nioaque (2), Nova Andradina (1), Novo Horizonte do Sul (2), Ponta Porã (2), Rio Brillhante (3), São Gabriel do Oeste (1), Tacuru (1), Taquarussu (3), Vicentina (2) e Alto Taquari-MT (2).

O mapa de Mato Grosso do Sul e as regiões de onde procederam os isolados de rizóbio (assinaladas com pontos vermelhos) estão apresentados na Fig. 1.



Fonte: Mato Grosso do Sul (1995)

LEGENDA MICRORREGIÕES

 MR-01 Baixo Pantanal	 MR-05 Cassilândia	 MR-09 Bodoquena
 MR-02 Aquidauana	 MR-06 Paranaíba	 MR-10 Dourados
 MR-03 Alto Taquari	 MR-07 Três Lagoas	 MR-11 Iguatemi
 MR-04 Campo Grande	 MR-08 Nova Andradina	

Fig. 1. Municípios de onde procederam os isolados de *Rhizobium* sp. (pontos vermelhos), de acordo com as microrregiões do Estado de Mato Grosso do Sul.

Caracterização morfológica dos isolados de rizóbio

Avaliaram-se 263 isolados de rizóbio obtidos de nódulos de leucena quanto ao crescimento em meio LB ("Luria-Bertani") e crescimento "in vitro" a 40°C. Do total de isolados avaliados, 60% cresceram em meio LB, dos quais cerca de 82% também cresceram a 40°C. Por outro lado, dos isolados que não cresceram no meio LB (40%), apenas 26% apresentaram crescimento a 40°C (Fig. 2). Tais resultados indicam uma elevada correlação entre o crescimento das estirpes em meio LB e sua tolerância a temperatura de 40°C.

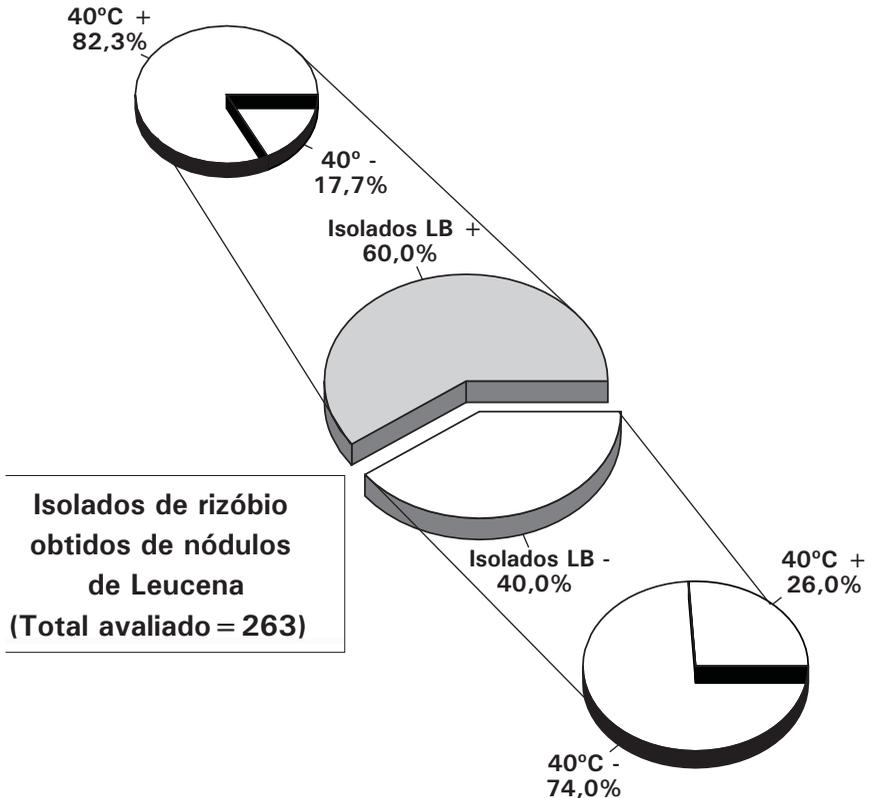


Fig. 2. Avaliação do crescimento de 263 isolados de *Rhizobium* sp. no meio LB ("Luria-Bertani") e a 40°C em meio YMA ("yeast mannitol agar").

Eficiência simbiótica das estirpes de rizóbio inoculadas em feijoeiro, sob condições controladas

A eficiência simbiótica de 232 isolados de rizóbio inoculados em feijoeiro, cv. Carioca, foi avaliada sob condições controladas de casa de vegetação, sendo comparada com tratamentos-controle sem inoculação e com adubação com N-uréia, sem inoculação. Além disso, a eficiência dos isolados obtidos foi comparada com a eficiência das estirpes CIAT 899 e PRF 81, recomendadas para produção do inoculante comercial para o feijoeiro no Brasil. Cerca de 50%, 76% e 78% dos isolados de rizóbio nativos de solos de Mato Grosso do Sul mostraram-se mais eficientes do que a inoculação com a estirpe CIAT 899, quanto ao número de nódulos, peso de nódulos secos e produção de matéria seca da parte aérea dos feijoeiros, respectivamente (Fig. 3A, 3B e 3C). Do mesmo modo, a grande maioria dos isolados de rizóbio obtidos no presente estudo mostraram-se mais eficientes do que a estirpe PRF 81, quando inoculados em sementes de feijoeiro, conforme demonstrado na Fig. 3.

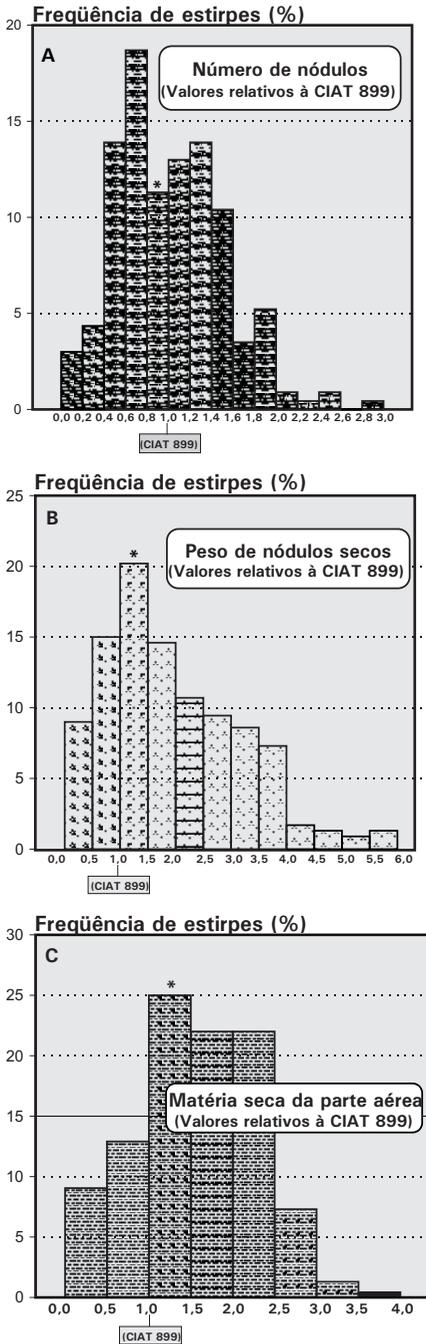


Fig 3. Número de nódulos (A), peso de nódulos secos (B) e matéria seca da parte aérea (C) de feijoeiros, cv. Carioca, inoculados com 232 isolados (cinco experimentos) de rizóbio nativos de MS. Valores relativos à estirpe CIAT899. Médias de três repetições. *Inclui a estirpe PRF81.

Conclusão

Um grande número de isolados nativos de rizóbios provenientes de solos de diversas regiões de Mato Grosso do Sul e obtidos de nódulos de leucena demonstraram um grande potencial simbiótico para inoculação em feijoeiro, abrindo perspectivas para a obtenção de inoculantes mais eficazes para esta cultura.

Agradecimentos

Ao Técnico Agrícola Júlio Aparecido Leal, pelo auxílio na execução do trabalho.

À FUNDECT - Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul, pela concessão dos recursos para realização do trabalho.

Referências Bibliográficas

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.

FLORES, M.; GONZÁLEZ, V.; PARDO, M. A.; LEIJA, A.; MARTÍNEZ, E.; ROMERO, D.; PINERO, D.; DÁVILA, G.; PALACIOS, R. Genomic instability in *Rhizobium phaseoli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 170, p. 1191-1196, 1988.

HARDARSON, G. Methods for enhancing symbiotic nitrogen fixation. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 152, n. 1, p. 1-17, 1993.

HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. Relato da VI Reunião de Laboratórios para Recomendação de Estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*. In: HUNGRIA, M.; BALOTA, E. L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D. S. (Ed.). **Microbiologia do solo: desafios para o século XXI**. Londrina: IAPAR: EMBRAPA-CNPSO, 1995. p.476-489.

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. 95-102, 1993.

JORDAN, D. C. *Rhizobiaceae* Conn 1938. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey`s manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. p. 235-244.

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* spp. trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v. 41, p. 417-426, 1991.

MERCANTE, F. M. **Diversidade genética de rizóbio que nodula o feijoeiro e troca de sinais moleculares na simbiose com plantas hospedeiras**. 1997. 199 p. Tese (Doutorado) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí.

MERCANTE, F. M. **Uso de *Leucaena leucocephala* na obtenção de *Rhizobium* tolerante a temperatura elevada para inoculação do feijoeiro**. 1993. 149 p. Tese (Mestrado) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí.

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 brazilian "Cerrado" region. **Revista de Microbiologia**, v. 29, p. 49-58, 1998.

MERCANTE, F. M.; TEIXEIRA, M. G.; ABBOUD, A. C. S.; FRANCO, A. A. Avanços biotecnológicos na cultura do feijoeiro sob condições simbióticas. **Revista Universidade Rural: Série Ciência da Vida**, v. 21, n. 1-2, p. 127-146, 1999.

NORRIS, D. O.; T`MANNETJE, L. The symbiotic specialization of African *Trifolium* spp. in relation to their taxonomy and their agronomic use. **East African Agricultural and Forestry Journal**, Nairobi, v. 29, p. 214-35, 1964.

SEGOVIA, L.; YOUNG, J. 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**, Washington, v. 43, p. 374-377, 1993.

STRALIOTTO, R.; CUNHA, C. de O.; MERCANTE, F. M.; FRANCO, A. A.; RUMJANEK, N. G. Diversity of rhizobia nodulating common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) isolated from Brazilian tropical soils. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 71, p. 3-11, 1999.

TEIXEIRA, M. L. F.; COUTINHO, H. L. C.; FRANCO, A. A. Effects of *Cerotoma arcuata* (Coleoptera: Crysomelidae) on predation of nodules and on N₂ fixation of *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Economic Entomology**, Lanham, v. 89, p. 165-169, 1996.

THIES, J. E.; SINGLETON, P. W.; BOHLOOL, B. B. Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 19-28, 1991.

VINCENT, J. M. **A manual for the practical study of root nodule bacteria**. London: International Biological Programme, 1970. 164 p. (IBP Handbook, 15).

VLASSAK, K.; MERCANTE, F. M.; STRALIOTTO, R.; FRANCO, A. A.; VUYLSTEKE, M.; VANDERLEYDEN, J. Evaluation of the intrinsic competitiveness and saprophytic competence of *Rhizobium tropici* IIB strains. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 24, p. 274-282. 1997.



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agropecuária do Oeste
BR 163, km 253,6 - Trecho Dourados-Caarapó
Caixa Postal 661 - 79804-970 Dourados, MS
Telefone (67) 425-5122 Fax (67) 425-0811
www.cpao.embrapa.br*

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**

