

00279

CNPAB

1996

Ex. 2

FL-00279

ISSN 0104-6187

Ministério da Agricultura e do Abastecimento  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA  
Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia-CNPAB

FL00279  
ex.2

## ECOLOGIA DO RIZÓBIO EM SOLOS TROPICAIS

EMBRAPA-CNPAB

Seropédica, RJ

1966

Ecologia do rizóbio em solos

1996

FL-00279



26381-2



**Ministério da Agricultura e do Abastecimento**  
**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA**  
**Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia-CNPAB**

## **ECOLOGIA DO RIZÓBIO EM SOLOS TROPICAIS**

**Maria Cristina Prata Neves**  
**Norma Gouvêa Rumjanek**

**EMBRAPA-CNPAB**

**Seropédica, RJ**

**1996**

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à  
EMBRAPA:CNPAB

Antiga Rodovia Rio/São Paulo

Telefone: (021)682 1500

Telex: (21) 32723 EBPA

Fax: (021) 682 1230

Caixa Postal: 74505

23851-970, Seropédica, RJ

Tiragem: 50 exemplares

Comitê de Publicação:

Johanna Döbereiner

Helvécio De-Polli

José Ivo Baldani

Paulo Augusto da Eira

Eliane Maria Ribeiro da Silva

Dejair Lopes de Almeida

Dorimar dos Santos Félix (Bibliotecária)

NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N. Ecologia do Rizóbio em Solos Tropicais. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1996. 27p. (EMBRAPA-CNPAB, Documentos, 23).

1. Solo - Região tropical. 2. Solo - Nitrogênio - Fixação. 3. Rhizobium. 4. Ecologia - Diversidade. I. Rumjanek, N.G., colab. II. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ). III. Título. IV. Série.

CDD 631.4913

# ECOLOGIA DO RIZÓBIO EM SOLOS TROPICAIS<sup>1</sup>

Maria Cristina Prata Neves<sup>2</sup>  
Norma Gouvêa Rumjanek<sup>3</sup>

## Introdução

Os rizóbios, assim como todas as bactérias diazotróficas utilizam como fonte de nitrogênio para seu metabolismo o enorme reservatório de nitrogênio gasoso ( $N_2$ ) da atmosfera ( $\cong 79\%$ ). O  $N_2$  é pouco reativo e somente um grupo seleto de seres vivos, algumas espécies de microrganismos procarióticos, bactérias e actinomicetos, possui o complexo enzimático chamado nitrogenase, necessário para transformá-lo em amônia que é subsequente assimilada em amino-ácidos e proteínas. Este processo é chamado fixação biológica de nitrogênio (FBN).

O N é um nutriente essencial para a vida e em regiões tropicais, é freqüentemente limitante para a produção agrícola. São muitos os processos envolvidos na ciclagem deste importante elemento: desnitrificação, volatilização da amônia e queimadas (processos que retornam o N à forma gasosa) e lixiviação de nitratos para as camadas profundas do solo, conduzindo à perda do N nos ecossistemas. Além disto, o N dos solos agrícolas é exportado para as cidades, através da comercialização dos produtos. Como conseqüência, a maioria dos solos das regiões tropicais são deficientes em N, causando graves limitações à produção de alimentos. Somente os fertilizantes nitrogenados ou a FBN podem retornar aos solos agrícolas, o N perdido.

A exploração agrícola da FBN nos países desenvolvidos tem sido motivada pela conscientização ecológica a respeito do uso intensivo e às vezes abusivo dos agroquímicos. Esta ainda não é a grande preocupação em muitos países em desenvolvimento. Nestes países, a FBN representa a diminuição do custo da produção. De um modo ou de outro, a exploração agrícola da FBN depende do profundo conhecimento dos rizóbios, suas relações com as plantas superiores e com os demais membros da microflora do solo e da rizosfera.

A lista de espécies diazotróficas cresce proporcionalmente à importância que a FBN assume nos sistemas de produção agrícola. Entretanto, a importância de outros microrganismos diazotróficos que não as Rhizobiaceae ainda está longe de ser bem avaliada. Existem indicações de que outras espécies possuam papéis importantes na ciclagem de nitrogênio do planeta mas o desenvolvimento de metodologia adequada é indispensável para que se possa determinar a dinâmica populacional e a sua importância ecológica. A simbiose rizóbio/leguminosa representa o sistema fixador de  $N_2$  de maior importância para a agricultura e em mais de um século de estudos, uma vasta gama de conhecimentos vem sendo acumulada sobre a ecologia da bactéria de vida livre no solo e sobre a simbiose estabelecida com as leguminosas.

---

<sup>1</sup> EMBRAPA-CNPAB, Caixa Postal 74505, Seropédica, 23851-970, Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: agrob@cnps.embrapa.br

<sup>2</sup> Bióloga, PhD, EMBRAPA-CNPAB

<sup>3</sup> Bioquímica, PhD, EMBRAPA-CNPAB

## As espécies de Rizóbios

As bactérias dos gêneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium* e *Azorhizobium* (coletivamente referidas como rizóbio), são microrganismos rizosféricos que estabelecem associações simbióticas facultativas com as leguminosas (principalmente espécies das subfamílias Papilionoideae e Mimosoideae) e com *Parasponia*, uma Ulmaceae (Trinick & Hadobas 1988), formando estruturas especiais nas raízes ou caule, denominadas nódulos.

**Tabela 1 - Espécies reconhecidas de rizóbio**

<b>Espécie</b>	<b>Referências</b>
<b><i>Bradyrhizobium</i></b>	
<i>B. japonicum</i>	Jordan 1982
<i>B. elkanii</i>	Kuykendall <i>et al.</i> 1992
<i>B. liaoningense</i>	Xu <i>et al.</i> 1995
<b><i>Rhizobium</i></b>	
<i>R. loti</i>	Jordan 1984
<i>R. leguminosarum</i> biovar <i>trifolii</i>	Jordan 1984
<i>R. leguminosarum</i> biovar <i>phaseoli</i>	Jordan 1984
<i>R. leguminosarum</i> biovar <i>viceae</i>	Jordan 1984
<i>R. galegae</i>	Lindström 1989
<i>R. tropici</i>	Martinez-Romero <i>et al.</i> 1991
<i>R. huakuii</i>	Chen <i>et al.</i> 1991
<i>R. etli</i>	Segóvia <i>et al.</i> 1993
<i>R. ciceri</i>	Nour <i>et al.</i> 1994
<i>R. tianshanense</i>	Chen <i>et al.</i> 1995
<i>R. hainanensis</i>	Chen <i>et al.</i> 1994
<i>R. mediterraneum</i>	Nour <i>et al.</i> 1995
<b><i>Azorhizobium</i></b>	
<i>A. caulinodans</i>	Dreyfus <i>et al.</i> 1988
<b><i>Sinorhizobium</i></b>	
<i>S. fredii</i>	Scholla & Elkan 1984, Lajudie <i>et al.</i> 1994
<i>S. xinjiangensis</i>	Chen <i>et al.</i> 1988
<i>S. saheli</i>	Lajudie <i>et al.</i> 1994
<i>S. teranga</i>	Lajudie <i>et al.</i> 1994
<i>S. meliloti</i>	Lajudie <i>et al.</i> 1994

Inúmeros estudos objetivando levantamento, isolamento e seleção de rizóbio com características de tolerância a estresses têm revelado um alto grau de diversidade nas populações de rizóbio do solo, principalmente nas regiões tropicais. Desde 1984, 13 espécies e 2 gêneros (*Azorhizobium*, um rizóbio que forma nódulos caulinares e *Sinorhizobium*) foram descritos (Tabela 1). O isolamento e a seleção de inúmeras estirpes capazes de nodular o feijoeiro revelaram diferenças genéticas marcantes entre os isolados, resultando na identificação de 2 novas espécies dentro da antiga espécie *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*: *R. tropici* (Martínez-Romero *et al.* 1991) e *R. etli* (Segóvia *et al.* 1993). Novos estudos têm indicado uma diversidade ainda maior pois cerca da metade dos isolados obtidos dos solos dos Cerrados brasileiros não apresentam similaridade com nenhuma das 3 espécies capazes de nodular o feijoeiro conhecidas até o momento (Mercante *et al.* 1996).

O inventário das leguminosas arbóreas da região Amazônica resultou em uma vasta coleção de rizóbios. Uma caracterização inicial desta coleção demonstrou um alto grau de diferenciação (Moreira *et al.* 1993). Alguns isolados de crescimento rápido mostraram grande semelhança com as espécies *R. loti*, *R. galegae*, *R. leguminosarum* bv.

*phaseoli* e *S. fredii*, porém a maioria dos grupos não se assemelharam com quaisquer das espécies já descritas. A lista de espécies de rizóbio cresce a cada dia e muitas espécies poderão vir a ser descritas a medida que aumenta o conhecimento sobre as leguminosas tropicais e de seus respectivos rizóbios.

A simbiose rizóbio/leguminosa representa o sistema fixador de N de maior importância para a agricultura e por isso os rizóbios têm sido os microrganismos diazotróficos mais estudados.

## Interações entre microrganismos diazotróficos e plantas superiores

Os solos das regiões tropicais são freqüentemente pobres em matéria orgânica, deste modo o suprimento de compostos ricos em energia costuma ser limitante. Os microrganismos diazotróficos evoluíram no sentido de colonizarem a rizosfera das plantas, beneficiando-se assim dos compostos ricos em carbono que são exsudados pelas raízes.

Um grande número de plantas cultivadas mantêm em suas raízes uma população ativa de microrganismos diazotróficos. Muitas destas associações sofreram especializações ao longo do processo evolutivo, resultando em relações muito estreitas entre a planta e a bactéria e culminando com a invasão dos tecidos do vegetal pela bactéria, inclusive promovendo a formação de estruturas especializadas (um nicho adequado onde as trocas gasosas e de nutrientes passam a ser mais eficientes) que garantem proteção contra fatores adversos do solo (Sprent & Faria, 1989).

Até o momento são conhecidos quatro grupos de microrganismos diazotróficos heterotróficos capazes de infectar a planta hospedeira: (1) *Azospirillum* e outras bactérias endofíticas facultativas, (2) *Acetobacter* e outras bactérias endofíticas obrigatórias, (3) *Frankia* e (4) as diversas espécies de rizóbios. Os mecanismos que levam à infecção de plantas por microrganismos diazotróficos foram bem discutidos por Sprent & Faria (1989).

Antes que a infecção de raízes possa ocorrer, a bactéria deve colonizar a rizosfera da planta e a superfície das raízes (Figura 1). Esta etapa envolve pelo menos 4 eventos: (1) quimiotaxia; (2) reconhecimento; (3) adesão e (4) fornecimento de nutrientes. As bactérias podem penetrar nas raízes ou nas hastes do vegetal quando ocorre o crescimento de uma raiz lateral ou adventícia, ou através dos pêlos radiculares, ou ainda entre células danificadas da epiderme do vegetal. O movimento subsequente das bactérias pode ser intercelular, através da digestão da lamela média, via espaços intercelulares ou através das células quando então as bactérias ficam confinadas pela planta hospedeira em cordões de infecção formados por material da parede celular.

A simbiose entre as leguminosas e os rizóbios tem sido objeto de estudos complexos que resultaram na identificação de uma comunicação entre os dois parceiros, mediada pela troca de sinais moleculares específicos (Figura 1). Antes do estabelecimento da simbiose, o rizóbio, é quimiotaticamente atraído para a rizosfera por compostos (aminoácidos ou açúcares) exsudados pela planta (Aguilar *et al.* 1988; Kape *et al.* 1991).

A partir daí, ocorre uma interação química específica entre o rizóbio e a planta hospedeira, mediada pela produção de flavonóides (flavonas, flavanonas e isoflavonas) pelas raízes (Hungria 1994). Os flavonóides são indutores potentes e a presença de diversos indutores em concentrações sub-ótimas pode resultar numa resposta sinérgica da expressão gênica. Os flavonóides exsudados ativam o funcionamento dos genes *nod* e *nol*, presentes no cromossoma das espécies de *Bradyrhizobium* e *Azorhizobium* ou contidos nos plasmídeos simbióticos das espécies de *Rhizobium*. Os genes *nod* podem ser de dois tipos: comuns e relacionados com a especificidade hospedeira. A organização destes genes é muito conservada nas diferentes espécies de rizóbio. Os genes *nodABC* são considerados essenciais para o processo da nodulação. Além destes, o gene *nodD* é atualmente considerado como responsável pela especificidade (Spaink 1994). Uma série de outros genes tem sido também descritos como responsável pela especificidade. O gene *nodD*, ao contrário dos demais, é um gene estrutural, ou seja, sua síntese ocorre independentemente de qualquer estímulo e por isso a proteína NodD está sempre presente na célula bacteriana. O conjunto destes genes são responsáveis pela produção dos fatores de nodulação, que

são substâncias do tipo dos oligossacarídeos. A interação dos flavonóides e a proteína NodD resultam na alteração conformacional da proteína NodD que faz com que os genes *nod* sejam induzidos (Schlaman *et al.* 1992). Os genes induzidos passam a sintetizar proteínas com atividade catalítica que são responsáveis pela síntese de lipo-oligossacarídeos. A estrutura dos lipo-oligossacarídeos está relacionada à faixa de hospedeiros de uma dada espécie de rizóbio. *Bradyrhizobium elkanii*, uma espécie de rizóbio que produz diversos lipo-oligossacarídeos apresenta uma faixa maior de hospedeiros do que *B. japonicum*, que é capaz de sintetizar um número menor destas substâncias (Carlson *et al.* 1993). Os lipo-oligossacarídeos são liberados pela bactéria e se forem reconhecidos pelas células da raiz desencadearão uma série de alterações na estrutura deste órgão, iniciadas pelo encurvamento do pelo radicular e formação de um cordão de infecção, que permite a entrada de bactérias e posterior desenvolvimento dos nódulos. As bactérias são posteriormente liberadas do cordão de infecção (nas leguminosas primitivas e na *Parasponia* porém, o rizóbio persiste dentro do cordão) e passam a infectar as células vegetais, contidas por um envelope membranoso que as separa do citoplasma. As trocas de sinais moleculares e os mecanismos genéticos de controle da nodulação têm sido objeto de várias revisões (Long 1989).

De modo geral pode ser observada especificidade na formação do nódulo. Tem sido entretanto, demonstrado que várias leguminosas podem ser noduladas por espécies diferentes de rizóbio, incluindo espécies de crescimento lento e de crescimento rápido (Moreira *et al.* 1993, Padmanabham *et al.* 1990, Pankhurst, 1977), o que é uma indicação de que vários compostos indutores e inibidores podem estar envolvidos durante a formação do nódulo.

O compartilhamento de estirpes por leguminosas como a soja (*Glycine max*), o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) e o feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) tem-se revelado surpreendente e foi recentemente revisado por Neves & Rumjanek (1996): a soja por exemplo, pode ser nodulada por espécies de crescimento lento, *B. japonicum* e *B. elkanii*, e de crescimento rápido, *S. fredii*. Recentemente, foi demonstrado que pelo menos 3 outras espécies de rizóbio são capazes de nodular a soja. *S. fredii* além da soja, nodula também o feijão e cerca de 60 outras espécies enquanto que espécies de rizóbio que nodulam feijão são capazes de nodular muitas outras leguminosas, incluindo espécies tropicais como o feijão-de-corda que nodulam com grande grupo de rizóbios de crescimento lento (grupo caupi ou grupo tropical de inoculação cruzada). Já foi demonstrado também que *B. japonicum* e *B. elkanii* nodulam espécies de leguminosas arbóreas tropicais (Moreira *et al.* 1993). À medida que mais estudos são realizados sobre a biodiversidade deste grupo de bactérias, observa-se que tanto uma espécie de leguminosa pode ser nodulada por várias de rizóbio como o contrário também acontece. Um alto grau de especificidade em relação ao hospedeiro parece ser a exceção e não a regra (Figura 2).

### **Associações de microrganismos diazotróficos e plantas: evolução concomitante?**

O entendimento dos processos evolucionários que culminaram com o estabelecimento de associações entre plantas e microrganismos diazotróficos, levando inclusive à formação de estruturas especializadas como as actinorrizas e os nódulos radiculares ou caulinares nas simbioses rizóbio/leguminosas, representa a chave para a manipulação dos sistemas visando maior aproveitamento da FBN nas espécies de interesse econômico.

No caso das leguminosas, a hipótese mais recente considera dois eventos iniciais: um com o *Rhizobium* e outro com o *Bradyrhizobium* seguida da co-evolução das espécies (Sprent 1994). A situação aparentemente caótica de relacionamento entre a planta hospedeira e o rizóbio que se observa agora (Moreira *et al.* 1993), seria devida à mudança no clima e às conseqüentes pressões seletivas que se seguiram em cada região específica. Planta e rizóbio passaram a se adaptar às condições locais de clima e solo, com a população de rizóbio sofrendo transferência lateral de material genético. Como resultado, o padrão de co-evolução não mais seria possível de ser observado nos tempos atuais. Esta

hipótese postulada por Sprent (1994) consegue conciliar observações tais como: a enorme diversidade de rizóbio capazes de nodular *Acacia*, compreendendo estirpes de crescimento rápido, lento e muito lento (Barnet & Catt 1991); rizóbios isolados de leguminosas arbóreas, tolerantes a temperatura adversamente altas e capazes de nodular também o feijoeiro (Hungria *et al.* 1993).

### Diversidade do rizóbio encontrado no solo

Os rizóbios são microrganismos heterotróficos comuns dos solos tanto das regiões temperadas como das regiões tropicais mas não são membros dominantes da comunidade microbiana. Nas regiões de origem da planta hospedeira, rizóbios nativos estão sempre presentes no solo: por exemplo, *Bradyrhizobium* nodulando *Stylosanthes* nos solos dos Cerrados (Scotti *et al.* 1982), *R. etli* nodulando feijão em solos mexicanos (Segóvia *et al.* 1993), *R. fredii* e *B. japonicum* nodulando soja na China (Dowdle & Bohlool 1985). Quando a leguminosa hospedeira é introduzida em um novo ambiente, geralmente não se observa a nodulação da mesma a não ser que as sementes sejam inoculadas com estirpes específicas ou simplesmente misturadas com o solo da região de origem. As áreas tradicionalmente cultivadas com uma leguminosa, geralmente contêm uma população de rizóbio bem adaptada às condições locais.

Tem sido freqüentemente assumido que os solos cultivados nas regiões tropicais possuem uma população relativamente grande de rizóbios. Porém alguns levantamentos tem mostrado grande variabilidade na população de rizóbio dos solos agrícolas e que áreas de boa nodulação às vezes representam uma pequena proporção da área cultivada. Baixas populações de rizóbio < 100 células por grama de solo têm sido freqüentemente observadas nas regiões tropicais, em solos cultivados com diferentes leguminosas (Wani *et al.* 1995). Estimativas da população de mais de 300 amostras de solo provenientes de 17 países tropicais indicaram que apesar dos rizóbios do grupo caupi de inoculação cruzada estarem presentes em quase todos os solos, os números destas bactérias eram extremamente variáveis e em 46% das amostras havia menos do que 100 rizóbios g<sup>-1</sup> solo (Singleton *et al.* 1992). No caso da soja, feijão e leucena, esta condição (<100 rizóbios g<sup>-1</sup> solo) foi encontrada em 75, 64 e 75% dos solos estudados. Por outro lado, a ocorrência de nodulação não garante adequada contribuição da FBN frente as necessidades de nitrogênio da planta hospedeira. Nódulos ineficientes muitas vezes ocorrem em grande número (Wani *et al.* 1995), limitando a contribuição da FBN.

A população total de rizóbio se correlaciona com a média anual de chuva, com a cobertura de leguminosa, a biomassa de parte aérea, a temperatura e pH do solo e com a disponibilidade de fósforo (Woomer *et al.*, 1988). A população de rizóbio do solo está relacionada também com o histórico de cultivo da área. O plantio recente da leguminosa hospedeira é capaz de promover o aumento da população de rizóbio homólogo (e.g. Ramos & Boddey 1987, Vlassak *et al.* 1996, Yousef *et al.* 1987). Esta interação foi confirmada em 5 diferentes espécies de leguminosas, *Trifolium repens*, *Medicago sativa*, *Vicia sativa*, *Leucaena leucocephala*, e *Macroptilium atropurpureum* (Woomer *et al.* 1988), demonstrando que, no caso dos rizóbios, os mecanismos de adaptação que determinam a ocorrência de um dos parceiros freqüentemente promovem a presença do outro.

A composição de uma população indígena de rizóbio é difícil de ser estudada. Estudos tem demonstrado que a composição depende da espécie ou mesmo com a cultivar da planta usada como isca. Deste modo a composição de uma coleção de rizóbios nativos pode ser tendenciosa por ser dependente da planta. Análises preliminares da população de rizóbio nos solos dos Cerrados brasileiros mostraram que o uso de diferentes espécies-isca (feijoeiro ou *Leucaena*) resulta no isolamento de diferentes membros da população de rizóbio capaz de nodular o feijoeiro: 90% dos isolados obtidos a partir de *Leucaena* foram identificados como *R. tropici* e os isolados restantes se mostraram sem similaridade com as espécies conhecidas. A população de rizóbio do mesmo solo porém apresentou uma composição muito mais variada quando se usou o feijoeiro como planta-isca: 36 % dos isolados caracterizados como *R. tropici*, 14 % como *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* ou *etli* e 49% dos isolados não apresentaram similaridade com as espécies já descritas (Mercante *et*

al. 1996). Mesmo a partir de um único hospedeiro podem ser isoladas populações de rizóbio geneticamente distintas. Rizóbios capazes de nodular algaroba (*Prosopis glandulosa*), leguminosa reconhecidamente associada com uma grande variedade de espécies de rizóbio, foram isoladas de raízes superficiais (0-0,5 m) e profundas (4-6m). As adaptações decorrentes da exposição a condições ambientais distintas, resultou em duas populações geneticamente contrastantes (Thomas *et al.* 1994). Os autores concluíram que a formação das duas populações foi principalmente devida à hibridizações envolvendo o gene *ndvB* de *R.meliloti*, e em menor escala, com os genes *nkfHDK* de *K.pneumoniae* e *nodABC* de *R.meliloti*.

Nos sistemas agrícolas é comum diferentes espécies de leguminosas ocorrerem juntas, como acontece nas pastagens, ou em rotação de culturas. Nestes locais, diferentes populações de rizóbio interagem. Um dos processos importantes desta interação é a transferência de plasmídeos que tem sido observada entre populações de rizóbios e pode ser um fator importante na adaptação a condições edafo-climáticas específicas. Um plasmídeo contendo resistência a vários antibióticos foi transferido a partir de uma estirpe de *Bradyrhizobium* doadora para diversas espécies receptoras em condições de solo não-estéreis. Os resultados obtidos sugerem que a transferência pode ter ocorrido tanto no solo, como na rizosfera ou na superfície da raiz (Kinkle *et al.* 1993). No entanto, a perda das características simbióticas por estirpes de rizóbio tem sido relatada em quase todas as condições ambientais (Gibson *et al.* 1975, Jansen van Rensburg & Strijdom, 1985, Kuykendal & Elkan, 1976). É possível que estes resultados estejam refletindo uma instabilidade genética das características de efetividade das estirpes inoculadas após diversos anos no solo de uma maneira semelhante à observada com as estirpes quando em meio de cultura. Neste ambiente é comum o relato de diferenças fisiológicas entre colônias isoladas de uma mesma estirpe (Gibson *et al.* 1975, Jansen van Rensburg & Strijdon 1985). Algumas observações inclusive, indicam que a simples passagem do rizóbio através da planta é capaz de alterar a estrutura de algumas regiões do plasmídeo que carrega determinantes de especificidade (Wang *et al.* 1986). Por outro lado, a ação de bacteriófagos é um fator freqüentemente proposto como mecanismo de alteração de populações bacterianas. Os fagos têm habilidade seletiva em relação às bactérias e também agem como veículos de troca de material genético (Reanney 1974).

## **Sobrevivência**

A capacidade de sobrevivência de um microrganismo quando introduzido no solo foi definida como competência saprofítica (Chatel *et al.* 1968). A sobrevivência da bactéria no solo depende de fatores abióticos (acidez, temperatura, estresses de água, metais pesados, teores de argila e matéria orgânica, Bottomley 1992) e bióticos (antagonismo, predação e sinergismo) do solo. No caso do rizóbio, a sobrevivência no solo é uma característica importante pois determina pelo menos parcialmente a possibilidade da utilização desta bactéria como inoculante. Estrategicamente, a sobrevivência é o primeiro obstáculo a ser vencido no estabelecimento de uma estirpe superior (Freire *et al.* 1983).

Muitas vezes a estirpe de rizóbio introduzida coloniza facilmente o solo de um novo habitat, tornando-se difícil de ser substituída. Estudos feitos na África do Sul e na Austrália, em solos previamente livres de rizóbio capaz de nodular a soja, observou-se que após introdução do primeiro inoculante, alterações posteriores na composição do rizóbio não foram bem sucedidas, indicando que as estirpes utilizadas foram capazes de adaptar-se às condições edafo-climáticas específicas do local (Brockwell *et al.* 1987, Jansen van Rensburg & Strijdom 1985). Nos Estados Unidos uma situação semelhante foi também verificada: uma estirpe de rizóbio, USDA 123, capaz de nodular a soja foi introduzida nos solos junto com esta cultura onde apesar de ser pouco eficiente, passou a predominar (Ham 1980), impossibilitando a introdução de estirpes mais eficientes (Johnson *et al.* 1965, Weaver & Frederick 1974).

No caso do rizóbio, a sobrevivência deve ser compreendida frente a duas situações distintas. No primeiro caso, a presença da planta hospedeira facilita a multiplicação daquela estirpe que é capaz de promover nodulação eficiente. Há evidências

que mostram o envolvimento da planta hospedeira na persistência do rizóbio: certos genótipos de soja são capazes de restringir a nodulação por alguns membros do serogrupo USDA123 (Creagan & Keyser 1986). No entanto, rizóbios capazes de nodular a soja foram encontrados em áreas onde esta leguminosa nunca foi cultivada (Martins *et al.* 1996).

O perfil da população de rizóbio isolada de solo coletadas na região nordeste brasileira mostrou ser bastante diverso mesmo em áreas onde, por causa do regime hídrico deficiente, a presença das leguminosas hospedeiras não é muito comum (Martins *et al.*, 1996). Usando-se o feijão-de-corda como planta-isca, foi observado que os rizóbios isolados dos solos do Sertão (região semi-árida) mostraram uma proporção maior de estirpes de crescimento rápido quando comparado com os rizóbios isolados de solo da mesma latitude mas coletados próximos à costa (Zona da Mata). Estes dados confirmam a hipótese de Sprent (1994) de que rizóbios de crescimento rápido sobrevivem melhor às condições adversas do ambiente.

O fato de apresentar taxas de crescimento rápido não confere às espécies de rizóbio vantagem extra na garantia de uma alta taxa de nodulação mas de algum modo, garante índices melhores de sobrevivência. Estirpes de *S. fredii*, caracterizadas por crescimento rápido, obtidas de solos de cultivo de soja na China foram introduzidas na região centro-oeste da América do Norte, visando o deslocamento da população naturalizada de *B. elkanii*, que embora capaz de nodular soja não é tão eficiente quanto espécies de *B. japonicum*. A taxa de ocupação de nódulo pelas estirpes de *S. fredii* se manteve numa faixa baixa (3 a 14%) durante o primeiro ano, não havendo nenhum aumento significativo nos dois anos subseqüentes. Foi observado, entretanto, que apesar de não competir bem com as estirpes de rizóbio nativas, as estirpes de crescimento rápido introduzidas persistiram saprofiticamente no solo durante todo o período de estudo (Manjanatha *et al.* 1992).

A estirpe BR-33 de *Bradyrhizobium japonicum* quando usada como inoculante para soja em condições estéreis, promove o aparecimento de uma segunda população de nódulos, que se forma logo após o florescimento e parece ser a principal responsável pela maior produção de grãos promovida por esta estirpe porque garante a fixação de nitrogênio em maiores níveis durante o período de maior demanda para nitrogênio. No entanto, em ensaios de campo, a estirpe BR-33 não costuma mostrar um bom desempenho, sugerindo que a baixa capacidade de sobrevivência desta estirpe no solo inviabiliza a formação da segunda população de nódulos (Santos *et al.* 1996). A sobrevivência da estirpe no solo é fator determinante não apenas para a formação de uma segunda população de nódulos mas também para promover a nodulação inicial. Mesmo quando o inoculante é aplicado aderido à superfície da semente, a nodulação não ocorre imediatamente, sendo dependente do tempo de germinação, o que exige que o inóculo inicial se mantenha viável no solo. Em trevo subterrâneo, algumas estirpes eficientes promovem um aumento de produtividade somente após a rebrota das plantas, o que está diretamente correlacionado a capacidade da estirpe de sobreviver nas condições específicas e competir com outras estirpes. (Leung *et al.* 1994)

Embora uma série de condições tem sido relacionadas com a sobrevivência do rizóbio no solo, os fatores determinantes ainda estão longe de ser bem compreendidos. A produção de polissacarídeos nodulares foi apontada como responsável pela maior persistência do serogrupo USDA 123, levando a sua dominância numérica no solo (Streeter *et al.* 1994).

### **Interações com fatores abióticos do solo**

A maior parte dos rizóbios em vida livre estão mecanicamente ligados às partículas de solo (Ozawa & Yamaguchi, 1986), assim podem permanecer mesmo na ausência da planta hospedeira. Kamicker & Brill (1986) relataram a persistência no solo de uma estirpe de *B. japonicum* por 30 anos na ausência da soja. Geralmente as populações de rizóbio persistem no solo por 2 anos após o cultivo da leguminosa hospedeira, diminuindo gradativamente durante este período. A acidez do solo acompanhada do

aumento do teor de alumínio é um dos principais fatores de estresse que afetam a persistência do rizóbio no solo (Hiltbold *et al.* 1985), muito embora a espécie de *B. japonicum* sobreviva melhor em solos moderadamente ácidos do que nos solos alcalinos (Peoples *et al.* 1995).

**Tipo de solo, textura e composição** - Estudos com o rizóbio mostraram que as condições do solo são decisivas para a sobrevivência da estirpe quando introduzida em um novo ambiente. O número de células de *Bradyrhizobium* no solo e na rizosfera tem se mostrado em muitos casos mais dependente do tipo de solo do que da estirpe introduzida como inoculante. Ensaios de competitividade em meio estéril são determinados por fatores intrínsecos da estirpe, porém em ensaios de campo, os fatores edafo-climáticos parecem ser os maiores determinantes da garantia da sobrevivência e competitividade de uma estirpe.

A sobrevivência de bactérias no solo, em geral, está diretamente relacionada com a estrutura e textura do solo. Aumentos na densidade populacional de rizóbios são observados após o enriquecimento do solo com argilas (Beringer & Bale, 1988; Heijnen *et al.* 1993). As argilas exercem um papel de proteção para o rizóbio por aumentar não somente o número total de micro-habitats mas também por melhorar a qualidade destes, garantindo adequado teor de umidade e proteção contra predadores maiores.

Por outro lado, a estrutura físico-química do solo, principalmente o tipo e teor de argila, pode influenciar os diversos componentes da população de rizóbio do solo, afetando a competitividade entre as estirpes homólogas quanto a formação de nódulos (Moawad & Bohlool 1984, Somasegaram *et al.* 1988). Os mecanismos de atuação não são bem compreendidos mas parecem envolver formas de associações eletrostáticas entre o rizóbio e as argilas do solo (Marshall 1969), como também o aprisionamento do rizóbio nos colóides do solo (Demezas & Bottomley 1986).

**Acidez** - Vários trabalhos tem mostrado que tanto a temperatura quanto o pH do solo são fatores determinantes para o sucesso da estirpe de rizóbio em promover uma nodulação eficiente nas leguminosas associadas (Dughri & Bottomley, 1984, Graham, 1992, Ramos & Boddey, 1987, Streit *et al.* 1992, Vargas & Graham, 1989, Weber & Miller, 1972, Wolff *et al.* 1991).

A acidez é capaz de afetar drasticamente a taxa nodulação das estirpes usadas como inoculante: Wolff *et al.* (1991) demonstraram que a taxa de ocupação de estirpes de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* quando introduzida em solo ácido é mais baixa do que a observada em solos férteis e neutros. Estudos feitos no Quênia em dois solos com diferentes níveis de acidez mostraram que os solos abrigavam populações de rizóbio capazes de nodular feijão semelhantes quanto a número, efetividade de FBN e diversidade genética. A composição destas populações eram, entretanto, acentuadamente diferentes: estirpes semelhantes a *R. tropici* predominavam no solo de maior acidez, enquanto que estirpes semelhantes a *R. leguminosarum* e *R. etli* predominavam no solo menos ácido (Anyango *et al.* 1995). A melhor tolerância a acidez do *R. tropici* tem sido também observada em outras regiões (Amarger *et al.* 1994; Graham *et al.* 1994).

Alguns estudos compararam a capacidade saprofítica de *Rhizobium* spp. e *Bradyrhizobium* spp. nas mesmas condições de solo e foram discutidos Brockwell e colaboradores (1995): *Bradyrhizobium* é mais tolerante a acidez e melhor adaptado aos solos dos trópicos úmidos, onde persiste melhor, porém não tolera bem altas temperaturas; *Rhizobium* é mais sensível a acidez mas moderadamente adaptado a ambientes semi-áridos. Os mecanismos de tolerância do rizóbio a acidez ainda permanecem obscuros, havendo divergências entre os autores sobre o papel dos exopolissacarídeos como agentes de proteção contra os efeitos nocivos da acidez.

Em solos ácidos a maior disponibilidade de alumínio e manganês que podem alcançar níveis tóxicos, representam um fator limitante à sobrevivência e ao estabelecimento do rizóbio (Wani *et al.* 1995). Nestas condições, é possível que a inoculação com estirpes tolerantes possa proporcionar a boa nodulação das plantas. Inúmeros trabalhos de seleção de estirpes tolerantes a fatores estressantes do solo têm sido realizados mas os resultados são contraditórios. Estirpes tolerantes a acidez podem

(Graham *et al.* 1982) ou não (Gemell & Roughley 1993) sobreviver melhor em solos ácidos do que estirpes sensíveis. Na maioria das vezes a tolerância a acidez não se traduz em maior tolerância a alumínio e manganês (Vargas & Graham 1989).

**Temperatura e umidade** - Em relação aos rizóbios, a maioria das espécies tem temperatura ótima de crescimento entre 25 e 30° C. Temperaturas adversamente altas afetam o crescimento do rizóbio e conseqüentemente sua sobrevivência (Woomer *et al.* 1988). A seleção de estirpes tolerantes a temperatura alta tem sido uma constante preocupação (Boonkerd & Weaver 1982, Hungria *et al.* 1993, Wolff *et al.* 1991). Os mecanismos de tolerância a temperatura altas envolvem plasmídeos crípticos (Baldani & Weaver 1992) e a indução de proteínas de choque (Michiels *et al.* 1994). A cura ou a perda parcial de plasmídeos simbióticos com conseqüente perda da infectividade após exposição do rizóbio a altas temperaturas têm sido observado (Soberón-Chavez *et al.* 1986) e neste respeito, a espécie *R. tropici* parece ser mais tolerante e estável do que *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*. Isto talvez possa explicar a maior competitividade daquelas quando em condições de temperaturas adversamente altas (Oliveira & Graham 1990).

A solarização do solo através da cobertura com plástico durante o período do verão, elevando-se assim a temperatura, é uma técnica eficiente para reduzir a população nativa de rizóbio e facilitar a introdução de estirpes selecionadas para maior eficiência (Rupela & Sudarshana 1990). Seu uso em plantio de larga escala é entretanto inviável.

Flutuações na disponibilidade de água são freqüentemente observadas nos solos tropicais, com ciclos de seca e encharcamento que resultam em baixa sobrevivência dos microrganismos diazotróficos. Estas flutuações têm efeitos deletérios sobre o rizóbio (Boonkerd & Weaver 1982, Mary *et al.* 1994, Pena-Cabriaes & Alexander 1979). *Bradyrhizobium* resiste melhor ao dessecamento e subsequente reidratação (Mary *et al.* 1994), talvez devido ao maior conteúdo de água interna observado nas estirpes de *Rhizobium* em comparação com *Bradyrhizobium* (Bushby & Marshall 1977). A falta de umidade do solo pode afetar a mobilidade dos microrganismos diazotróficos em direção à rizosfera das plantas. A mobilidade entretanto é uma função do teor de umidade, textura, quantidade de material coloidal e do tipo de solo, além de ser influenciada pelo movimento de água (Hamdi 1971). Em solos contendo argila e silte ocorre absorção das células bacterianas a estas partículas restringindo o movimento ao contrário do que ocorre em solos arenosos.

**Metais pesados** - Muitos metais pesados são essenciais para o crescimento dos microrganismos diazotróficos. Elementos como níquel, cobre, zinco e cádmio são co-fatores de enzimas, requeridos em quantidades muito pequenas. Acima de certos níveis, estes elementos são tóxicos, afetando a sobrevivência do rizóbio no solo. As estirpes variam quanto a tolerância a metais pesados porém a exposição prolongada a metais pesados altera a população de rizóbio do solo. Foi demonstrado que a incorporação de lama de esgoto ao solo promove uma alteração radical na população de rizóbio, levando ao desaparecimento de estirpes eficientes e à diminuição da diversidade genética da população (Hirsch *et al.* 1993).

### **Interações com a microflora do solo**

O estabelecimento dos microrganismos diazotróficos quando introduzido no solo é influenciado também pelos fatores bióticos. Os microrganismos nativos num meio pobre em matéria orgânica podem ser concorrentes ou competidores na disputa pelos nutrientes disponíveis. Por outro lado, substâncias que resultam do metabolismo microbiano e são eliminadas no meio podem servir como fonte de nutriente a outros microrganismos. A chance de um microrganismo heterotrófico sobreviver no solo, considerado na maioria das vezes como um meio pobre, vai depender do fluxo alimentar estabelecido entre os organismos presentes no local específico. Inúmeros estudos têm comparado as alterações nos números de rizóbio após inoculação em solos não estéreis e estéreis, onde a influência de fatores bióticos é eliminada (Chao & Alexander 1981, Sardshpande *et al.* 1977, Vidor & Miller 1980). Os resultados claramente demonstram o papel da microbiota na sobrevivência do rizóbio.

**Antagonismo** - As populações microbianas do solo, bactérias, actinomicetos e fungos, podem exercer interações antagônicas com relação aos microrganismos diazotróficos no solo. Bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus* e fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, membros comuns da microflora do solo, são capazes de inibir a população de rizóbio no solo, o que pode ser observado através da redução da nodulação da planta hospedeira (Chowdhury 1977, Patel 1974). Os actinomicetos são numerosos nos solos tropicais (Araragi, 1979), perfazendo de 75 a 94% do total da microflora de alguns solos dos Cerrados (Coelho & Drozdowicz 1979). Além disso, o número de actinomicetos no solo aumenta rapidamente após a elevação do pH do solo, através da calagem (Baldani *et al.* 1982). Tem sido sugerido que os antibióticos produzidos por estes microrganismos quando presentes no solo ou na rizosfera, possam ser assimilados pela planta (Crowdy & Pramer 1955), promovendo alterações na população microbianas da rizosfera (Brown 1961; Hely *et al.* 1957) e resultando na seleção de microrganismos tolerantes, tal como já foi observado (Baldani *et al.* 1982, Ramos *et al.* 1987). Dificuldades no estabelecimento de rizóbio em alguns solos têm sido relacionadas com o antagonismo da microflora local (Chowdhury 1977) e estudos têm demonstrado que a inoculação do solo com várias espécies de fungos ou com actinomicetos afeta a sobrevivência do rizóbio, levando inclusive à diminuição da nodulação das leguminosas (Angle *et al.* 1981, Damirgi & Johnson 1966).

A importância da resistência à estreptomicina no estabelecimento de nodulação em *Stylosanthes* em solos da região dos Cerrados foi mostrada por Scotti e colaboradores (1982) que observaram uma proporção significativamente maior de isolados resistentes a este antibiótico em plantas crescidas em solos com calagem em comparação com plantas crescidas em solos virgens.

Alterações dos ecossistemas naturais através das práticas de aração e calagem, modificam o equilíbrio das populações de microrganismos do solo (Döbereiner 1982) e podem, por um longo período de tempo, afetar o estabelecimento do rizóbio. Na região amazônica, foram observados aumentos no nível de resistência a alguns antibióticos dos isolados de *Bradyrhizobium* spp obtidos de nódulos formados em feijão-de-corda crescido em solos ácidos que tiveram o pH corrigido através da calagem, por um período de 6 anos após o início da prática agrícola (Döbereiner *et al.* 1981). Alguns destes isolados se mostraram tolerantes a acidez do solo e a temperaturas adversamente altas (Martinazzo 1989) e capazes de prontamente formar nodulação abundante no feijão-de-corda em áreas recentemente abertas para a agricultura. Nesta mesma região, a inoculação com a estirpe australiana CB 188, selecionada para tolerância a estreptomicina e a canamicina não foi bem sucedida. Nestes estudos não foi possível estabelecer correlações entre o padrão de resistência aos dois antibióticos testados e a boa nodulação das estirpes, demonstrando que a habilidade que resulta na persistência da bactéria no solo é muito complexa, envolvendo diversos aspectos relacionados com a sobrevivência da estirpe no solo.

**Predação** - A ação predatória dos protozoários e de microrganismos parasitos como por exemplo os *Bdellovibrio* spp. é conhecida como um fator que pode influenciar a sobrevivência do rizóbio. A população de predadores e parasitos depende principalmente do teor de matéria orgânica do solo (Pena-Cabriaes & Alexander, 1983) e ocorre com maior intensidade em sistemas monoculturais. Um número muito grande de estudos tem mostrado declínios marcantes na população de rizóbio pela ação dos predadores. Estes estudos têm sido feitos em meio de cultura ou em solos esterilizados (Chao & Alexander 1981).

**Sinergismo** - A interação entre fungos micorrízicos arbusculares e as estirpes de rizóbio é um bom exemplo de interação sinérgica entre microrganismos do solo (Thiagarajan & Ahmad 1993). Foi observado no amendoim que a presença de fungos micorrízicos arbusculares (*Acaulospora laevis* ou *Glomus fasciculatus*) é capaz de alterar a taxa de nódulos formados por estirpes inoculadas em mistura, indicando uma ação sinérgica diferenciada para com uma das estirpes (Nambiar & Anjaiah 1989). Este mesmo tipo de efeito já foi relatado para *Azospirillum brasilense* (Plazinski & Rolfe 1985) e *Pseudomonas* (Fuhrman & Wollum II 1989). O melhor conhecimento destas interações pode vir a possibilitar a introdução de estirpes selecionadas em áreas onde ocorra população nativa.

## Interação com outras estirpes de rizóbio

De um modo geral as populações nativas ou naturalizadas de rizóbio são muito competitivas pelos sítios de infecção nas raízes da planta hospedeira, mas freqüentemente apresentam-se também pouco eficientes quanto à FBN, limitando a produtividade da leguminosa (Berg *et al.* 1988, Keyser *et al.* 1984). As dificuldades relacionadas com a formação de nódulos por estirpes de rizóbio selecionadas (geralmente para maior eficiência da FBN ou tolerância a fatores de estresse) quando introduzidas em solos que contêm populações indígenas ou naturalizadas apresentam grande importância econômica, impulsionando os estudos sobre os mecanismos de especificidade hospedeira e competitividade entre estirpes pelos sítios de infecção nas raízes das leguminosas.

Estudos que visavam compreender os mecanismos de competitividade entre estirpes de rizóbio presentes no solo, já eram realizados há mais de 50 anos atrás (Nicol & Thornton, 1941) e ainda assim, as características capazes de definir a habilidade competitiva de uma estirpe em relação a outra, não são bem compreendidas.

As dificuldades que são freqüentemente relatadas em estudos desta natureza, são pelo menos parcialmente decorrentes da metodologia disponível para avaliação da competitividade. Os resultados obtidos em condições controladas e estéreis raramente costumam ser reproduzidos em condições de campo. Estirpes isoladas tanto de populações dominantes quanto daquelas não-dominantes de nódulos, quando avaliadas em ensaios estéreis apresentam um bom desempenho quanto a competitividade, o que é uma situação extremamente difícil de ser compreendida a nível de campo (Bromfield *et al.* 1989, Meade *et al.* 1985). Além das dificuldades metodológicas inerentes à avaliação da competitividade, Brom e colaboradores (1991) sugeriram que pode haver perda de alguma característica genética, durante o processo de isolamento do rizóbio a partir do nódulos. A medida que o conhecimento da ecologia dos habitats naturais destes microrganismos for sendo ampliado, meios de cultura apropriados poderão ser desenvolvidos onde não somente a eficiência mas também a competitividade possam ser mantidas.

Variáveis ambientais, características intrínsecas do rizóbio e determinantes genéticos do hospedeiro podem contribuir para o sucesso da inoculação, permitindo que estirpes de rizóbio utilizadas como inoculantes ocupem uma proporção significativa dos nódulos formados (Bottomley 1992). Mesmo quando a estirpe a ser introduzida é bastante competitiva, a população de rizóbio nativo tem sido apontada como o principal fator capaz de afetar a taxa de nodulação pela estirpe inoculante (Thies *et al.* 1991, Thies *et al.* 1992).

Alguns estudos relacionam não a diversidade de rizóbios nativos no solo, mas o tamanho da população rizobiana com determinante da eficiência da inoculação. Existem resultados mostrando que o número de estirpes nativas de rizóbio representam uma barreira para o estabelecimento de estirpes selecionadas, possivelmente levando ao insucesso da inoculação (Weaver & Frederick, 1974). Segundo os estudos de Thies e colaboradores (1991) quando menos de 10 rizóbios nativos estão presentes por grama de solo, o sucesso da inoculação pode ser observado 85% das áreas analisadas.

Um dos aspectos menos estudados da ecologia do rizóbio é a caracterização das estirpes nativas que freqüentemente competem com as estirpes introduzidas para a formação de nódulos. A população nativa é adaptada às condições edafo-climáticas mas a presença de plantas leguminosas também tem uma influência significativa na sua composição. Mil duzentos e setenta e cinco isolados de *Bradyrhizobium* de nódulos de *Macroptilium atropurpureum* e *Desmodium intortum* foram usados para testar a hipótese de que a heterogeneidade de tipos serológicos de rizóbios encontrados no solo antes do cultivo de uma planta hospedeira tende a diminuir, sob influência do solo, raiz e rizosfera, após cultivos sucessivos com a leguminosa hospedeira (Date & Hurse, 1991). Estes autores encontraram que para cada uma das leguminosas estudadas um ou dois isolados foram dominantes. A confirmação desta hipótese indica que isolados do solo de origem da leguminosa têm as características de persistência e competitividade que são importantes para os programas de seleção de estirpe (Brockwell *et al.* 1968, Date, 1976, Thompson 1980).

A soja, plantada numa larga extensão dos Cerrados brasileiros, pode ser apontada como um exemplo típico do alto grau de competitividade de estirpes naturalizadas. No início dos anos 70, foi utilizado um inoculante composto das estirpes BR-29 e BR-96 de *B. elkanii*, o que garantiu durante vários anos a produção da soja sem a necessidade de adubação nitrogenada. Estudos realizados na década de 80, mostraram que a estirpe BR-33 de *B. japonicum* era capaz de aumentar o nível de produção de grãos em soja em até 30% (Neves *et al.* 1985). No entanto, quando se tentou introduzir a estirpe BR-33 nos solos de Cerrado, verificou-se que ela era incapaz de competir com as estirpes BR-29 e BR-96 que se encontravam bem adaptadas às condições edafo-climáticas prevalentes na região (Neves *et al.* 1992).

A produção de bacteriocinas tem sido apontada como determinante da maior competitividade de uma estirpe em relação a outra. Estas substâncias caracterizadas como antibióticas apresentam efeitos bacteriostáticos sobre rizóbios da mesma espécie, de outras espécies e mesmo bactérias de outros gêneros (Hodgson *et al.* 1985, Triplett & Sadowsky 1992). Estudos com o uso de estirpes isogênicas têm mostrado a vantagem competitiva das estirpes produtoras de bacteriocinas sobre estirpes sensíveis (Triplett & Barta, 1987).

Por outro lado é possível tirar partido da variabilidade existente na população de rizóbios, como por exemplo, resistência a fungicidas, a antagonismo, etc., para adicionar vantagens competitivas às estirpes selecionadas usadas como inoculante de leguminosas em solos contendo população estabelecida de rizóbios homólogos.

### **Adaptação a condições específicas - alguns estudos de caso**

As características das bactérias que determinam sua persistência e que estão envolvidas na adaptabilidade aos solos não são bem conhecidas. Além disto, a complexibilidade dos fatores envolvidos (desidratação, altas temperaturas do solo, acidez, baixo conteúdo de matéria orgânica e toxicidade de manganês e alumínio), além de fatores bióticos do solo, torna difícil a seleção de estirpes adaptadas a condições específicas do solo nesta região.

Uma diminuição na tolerância a acidez e um aumento na resistência a antibióticos na população nativa de rizóbio das parcelas que receberam calagem foi observada quando o feijoeiro foi plantado 5 vezes no mesmo local (Ramos & Boddey 1987, Ramos *et al.* 1987). A tolerância a acidez e resistência a antibióticos da estirpe inoculada e suas derivativas aclimatizadas que foram re-isoladas dos nódulos formados a cada plantio, entretanto não foram alteradas pela calagem. Foi observado também que a calagem aumentou a nodulação e a produção de grãos do feijoeiro mas diminuiu a taxa de ocupação da estirpe inoculada, muito embora as estirpes aclimatizadas tivessem uma tendência a ser mais competitivas do que a estirpe original.

A expansão da fronteira agrícola brasileira em direção aos Cerrados, na década de 60, introduziu a soja neste novo ecossistema. Baixa nodulação e até mesmo falha de nodulação foram observadas nas plantas inoculadas com as estirpes comercialmente recomendadas para a soja na região sul e sudeste (Neves 1989). O problema era mais grave nos primeiros anos após o preparo do solo para a agricultura e foi atribuído a especificidade hospedeira das cultivares adaptadas aos Cerrados (Franco 1981). O problema podia ser aliviado com o uso de altas doses de inoculante (Vargas & Suhett 1980) o que pode ser indicativo de problemas relacionados com a sobrevivência das estirpes nos solos.

Estirpes de diversas procedências foram testadas e duas estirpes foram selecionadas: BR-96, isolada na região sul pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul e BR-29, isolada no Rio de Janeiro pelo Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia da EMBRAPA. É possível que a estirpe BR-29 seja um rizóbio nativo pois foi isolado de um único nódulo formado em soja plantada em uma amostra de solo ácido com problema de toxicidade de manganês, originária de Pirai, onde a soja jamais tinha sido introduzida (M. Nery comunicação pessoal). Estas estirpes têm, em comum, a característica de alta competitividade (Freire *et al.* 1983, Scotti *et al.* 1993), resistência a alguns antibióticos (Scotti *et al.* 1982). Hoje se sabe que estas duas estirpes pertencem à espécie *B. elkanii*

(Rumjanek *et al.* 1993). Usadas comercialmente como inoculante para soja, ambas se tornaram naturalizadas nas áreas de produção desta cultura em todo o Brasil.

Aumentos na dominância da estirpe BR-40 usada como inoculante anteriormente, têm sido observados nas regiões produtoras dos Cerrados: em 1970 este serogrupo ocupava apenas 2% dos nódulos e recentemente taxas de ocupação entre 13 e 50% têm sido relatadas (Vargas *et al.* 1993). Isolados naturalmente aclimatizados às condições prevalecentes nos solos dos Cerrados foram recentemente selecionados: BR-85, pertencente ao serogrupo BR-33 e BR-86 (Vargas *et al.* 1993), 4A-5, e 4B-53 (Scotti *et al.* 1993), pertencentes ao serogrupo BR-40.

Através da repetida inoculação e recuperação do rizóbio dos nódulos foram obtidos re-isolados aclimatizados às condições dos solos dos Cerrados, da estirpe BR-33, caracterizada como *B. japonicum* (Rumjanek *et al.* 1993) e considerada muito eficiente (Döbereiner *et al.* 1970, Neves *et al.* 1985, Norris, 1967). Os re-isolados aclimatizados mantiveram as características de eficiência da estirpe original e não apresentaram alteração no padrão de tolerância a alumínio e acidez (Neves *et al.* 1992). A aclimatização da estirpe BR-33 entretanto, diminuiu a produção de polissacarídeos. Somente um dos re-isolados teve alterado o padrão de resistência a antibióticos, mantendo a taxa característica de crescimento mesmo quando inoculado em meio contendo concentrações sub-inibitórias de estreptomicina (Coutinho *et al.* 1995).

A caracterização genética das estirpes aclimatizadas aos solos dos Cerrados demonstraram que o isolado BR-85 difere geneticamente da estirpe original (BR-33) por uma única banda de restrição. Os demais re-isolados desta estirpe só puderam ser discriminados da estirpe original por meio do padrão de pirólise (Coutinho *et al.* 1995). Alguns re-isolados derivados da estirpe BR-40 diferem da estirpe original pela maior intensidade de uma banda polipeptídica no padrão de proteínas e se tornaram mais competitivos (Scotti *et al.* 1993, Vargas *et al.* 1993). Estes re-isolados não puderam ser discriminados pelo padrão de DNA mas sim, pelo padrão de pirólise (Coutinho *et al.* 1995).

Alterações na produção e/ou composição dos polissacarídeos foram as principais diferenças decorrentes da aclimatização das estirpes BR-33 e BR-40 nos solos de Cerrado (Coutinho *et al.* 1995), afetando a permeabilidade das células a antibióticos e outras substâncias e consequentemente modificando a tolerância aos fatores adversos do solo. A existência de re-isolados que são mais competitivos do que as estirpes originais mas sensíveis a estreptomicina sugerem que a resistência a este antibiótico não é um pré-requisito para a nodulação da soja nos Cerrados. Entretanto, quando comparados com a estirpe original, os isolados apresentaram um maior nível de tolerância ao antagonismo dos actinomicetos dos solos de Cerrado, semelhante aos observados para as estirpes bem sucedidas nestes solos, BR-29 e BR-96 (Neves *et al.* 1992).

## Conclusões

O conhecimento dos aspectos ecológicos ligados aos microrganismos diazotróficos é ainda muito fragmentado. Os rizóbios tem sido os mais estudados, mesmo assim os resultados se restringem a um número limitado de espécies associadas a plantas de interesse agrônômico, geralmente obtidos em regiões subtropicais.

O estabelecimento do rizóbio no solo depende de fatores tão diversos como natureza química e física do solo, temperatura e disponibilidade de água, microflora, composição da flora de leguminosas e não-leguminosas, que dificilmente têm sido considerados quando nas tentativas de introdução de estirpes selecionadas. Do melhor conhecimento destes fatores podem resultar tecnologias que permitam sucesso na introdução de estirpes selecionadas. A necessidade de aumentar a contribuição da FBN nos sistemas agrícolas e de superar limitações à FBN têm motivado a prospecção da biodiversidade que existe nas regiões tropicais. Dados coletados em solos das regiões tropicais do Brasil tem mostrado que é possível a adaptação de bactérias a um novo ambiente o que de certa forma explica a grande diversidade nas populações de rizóbio que ocorrem nestas regiões. O uso de técnicas moleculares tem contribuído para revelar a grande diversidade de rizóbios que existe nestas regiões e seus relacionamentos com as

leguminosas. Por outro lado, a possibilidade de aumentar a FBN através de alterações genéticas nos microrganismos diazotróficos envolvidos tem motivado o estudo destas populações e suas interações com a microflora local.

O melhor conhecimento da ecologia do rizóbio nos solos das regiões tropicais tem servido para derrubar alguns conceitos estabelecidos, como por exemplo, a ubiquidade dos rizóbios tropicais do grupo caupi de inoculação cruzada. Este conceito que por muitos anos induziu à conclusão sobre a não necessidade de inoculação de leguminosas promíscuas (muitas são forrageiras ou plantas usadas para adubação verde) em solos tropicais pode estar levando a insuficiente nodulação e a limitada contribuição da FBN nestas leguminosas.

## Agradecimentos

As autoras agradecem aos colegas A.A.Franco, J. Döbereiner e J.I. Baldani pelas sugestões apresentadas ao texto e aos funcionários da biblioteca pelo apoio bibliográfico prestado.

## Bibliografia

- AGUILAR, J.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, Reading, v.134, p.2741-2746, 1988.
- 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.
- ANGLE, J.S.; PUGASHETTI, B.K. & WAGNER, G.H. Fungal effects on *Rhizobium japonicum* soybean symbiosis. Agronomy Journal, Madison, v.73, p.301-306, 1981.
- 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.
- ARARAGI, M. Comparison of actinomycete flora between tropical and temperate upland farm soils. I. Physiological characteristics. Soil Science and Plant Nutrition, Tokyo, v.25, p.245-254, 1979.
- BALDANI, J.I. & WEAVER, R.W. Survival of clover rhizobia and their plasmid-cured derivatives in soil under heat and drought stress. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v.24, p.737-742, 1992.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; XAVIER, D.F. & BODDEY, R.M. Efeito da calagem no número de actinomicetos e na porcentagem de bactérias resistentes a estreptomicina na rizosfera de milho, trigo e feijão. Revista de Microbiologia, São Paulo, v.13, p.250-263, 1982.
- BARNET, Y. & CATT, P.C. Distribution and characteristics of root nodule bacteria isolated from Australian *Acacia* spp. Plant and Soil, Dordrecht, v.135, p.109-120, 1991.
- BERG, R.K.; LOYNACHAM, T.E.; ZABLOTOWICZ, R.M. & LIEBERMAN, M.T. Nodule occupancy by introduced *Bradyrhizobium japonicum* in Iowa soils. Agronomy Journal, Madison, v.80, p.876-881, 1988.
- BERINGER, J.E. & BALE, M.J. The survival and persistence of genetically-engineered micro-organisms. p.29-46. In: M. Sussman, C.H. Collins, F.A. Skinner & D.E. Stewart-Tull (eds), The release of genetically engineered micro-organisms. London, Academic Press Ltd, 1988.
- BOONKERD, N. & WEAVER, R.W. Survival of cowpea rhizobia in soil as affected by soil temperature and moisture. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.43, p.585-589, 1982.
- BOTTOMLEY, P.J. Ecology of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium*. p.293-348. In: G. Stacey; R.H. Burris & H.J. Evans (eds.), Biological Nitrogen Fixation. New York, Chapman and Hall, 1992.

- BROCKWELL, J.; BOTTOMLEY, P.J. & THIES J.E. Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment. Plant and Soil, Dordrecht, v.174, p.143-180, 1995.
- BROCKWELL, J.; DUDMAN, W.F.; GIBSON, A.H.; HELY, F.W. & ROBINSON, A.C. An integrated programme for the improvement of legume inoculant strains. p. 103-114. In: J.W. Holmes (ed.), Transactions of the 9<sup>th</sup> International Congress Soil Sciences, vol.2, International Society of Soil Science, Sydney, Angus & Robertson, 1968.
- BROCKWELL, J.; ROUGHLEY, R.J. & HERRIDGE, D.F. Population dynamics of *Rhizobium japonicum* strains used to inoculate three successive crops of soybean. Australian Journal of Agricultural Research, Victoria, v.38, p.61-74, 1987.
- BROM, S.A.; SANTOS, A.G. de LOS; GIRARD, M.L.; DAVILA, G.; PALÁCIOS, R. & ROMERO, D. High-frequency rearrangements in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* plasmids. Journal of Bacteriology, Washington, v.173, p.1344-1346, 1991.
- BROMFIELD, E.S.P.; SINHA, I.B. & WOLYNETS, M.S. Is frequency of occurrence of indigenous *Rhizobium meliloti* in nodules of field grown plants related to intrinsic competitiveness? Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v.21, p.607-609, 1989.
- BROWN, M.E. Stimulation of streptomycin-resistant bacteria in the rhizosphere of leguminous plants. Journal of General Microbiology, Reading, v.24, p.369-377, 1961.
- BUSHBY, H.V.A. & MARSHALL, K.C. Water status of rhizobia in relation to their susceptibility to desiccation and to their protection by montmorillonite. Journal of General Microbiology, Reading, v.99, p.19-27, 1977.
- CARLSON, R.W.; SANJUAN, J.; RAMADAS-BHAT, U.; GLUSHKA, J.; SPAINK, H.P.; WIJFJES, A.H.M.; VAN BRUSSEL, A.A.N.; STOKKER-MANS, T.J.W.; PETERS, K. & STACEY, G. The structure and biological activities of the lipo-oligosaccharide nodulation signals produced by type I and type II strains of *Bradyrhizobium japonicum*. Journal of Biological Chemistry, Rockville, v.268, p.18372-18381, 1993.
- CHAO, W.-L. & ALEXANDER, M. Interaction between protozoa and *Rhizobium* in chemically amended soil. Soil Science Society of America Journal, Madison, v.45, p.48-50, 1981.
- CHATEL, D.L.; GREENWOOD, R.M. & PARKER, C.A. Saprophytic competence as an important character in the selection of *Rhizobium* for inoculation. p.65-73. In: J.W. Holmes (ed.), Transaction of the 9<sup>th</sup> International Congress of Soil Science v.2. International Society of Soil Science, Sydney, Angus & Robertson, 1968.
- CHEN, W.X.; LI, G.H. & QI, Y.L. *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. International Journal of Systematic Bacteriology, Washington, v.41, p.275-280, 1991.
- CHEN, W.X.; WANG, E.T.; LI, Y.B.; LI, Y. & GAO, J.L. *Rhizobium hainanensis*, a new species of root nodule bacteria isolated from tropical region. In: International Symposium on Diversity and Taxonomy of Rhizobia, p. 16, Wuhan, China. 1994.
- CHEN, W.X.; YAN, G.H. & LI, J.L. Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov.. International Journal of Systematic Bacteriology, Washington, v.38, p.392-397, 1988.
- CHEN, W.X.; WANG, E.T.; WANG, S.Y.; LI, Y.B.; CHEN, X.Q. & LI, Y. Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China. International Journal of Systematic Bacteriology, Washington, v.45, p.153-159, 1995.
- CHOWDHURY, M.S. Effects of soil antagonists on symbiosis. p. 385-411. In: J.M. Vincent; A.S. Whitney & J. Bose (eds.), Exploiting the Legume-*Rhizobium* Symbiosis in Tropical Agriculture. College of Tropical Agriculture Miscellaneous Publication 145, Department of Agronomy and Soil Science, University of Hawaii, 1977.
- COELHO, R.R.R. & DROZDOWICZ, A. The occurrence of actinomycetes in a Cerrado soil in Brazil. Revue d'Ecologie et Biologie du Sol, Paris, v.15, p.459-473, 1979.
- COUTINHO, H.L.C.; KAY, H.E.; MANFIO, G.P.; NEVES, M.C.P. & BERINGER, J.E. Molecular adaptation of soybean *Bradyrhizobia* to the Brazilian Cerrado Soils. p.45-46. In: International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics: the Role of Biological

- Nitrogen Fixation, Programme and Abstracts, Seropédica, EMBRAPA-CNPAB, 1995, 249p.
- CREAGAN, P.B. & KEYSER, H.H. Host Restriction on nodulation by *Bradyrhizobium japonicum* strain USDA 123 in soybean. Crop Science, Madison, v.26, p.911-916, 1986.
- CROWDY, S.H. & PRAMER, D. The occurrence of translocated antibiotics in expressed plant sap. Annals of Botany, London, v.19, p.80-86, 1955.
- DAMIRGI, S.M. & JOHNSON, H.W. Effect of soil actinomycetes on strains of *Rhizobium japonicum*. Agronomy Journal, Madison, v.58, p.223-224, 1966.
- DATE, R.A. & HURSE, L.S. Intrinsic antibiotic resistance and serological characterization of populations of indigenous *Bradyrhizobium* isolated from nodules of *Desmodium intortum* and *Macroptilium atropurpureum* in three soil of S.E. Queensland. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v.23, p.551-561, 1991.
- DATE, R.A. Principles of *Rhizobium* strain selection. p.137-150. In: P.S. Nutman (ed.), Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants. Cambridge, Cambridge University Press, 1976, 584p.
- DEMEZAS, D.H. & BOTTOMLEY, P.J. Autoecology in rhizospheres and nodulating behavior of indigenous *Rhizobium trifolii*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.52, p.1014-1019, 1986.
- DÖBEREINER, J. New evidence for the production and accumulation of antibiotics in nature. Scripta Varia, Vatican Academy of Science, v.53, 1982.
- DÖBEREINER, J.; FRANCO, A.A. & GUZMAN, I. Estirpes de *Rhizobium japonicum* de excepcional eficiência. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Rio de Janeiro, v.5, p.155-161, 1970.
- DÖBEREINER, J.; SCOTTI, M.R.M.M.L.; SÁ, N.M.H. & VARGAS, M.A.T. Resistance to streptomycin of *Rhizobium* isolates from Cerrado and Amazon soils. p.434. In: A.H. Gibson & W.E. Newton (eds), Current Perspectives in Nitrogen Fixation. Canberra, Australian Academy of Sciences, 1981, 534p.
- DOWDLE, S.F. & BOHLOOL, B.B. Predominance of fast-growing *Rhizobium japonicum* in a soybean field in the People's Republic of China. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.50, p.1171-1176, 1985.
- DREYFUS, B.; GARCIA, J.L. & GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sebania rostrata*. International Journal of Systematic Bacteriology, Washington, v.38, p.89-98, 1988.
- DUGHRI, M.H. & BOTTOMLEY, P.J. Soil acidity and the composition of an indigenous population of *Rhizobium trifolii* in nodules of different cultivars of *Trifolium subterraneum* L. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v.16, p.405-411, 1984.
- FRANCO, A.A. Rizobiologia - Estudos no Estado do Rio de Janeiro. p. 436-442. In: S. Miyasaka & J.C. Medina (eds.), Soja no Brasil. Campinas, Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1981.
- FREIRE, J.R.J.; KOLLING, J.; VIDOR, C.; PEREIRA J.S.; KOLLING, I.G.; & MENDES, N.G. Sobrevivência e competição por sítios de nodulação de estirpes de *Rhizobium japonicum* na cultura da soja. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, v.7, p.47-53, 1983.
- FUHRMAN, 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.
- GEMELL, L.G. & ROUGHLEY, R.J. Field evaluation in acid soils of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* selected for their tolerance or sensitivity to acid soil factors in agar medium. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v. 25, p.1447-1452, 1993.
- GIBSON, A.H.; CURNOW, B.C.; BERGENSEN, F.J.; BROCKWELL, J. & ROBINSON, A.C. Studies of field populations of *Rhizobium*: effectiveness of strains of *Rhizobium trifolii* associated with *Trifolium subterraneum* L. pastures in south-eastern Australia. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v.7, p.95-102, 1975.
- GRAHAM, P.H. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, v.38, p.475-484, 1992.

- GRAHAM, P.H.; DRAEGER, K.J.; FERREY, M.L.; CONROY, M.J.; HAMMER, B.E.; MARTINEZ, 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.; VITERI, S.E.; MACKIE, F.; VARGAS, A.T. & PALÁCIOS, A. Variation in acid soil tolerance among strains of *R. phaseoli*. Field Crops Research, Amsterdam, v.5, p.121-128, 1982.
- HAM, G.E. Inoculation of legumes with *Rhizobium* in competition with naturalized strain. p.131-138. In: W.E. Newton & W.H. Orme-Johnson (eds), Nitrogen Fixation, vol.2, Baltimore, University Park Press, 1980, 325p.
- HAMDI, Y.A. Soil-water tension and movement of rhizobia. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v.3, p.121-126, 1971.
- HEIJNEN, C.E.; BURGERS, S.L.G.E. & VAN VEEN, J.A. Metabolic activity and population dynamics of rhizobia introduced into unamended and bentonite-amended loamy sand. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.59, p.743-747, 1993.
- HELY, F.W.; BERGERSEN, F.J. & BROCKWELL, J. Microbial antagonism in the rhizosphere as a factor in the failure of inoculation of subterranean clover. Australian Journal of Agricultural Research, Victoria, v.8, p.24-44, 1957.
- HILTBOLD, A.E.; PATTERSON, R.M. & REED R.B. Soil populations of *Rhizobium japonicum* in a cotton-corn-soybean rotation. Soil Science Society of America Journal, Madison, v.49, p.343-348, 1985.
- HIRSCH, P.R.; JONES, M.J.; McGRATH, S.P. & GILLER, K.E. Heavy metals from past applications of sewage sludge decrease the genetic diversity of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* populations. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v.25, p.1485-1490, 1993.
- HODGSON, A.L.M.; ROBERTS, W.P. & WAID, J.S. Regulated nodulation of *Trifolium subterraneum* inoculated with bacteriocin-producing strains of *Rhizobium trifolii*. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v.17, p.475-478, 1985.
- HUBBELL, D.H.; MORALES, V.M. & UMALI-GARCIA, M. Pectolytic enzymes in *Rhizobium*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.35, p.210-213, 1978.
- HUNGRIA, M. Sinais moleculares envolvidos na nodulação das leguminosas por rizóbio. Revista Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, v.18, p.339-364, 1994.
- 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.
- JANSEN VAN RENSBURG, H. & STRIJDOM, B.W. Effectiveness of *Rhizobium* strains used in inoculants after their introduction into soil. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.49, p.127-131, 1985.
- JOHNSON, H.W.; MEANS, U.M. & WEBER, C.R. Competition for nodule sites between strains of *Rhizobium japonicum* applied as inoculum and strains in the soil. Agronomy Journal, Madison, v.57, p.179-185, 1965.
- JORDAN D.C. Family III. *Rhizobiaceae* Conn 1938, p. 234-254. In: N.R. Krieg & J.G. Holt (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol 1. Baltimore, Williams, 1984, 964p.
- JORDAN, D.C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. International Journal of Systematic Bacteriology, Washington, v.32, p.136-139, 1982.
- KAMICKER, B.J. & BRILL, W.J. Identification of *Bradyrhizobium japonicum* nodule isolates from Wisconsin soybean farms. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.51, p.487-492, 1986.
- KAPE, R.; PARNISKE, M. & WERNER, D. Chemotaxis and *nod* gene activity of *Bradyrhizobium japonicum* in response to hydroxycinnamic acids and isoflavonoids. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.58, p.1705-1710, 1991.
- KEYSER, H.H.; WEBER, D.F. & URATSU, S.L. *Rhizobium japonicum* serogroup and hydrogenase phenotype distribution in 12 states. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.47, p.613-615, 1984.

- KINKLE, B.K.; SADOWSKY, M.J.; SCHMIDT, E.L. & KOSKINEN, W.C. Plasmids pJP4 and r68.45 can be transferred between populations of bradyrhizobia in nonsterile soil. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.59, p.1762-1766, 1993.
- KUYKENDALL, L. D.; SAXENA, B.; DEVINE, T. E. & UDELL, S. E. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov.. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, v.38, p.501-505, 1992.
- KUYKENDALL, L.D. & ELKAN, G.H. *Rhizobium japonicum* derivatives differing in nitrogen fixing efficiency and carbohydrate utilization. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.32, p.511-519, 1976.
- LAJUDIE, P. DE; WILLEMS, A.; POT, B.; DEWETTINCK, D.; MAESTROJUAN, G.; NEYRA, M.; COLLINS, M.D.; DREYFUS, B.; KERSTERS, K. & GILLIS, M. Polyphasic taxonomy of rhizobia: Emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov.. International Journal of Systematic Bacteriology, Washington, v.44, p.715-733, 1994.
- LEUNG, K.; WANJAGE, F.N. & BOTTOMLEY, P.J. Symbiotic characteristics of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* isolates with represent major and minor nodule-occupying chromosomal types of field-grown subclover (*Trifolium subterraneum* L.). Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.60, p.427-433, 1994.
- LINDSTRÖM, K. *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. International Journal of Systematic Bacteriology, Washington, v.39, p.365-367, 1989.
- LONG, S.R. *Rhizobium*-legume nodulation: life together in the underground. Cell, Cambridge, v.56, p.203-214, 1989.
- MANJANATHA, M.G.; LOYNACHAN, T.E. & ATHERLY, A.G. Efficiency, competitiveness, and persistence of chinese *Rhizobium fredii* in Iowa soils. Agronomy Journal, Madison, v.84, p.676-681, 1992.
- MARSHALL, K.C. Studies by microelectrophoretic and microscopic techniques of the sorption of illite and montmorillonite to rhizobia. Journal of General Microbiology, Reading, v.56, p.301-306, 1969.
- MARTINAZZO, A.F. Potencial de fixação de nitrogênio em *Vigna unguiculata* Walp. em diferentes condições ambientais. Itaguaí: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1989. 154 p. Dissertação, Mestrado.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGÓVIA, 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.
- MARTINS, L M.; NEVES, M.C.P. & RUMJANEK, N.G. Characteristics of cowpea rhizobia isolated from the northeast region of Brazil, p. 160- 161. In: International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics - The Role of Biological Nitrogen Fixation, Programme and Abstracts. Seropédica, EMBRAPA-CNPAB, 1995. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, 1996. (no prelo).
- MARY, P.; DUPUY N.; DOLHEM-BIREMON, C.; DEFIVES, C. & TAILLIEZ, R. Differences among *Rhizobium meliloti* and *Bradyrhizobium japonicum* strains in tolerance to dissection and storage at different relative humidities. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v.26, p. 1125-1132, 1994.
- MEADE, J.; HIGGINS, P. & O'GARA, F. Studies on the inoculation and competitiveness of a *Rhizobium leguminosarum* strain in soils containing indigenous rhizobia. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.47, p.607-612, 1985.
- MERCANTE, F. M.; CUNHA, C. de O.; RIBEIRO JR., W. Q.; VANDERLEYDEN, J. & FRANCO, A.A. Use of *Leucaena leucocephala* as a trap-host for *Rhizobium tropici* strains indigenous from Brazilian "Cerrado" region, p. 162-163. In: International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics - The Role of Biological Nitrogen Fixation, Programme and Abstracts. Seropédica, EMBRAPA-CNPAB, 1995. Applied and Environmental Microbiology, Washington, 1996, (No prelo).

- MICHELIS, 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.
- MOAWAD, H. & BOHLOOL, B.B. Competition among *Rhizobium* spp. for nodulation of *Leucaena leucocephala* in two tropical soils. Applied and Environmental Microbiology, Oxford, v.48, p.5-9, 1984.
- MOREIRA, F.M.S.; GILLIS M.; POT, B.; KERSTERS, K. & FRANCO, A.A. Characterization of rhizobia isolated from different divergence groups of tropical Leguminosae by comparative polyacrylamide gel electrophoresis of their total protein. Systematic and Applied Microbiology, Stuttgart, v.16, p.135-146, 1993.
- NAMBIAR, P.T.C. & ANJIAH, V. Competition among strains of *Bradyrhizobium* and vesicular-arbuscular mycorrhizae for groundnut (*Arachis hypogaea* L.) root infection and their effect on plant growth yield. Biology and Fertility of Soils, Berlin, v.8, p.311-318, 1989.
- NEVES, M.C.P. & RUMJANEK, N.G. Diversity and adaptability of soybean and cowpea rhizobia in tropical soils, p. 39-40. In: International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics - The Role of Biological Nitrogen Fixation, Programme and Abstracts. Seropédica, EMBRAPA-CNPAB, 1995. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, 1996. (no prelo)
- NEVES, M.C.P. A new physiological approach for *Bradyrhizobium* strain selection, p 2177-2192. In: Proceedings of the World Soybean Research Conference IV, Buenos Aires, vol. V, 1989.
- NEVES, M.C.P. Energy Cost of Biological Fixation. p. 77-92. In: P.H. Graham & S. C. Harris (eds.), Biological Nitrogen Fixation for Tropical Agriculture. Cali, Colômbia, Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1982, 768p.
- NEVES, M.C.P.; DIDONET, A.D.; DUQUE, F.F. & DÖBEREINER, J. *Rhizobium* strain effects on nitrogen transport and distribution in soybeans. Journal of Experimental Botany, Oxford, v.22, p.1179-1192, 1985.
- NEVES, M.C.P.; RAMOS, M.L.G.; MARTINAZZO, A.F.; BOTELHO, G.R. & DÖBEREINER, J. Adaptation of more efficient soybean and cowpea rhizobia to replace established populations. p 219-233. In: K. Mulongoy; M. Gueye & D.S.C. Spencer (eds.), Biological Nitrogen Fixation and Sustainability of Tropical Agriculture. Exeter, Wiley-Sayce, 1992.
- NICOL, H. & THORNTON, H.G. Competition between related strains of nodule bacteria and its influence on infection of the legume host. Proceedings of the Royal Society of London, Biological Science, London, v.130, p.32-59, 1941.
- NORRIS, D.O. The intelligent use of inoculants and lime pelleting for tropical legumes. Tropical Grasslands, Santa Lucia, v.1, p.107-121, 1967.
- NOUR, S.M.; CLEYET-MAREL, J.-C; NORMAND, P. & FERNANDEZ, M. Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov.. International Journal of Systematic Bacteriology, Washington, v.45, p.640-648, 1995.
- NOUR, S.M.; FERNANDEZ, M.P.; NORMAND, P. & CLEYET-MAREL, J.C. *Rhizobium ciceri* sp. nov., consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). International Journal of Systematic Bacteriology, Washington, v.44, p.511-522, 1994.
- OLIVEIRA, L.A. & GRAHAM, P.H. Evaluation of strain competitiveness in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* using a nod+ fix- natural mutant. Archives of Microbiology, Berlin, v.54, p.305-310, 1990.
- OZAWA, T. & YAMAGUCHI, M. Fractionation and estimation of particle-attached and unattached *Bradyrhizobium* strains in soils Applied and Environmental Microbiology, Wahington, v.52, p.911-914, 1986.
- PADMANABHAM, S.; HIRTZ, R.D. & BROUGHTON, W.J. Rhizobia in tropical legumes: cultural characteristics of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* sp.. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v.22, p.23-28, 1990.

- PANKHURST, C. E. Symbiotic effectiveness of antibiotic-resistant mutants of fast and slow-growing strains of *Rhizobium* nodulating *Lotus* species. Canadian Journal of Microbiology, Ottawa, v.23, p.1026-1033, 1977.
- PATEL, J.J. Antagonism of actinomycetes against rhizobia. Plant and Soil, Hague, v.41, p.395-402, 1974.
- PENA-CABRIALES, J.J. & ALEXANDER, M. Growth of *Rhizobium* in soil amended with organic matter. Soil Science Society of America Journal, Madison, v.47, p.241-245, 1983.
- PENA-CABRIALES, J.J. & ALEXANDER, M. Survival of *Rhizobium* in soils undergoing drying. Soil Science Society of America Journal, Madison, v.43, p.926-966, 1979.
- PEOPLES, M.B.; GAULT, R.R.; LEAN, B.; SYKES, J.D. & BROCKWELL, J. Nitrogen fixation by soybean in commercial irrigated crops of central and southern New South Wales. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v.26, p.553-561, 1995.
- PLAZINSKI, J. & ROLFE, B.G. Interaction of *Azospirillum* and *Rhizobium* strains leading to inhibition of nodulation. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.49, p.990-993, 1985.
- RAMOS, M.L.G. & BODDEY R.M. Yield and nodulation of *Phaseolus vulgaris* and the competitiveness of an introduced *Rhizobium* strain: effects of lime, mulch and repeated cropping. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v.19, p.171-177, 1987.
- RAMOS, M.L.G.; MAGALHÃES, N.F.M. & BODDEY, R.M. Native and inoculated rhizobia isolated from field grown *Phaseolus vulgaris*: Effects of liming an acid soil on antibiotic resistance. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v.19, p.179-185, 1987.
- REANNEY, D.C. Viruses and evolution. International Review of Cytology, San Diego, v.37, p.21-52, 1974.
- RUMJANEK, N.G.; DOBERT, R.C.; VAN BERKUN, P. & TRIPLETT, E.W. Common soybean inoculant strains in Brazil are members of *Bradyrhizobium elkanii*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.59, p.4371-4373, 1993.
- RUPELA, O.P. & SUDARSHANA, M.R. Displacement of native rhizobia nodulating chickpea (*Cicer arietinum* L.) by an inoculant strain through soil solarization. Biology and Fertility of Soils, Berlin, v.10, p.207-212, 1990.
- SANTOS, V.A.F.; NEVES, M.C.P. & RUMJANEK, N.G. Shading differentially affects the symbiotic efficiency of soybean nodulated by *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains, p.176-177. In: International Symposium on Sustainable Agriculture for the Tropics: the Role of Biological Nitrogen Fixation, Programme and Abstracts. Seropédica, EMBRAPA-CNPAB, 1995. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, 1996. (no prelo).
- SARDSHPANDE, J.S.; BALASUBRAMANYA, R.H.; KULKARNI, J.H. & BAGYARAJ, D.J. Protozoa in relation to *Rhizobium* S-12 and *Azotobacter chroococcum* in soil. Plant and Soil, Hague, v. 47, p.75-80, 1977.
- SCHLAMMAN, H.R.M.; OKKER, R.J.H. & LUGTENBERG, B.J.J. Regulation of nodulation gene expression by NodD in rhizobia. Journal of Bacteriology, Washington, v.174, p.5177-5182, 1992.
- SCHOLLA, M.H. & ELKAN, G.H. *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. International Journal of Systematic Bacteriology, Washington, v.34, p.484-486, 1984.
- SCOTTI, M.R.M.M.L.; NEVES, M.C.P.; PAIVA, E. & DÖBEREINER, J. Effect of soybean roots on strain competitiveness and protein profile of *Bradyrhizobium japonicum* adapted to Cerrado soils. Anais da Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, v.65, p.427-438, 1993.
- SCOTTI, M.R.M.M.L.; SÁ, N.M.H.; VARGAS, M.A.T & DÖBEREINER, J. Streptomycin resistance of *Rhizobium* isolates from Brazilian cerrados. Anais da Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, v.54, p.733-738, 1982.
- SEGÓVIA, L.; YOUNG, J.P.W. & MARTÍNEZ-ROMERO, E.. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I as *Rhizobium etli* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology, Washington, v.43, p.374-377, 1993.
- SINGLETON, P.W.; BOHLOOL, B.B. & NAKAO, P.L. Legume response to rhizobial inoculation in the tropics: myths and realities, p. 135-155. In: Myths and Science of Soils

- in the Tropics. SSSA Special Publication, nº 29. Madison, Soil Science Society of America, 1992.
- SOBERÓN-CHAVEZ, G.; NÁJERA, R.; OLIVEIRA, H. & SEGÓVIA, L. Genetic rearrangements of a *Rhizobium phaseoli* symbiotic plasmid. Journal of Bacteriology, Washington, v.167, p. 487-491, 1986.
- SOMASEGARAM, P.; HOBEN, H.J. & GURGUN, V. Effect of inoculation rate, rhizobial strain competition and nitrogen fixation in chickpea. Agronomy Journal, Madison, v.80, p.68-73, 1988.
- SPAINK, H.P. The molecular basis of the host specificity of the *Rhizobium* bacteria. Antonie van Leeuwenhoek, Dordrecht, v.65, p.81-98, 1994.
- SPRENT, J. & FARIA, S. M. DE. Mechanisms of infection of plants by nitrogen fixing organisms. p.3-11. In: F.A. Skinner, R.M. Boddey & I. Fendrik (eds.), Nitrogen Fixation with Non-Legumes. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1989, 336 p.
- SPRENT, J. Evolution and diversity in the legume-rhizobium symbiosis: chaos theory? Plant and Soil, Dordrecht, v.161, p.1-10, 1994.
- SPRENT, J.I. & SPRENT, P. Nitrogen fixing organisms - pure and applied aspects. London, Chapman and Hall, 1990, 256p.
- STREETER, J.G.; SALMINEN, S.O.; BEUERLEIN, J.E. & SCHMIDT, W.H. Factors influencing the synthesis of polysaccharide by *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids in field-grown soybean nodules. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.60, p.2939-2943, 1994.
- STREIT, W.; KOSCH, K. & WENER, D. Nodulation competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* and *Rhizobium tropici* strains measured by glucuronidase (gus) gene fusion. Biology and Fertility of Soils, Berlin, v.14, p.140-144, 1992.
- THIAGARAJAN, T.R. & AHMAD, M.H. Influence of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus on the competitive ability of *Bradyrhizobium* spp. for nodulation of cowpea *Vigna unguiculata* (L.) Walp in non-sterilized soil. Biology and Fertility of Soils, Berlin, v.15, p.294-296, 1993.
- 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.
- 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.
- 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 symbiotic gene region restriction fragment length polymorphism and plasmid profile analysis. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.60, p.1146-1153, 1994.
- THOMPSON, J.A. Production and quality control of legume inoculants. p.489-553. In: F.J. Bergersen (ed.), Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation, Brisbane, Wiley, 1980, 702p.
- TRINICK, M.J. & HADOBAS, T.A. The biology of the *Parasponia-Bradyrhizobium* symbiosis. Plant and Soil, Dordrecht, v.110, p. 177-185, 1988.
- TRIPLETT, E.W. & BARTA, T.M. Trifolitoxin production and nodulation are necessary for the expression of superior nodulation competitiveness by *R. leguminosarum* bv. *trifolii* strains T24 on clover. Plant Physiology, Rockville, v.85, p. 335-342, 1987.
- TRIPLETT, E.W. & SADOWSKY, M.J. Genetics of competition for nodulation of legumes. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, v.46, p.399-428, 1992.
- VARGAS, 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, M.A.T. & SUHET, A.R. Efeito de tipos e níveis de inoculantes na soja (*Glycine max*) cultivada em um solo de cerrados. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.15, p.343-347, 1980.

- VARGAS, M.A.T.; MENDES, I.C.; SUHET, A.R. & PERES, J.R.R. Fixação biológica de nitrogênio. p.159-182. In: N.E. Arantes & P.I.M Souza (eds.), A Cultura da Soja nos Cerrados. Piracicaba, POTAFOS/EMBRAPA, 1993.
- VIDOR, C & MILLER, R.H. Relative saprophytic competence of *Rhizobium japonicum* strains in soils as determined by the quantitative fluorescent antibody technique (FA). Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v.12, p.483-487, 1980.
- VLASSAK, K.; VANDERLEYDEN, J. & FRANCO, A.A. Competition and persistence of *Rhizobium tropici* and *Rhizobium etli* in tropical soil during successive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultures. Biology and Fertility of Soils, Berlin, v.21, p.61-68, 1996.
- WANG, C.L.; BERINGER, J.E. & HIRSCH, P.R. Host plant effects on hybrids of *Rhizobium leguminosarum* biovars *viceae* and *trifolii*. Journal of General Microbiology, Reading, v.132, p.2063-2070, 1986.
- WANI, S.P.; RUPELA, O.P. & LEE, K.K. Sustainable agriculture in the semi-arid tropics through biological nitrogen fixation in grain legumes. Plant and Soil, Dordrecht, v.174, p. 29-49, 1995.
- WEAVER, R.W. & FREDERICK, L.R. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max* L. Merrill. II Field studies. Agronomy Journal, Madison, v.66, p.233-236, 1974.
- WEBER, D.F. & MILLER, V.L. Effect of soil temperature on *Rhizobium japonicum* serogroup distribution in soybean nodules. Agronomy Journal, Madison, v.64, p.796-798, 1972.
- WOLFF, A.B.; STREIT, W.; KIPE-NOLT, J.A.; VARGAS, H. & WERNER, D. 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.
- WOOMER, P.; SINGLETON, P.W. & BOHLOOL, B.B. Ecological indicators of native rhizobia in tropical soils. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v.54, p.1112-1116, 1988.
- XU, L.-M.; GE, C.; CUI, Z.; LI, J. & FAN, H. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov. isolated from the root nodules of soybean. International Journal of Systematic Bacteriology, Washington, v.45, p.706-711, 1995.
- YOUSEF, A.N.; AL-NASSIRI, A.S.; AL-AZAWI, S.K. AND ABDUL-HUSSAIN, N. Abundance of peanut rhizobia as affected by environmental conditions in Iraq. Soil Biology and Biochemistry, Oxford-, v.19, p.319-396, 1987.