

Algumas Limitações à Fixação Biológica de Nitrogênio em Leguminosas





*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

ISSN 1517-8498

Julho/2008

Documentos 252

Algumas Limitações à Fixação Biológica de Nitrogênio em Leguminosas

**Paulo Ivan Fernandes Júnior
Veronica Massena Reis**

***Seropédica – RJ
2008***

Exemplares desta publicação podem ser adquiridas na:

Embrapa Agrobiologia

BR 465 – km 7

Caixa Postal 74505

23851-970 – Seropédica/RJ, Brasil

Telefone: (0xx21) 2682-1500

Fax: (0xx21) 2682-1230

Home page: www.cnpab.embrapa.br

e-mail: sac@cnpab.embrapa.br

Comitê Local de Publicações: Eduardo F. C. Campello (Presidente)
José Guilherme Marinho Guerra
Maria Cristina Prata Neves
Veronica Massena Reis
Robert Michael Boddey
Maria Elizabeth Fernandes Correia
Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

Expediente:

Revisores e/ou ad hoc: Gustavo Ribeiro Xavier e Segundo Urquiaga

Normalização Bibliográfica: Dorimar dos Santos Félix

Editoração eletrônica: Marta Maria Gonçalves Bahia

1ª impressão (2008): 50 exemplares

F363a Fernandes Júnior, Paulo Ivan

Algumas limitações à fixação biológica de nitrogênio em leguminosas /
Veronica Massena Reis. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2008. 33 p.
(Documentos / Embrapa Agrobiologia, ISSN 1517-8498; 252)

1. Fixação biológica de nitrogênio. 2. Leguminosas. I. Reis, V. M., colab.
II. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia (Seropédica, RJ).
III. Título. IV. Série.

CDD 572.545

Autores

Paulo Ivan Fernandes Júnior

Mestre em Agronomia/Ciência do Solo pela UFRuralRJ;
Doutorando do Curso de Pós-Graduação em Agronomia/Ciência do Solo pela UFRuralRJ
BR 465; Km 07. CEP 23851-970. Seropédica-RJ
E-mail: pauloivanjr@gmail.com

Veronica Massena Reis

Eng^a Agrônoma, PhD em Ciência do Solo, Pesquisadora da Embrapa Agrobiologia.
BR 465, km 7 – Caixa Postal 74505, Cep 23851-970, Seropédica/RJ
e-mail: veronica@cnpab.embrapa.br

Apresentação

As atitudes de usar com responsabilidade os recursos naturais (solo, água, ar, flora, fauna, energia), de preservar e conservar a natureza são cada vez mais necessárias para a sociedade moderna acarretando em uma busca constante por sistemas de produção agropecuários apoiados em princípios ecológicos e naturais.

Dentro desse cenário, a Embrapa Agrobiologia construiu o seu atual plano diretor de pesquisa (2008-2011), desenvolvimento e inovação com a seguinte missão “gerar conhecimentos e viabilizar tecnologias e inovação apoiados nos processos agrobiológicos, em benefício de uma agricultura sustentável para a sociedade brasileira”.

A série documentos nº 252 intitulada “Algumas limitações à fixação biológica de nitrogênio em leguminosas” lista e discute sobre alguns dos principais fatores bióticos e abióticos que podem interferir na nodulação eficiente de plantas da família das leguminosas quando inoculadas com bactérias fixadoras de nitrogênio. Otimizar as condições ambientais para que os simbioses possam expressar suas potencialidades passa por conhecer cada mais os fatores limitantes da fixação biológica de nitrogênio e como eles podem ser sobrepujados. A presente publicação traz no seu conteúdo informações relevantes para que estudantes, técnicos, pesquisadores possam cada vez mais conhecer e se aproveitar melhor da simbiose rizóbio-leguminosas.

Eduardo Francia Carneiro Campello
Chefe Geral da Embrapa Agrobiologia

SUMÁRIO

Introdução.....	7
Limitações à FBN	10
Competitividade de Bactérias Nativas do Solo e Promiscuidade	10
Principais Estresses Ambientais: temperatura, acidez e déficit hídrico ...	15
Acidez do Solo	15
Temperaturas e Estresse Hídrico	19
Estratégias Mitigadoras às Limitações à FBN	21
Desenvolvimento de Formulações de Inoculantes	21
Seleção de Estirpes Eficientes e Competitivas: o exemplo do feijão comum e do feijão caupi no Brasil	22
Considerações Finais	23
Referências Bibliográficas	24

Algumas Limitações à Fixação Biológica de Nitrogênio em Leguminosas

Paulo Ivan Fernandes Júnior
Veronica Massena Reis

Introdução

A fixação biológica do Nitrogênio (FBN) é um processo natural que consiste na redução do nitrogênio atmosférico (N₂) a compostos amoniacais (Equação 1). Esse processo é catalisado pela nitrogenase, um complexo enzimático exclusivo de um grupo de procariotos denominados diazotróficos (VESSEY et al., 2004; MOREIRA & SIQUEIRA, 2006).



Equação 1. Reação de fixação de nitrogênio atmosférico a compostos amoniacais catalisado pela enzima nitrogenase

Os diazotróficos apresentam uma elevada diversidade genética e versatilidade metabólica, essa diversidade reflete na forma com a qual esses organismos vivem e distribuem-se nos diferentes ecossistemas, ocupando diferentes nichos ecológico e habitats nesses ecossistemas. A contribuição destes organismos no “input” de N nas teias alimentares é muito grande, uma vez que a contribuição biológica da fixação do nitrogênio é muito maior que a contribuição não biológica (natural ou antrópica) (Tabela 1).

Tabela 1. Estimativas da fixação de nitrogênio por diferentes processos e em diferentes ambientes

Fonte de fixação	Quantidade fixada (10 ⁹ kg N/ano)
Industrial (produção de fertilizantes)	65
Atmosférica e outros processos químicos	51
Total dos sistemas terrestres	180
Leguminosas	120
Demais sistemas terrestres	60
Oceanos	139

Dados compilados de BURNS & HARDY (1975) e KEENEY (1982) [(apud MOREIRA & SIQUEIRA, 2006)]; POSTGATE (1998); CAPONE et al. (2005).

Com relação à atividade metabólica os diazotróficos podem ser aeróbios (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, etc.), anaeróbios obrigatórios (*Clostridium*, etc.) ou anaeróbios facultativos (*Klebsiella* spp.). Essa versatilidade metabólica diversifica a quantidade de ambientes que podem ter a presença de organismos diazotróficos, o que resulta em uma colaboração dos diazotróficos no “input” de N nas diversas cadeias alimentares.

A diversidade ecológica desses organismos resultou em diferentes “estilos de vida” desses procariotos. Uma grande parte dessas bactérias é de vida livre, não se associando a plantas ou a outros organismos. Os diazotróficos de vida livre podem viver em ambientes como o solo, águas dulcícolas e marinhas. Em contrapartida, existem diazotróficos capazes de se associar à plantas de diferentes formas, sendo que essas associações podem contribuir para o desenvolvimento vegetal (Tabela 2).

Tabela 2. Sumário das interações entre bactérias fixadoras de nitrogênio e suas plantas hospedeiras.

Estilo de vida das bactérias	Interação ecológica com plantas hospedeiras	Gêneros Bacterianos	Referências
Associação com plantas	Associações Mutualísticas-Rizóbios	<i>Rhizobium</i> , <i>Bradyrhizobium</i> , <i>Sinorhizobium</i> (<i>Ensifer</i>), <i>Mesorhizobium</i> , <i>Allorhizobium</i> , <i>Azorhizobium</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Cupriavidus</i> , <i>Devosia</i> , <i>Methylobacterium</i> , etc.	WILLENS (2006); MOREIRA & SIQUEIRA, (2006); BALANCHADAR et al. (2007)
	Associações não mutualísticas - bactérias diazotróficas não formadoras de nódulos ou estruturas especiais em plantas hospedeiras	<i>Azospirillum</i> , <i>Herbaspirillum</i> , <i>Gluconacetobacter</i> , <i>Azotobacter</i> , <i>Burkholderia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Anabaena</i> , etc.	MOREIRA & SIQUEIRA, (2006)
Vida livre	-	<i>Nostoc</i> , <i>Trichodesmium</i> , etc	CAPONE et al. (2005), MOREIRA & SIQUEIRA, (2006)

Plantas de diversos grupos como as bromeliáceas (MARTÍNEZ et al., 2003), droseráceas (ALBINO et al., 2006) e principalmente Poaceas (DÖBEREINER, 1997) associam-se com bactérias diazotróficas de diversos gêneros. Essas bactérias são denominadas de bactérias associativas, uma vez que não há a formação de nódulos de

leguminosas que são estruturas especializadas para realizar a fixação biológica de nitrogênio (FBN). As bactérias associativas estão presentes em diferentes tecidos do hospedeiro (como xilema, protoxilema, parênquima lacunar e córtex radicular) em diferentes órgãos (colmo, raízes e folhas). Essas associações são tidas como associações pouco especializadas, classificadas por alguns autores (VESSEY et al., 2004), embora haja um controle genético refinado na especificidade e eficiência entre os pares.

A associação entre rizóbios e leguminosas é o tipo de associação mais estudada devido a sua peculiaridade na capacidade de formação de nódulos radiculares e devido à importância agrícola das espécies dessa família.

Com o desenvolvimento de ferramentas moleculares para estudos filogenéticos a taxonomia das bactérias diazotróficas tem mudado nos últimos anos devido a inclusão no grupo dos rizóbios de bactérias pertencentes a outras subclasses como beta-proteobactérias pertencentes aos gêneros *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Methylobacteria*, etc (MOULIN et al., 2001; CHEN et al., 2001, 2005). Dessa forma, alguns autores não consideram adequada a continuidade da utilização do termo rizóbio, para designar as bactérias que formam nódulos em leguminosas. MOREIRA & SIQUEIRA (2006) propõem a utilização do termo “bactérias fixadoras de nitrogênio nodulantes em leguminosas” (BFNNL) como um termo mais apropriado para denominar essas bactérias. Porém a terminologia utilizada nessa revisão será a terminologia tradicional utilizando a palavra “rizóbio”, referindo aos rizóbios tradicionais de grupos nodulantes recentemente descritos.

Além da associação com leguminosas, há outras associações que envolvem bactérias formadoras de nódulos, são elas as associações entre aos actinomicetos e *Frankia*, entre rizóbios e *Parasponia* (VESSEY et al., 2004) e entre cicadáceas e diversas bactérias, como *Nostoc* e mais recentemente demonstrado com bactérias do gênero *Rhizobium* (HUANG et al., 2007), porém essas associações são muito pouco estudadas principalmente devido pouco ou nenhum interesse agrônomo dessas espécies vegetais. Estudos recentes têm se dedicado à descrição de novas espécies de bactérias diazotróficas (REIS et al., 2004; MOREIRA et al., 2006; PERIN et al., 2006) e reclassificação de espécies descritas (MOULIN et al., 2001; CHEN et al., 2005), caracterização de especificidade entre os pares, seleção de

estirpes bacterianas eficientes (HUNGRIA et al., 2000; MARTINS et al., 2003) e mecanismos de controle da nodulação (TIRICHINE et al., 2006, 2007). Esses estudos colaboram para o maior entendimento das associações entre plantas hospedeiras e bactérias diazotróficas, o que resulta em um acúmulo de um background de conhecimento aplicável à solução de problemas limitantes da eficiência da tecnologia de inoculação.

Limitações à FBN

As limitações à FBN contribuem como um fator impeditivo do estabelecimento de bactérias inoculadas em campos de cultivo, reduzindo a eficácia da tecnologia de inoculação. Em ambientes naturais, as limitações à FBN podem culminar com a redução de produtividade dos ecossistemas, o que resulta em redução da taxa de carbono fixado, um importante tópico da biogeoquímica em tempos de aquecimento global. Nessa seção, serão discutidas algumas das principais limitações à FBN nos agroecossistemas bem como alguns resultados de pesquisa que colaboram para mitigar esses fatores impeditivos.

Competitividade de Bactérias Nativas do Solo e Promiscuidade

A seleção de estirpes de rizóbio para a fabricação de inoculantes deve levar em consideração não apenas a eficiência das estirpes em fixar o nitrogênio atmosférico, mas também a capacidade de competir com as estirpes nativas do solo, sendo este fator um dos mais limitantes e que contribui bastante para o insucesso da inoculação em condições de campo. Dessa forma, a seleção deve indicar estirpes eficientes e competitivas.

Segundo LUPWAYI et al. (2005) competitividade é a capacidade de uma ou mais estirpes de rizóbio em crescer, sobreviver e colonizar os sítios de nodulação em detrimento das outros rizóbios. Os sítios de nodulação em leguminosas são os pontos pelos quais os rizóbios infectam a planta hospedeira e começam a desenvolver o cordão de infecção em direção ao córtex radicular. Esses sítios são os pelos radiculares para a maioria das leguminosas de grão como a soja, feijão e feijão-caupi, dentre outras; e são aberturas naturais como feridas, fissuras geradas pela emissão de raízes e radículas

secundárias, para culturas como a do amendoim e de diversas espécies arbóreas (HIRSCH & LARUE, 1997).

As estirpes de rizóbio competem pela ocupação dos sítios de infecção e as bactérias mais competitivas tendem a ocupar uma maior quantidade desses sítios e resultar em maior número de nódulos formados. Geralmente os rizóbios nativos de um determinado solo tendem a apresentar maior adaptação às condições edáficas principalmente quando o solo apresenta alguma limitação como teor elevado de metais ou baixo teor de matéria orgânica, devido à maior pressão de seleção gerada pelo ambiente, selecionando organismos altamente adaptados. Apesar das estirpes rizobianas do solo apresentar elevada competitividade, essas bactérias apresentam baixa eficiência simbiótica, ou seja, fixam muito pouco nitrogênio quando formam nódulos.

Além da elevada capacidade competitiva das estirpes nativas, outro fator importante deve ser considerado na ocupação nodular de estirpes de rizóbio inoculadas: a promiscuidade das plantas hospedeiras. As leguminosas são consideradas promíscuas quando nodulam com um gama muito grande de estirpes rizobianas (PERRET et al., 2000). Essas plantas não apresentam elevada especificidade com estirpes rizobianas, sendo capazes, por esse motivo, de estabelecer as associações com diversos rizóbios nativos do solo. Diversas leguminosas de grão são consideradas promíscuas, dentre elas podem ser destacadas o feijão (STRALIOTTO et al., 2002), o feijão-caupi (RUMJANEK et al., 2005) e o amendoim (BORGES et al., 2007). A presença de estirpes de rizóbio competitivas e de baixa eficiência, além da promiscuidade das espécies cultivadas são dois fatores importantes na redução da eficiência e do estabelecimento das estirpes inoculadas.

Na Tabela 3, encontram-se resultados compilados de estudos que avaliaram a capacidade competitiva de bactérias inoculadas e de estirpes nativas do solo. Diversos estudos avaliaram a influência da concentração de células rizobianas no solo na eficiência das estirpes inoculadas. THIES et al. (1991) mostraram que o número reduzido de células rizobianas no solo são capazes de ocupar grande parte dos nódulos de oito leguminosas em condições de campo. Neste estudo, as estirpes foram inoculadas com um número de células 10^6 de vezes maior que as o número de células das estirpes nativas do solo e

mesmo assim, ocuparam em média 50% dos nódulos. No mesmo estudo, a ocupação nodular das estirpes inoculadas subiu para mais de 80% quando a população nativa de rizóbio apresentou-se 10^8 - 10^9 vezes menor (Tabela 3). Esses resultados podem ser atribuídos não somente à ineficiência das estirpes inoculadas, mas também à promiscuidade de algumas espécies estudadas, como feijão, feijão-caupi, leucena e amendoim.

As espécies mais promíscuas tendem a apresentar menor eficiência na ocupação nodular de estirpes inoculadas. Estirpes inoculadas em leucena apresentaram baixa eficiência se comparada com as estirpes nativas do solo. A eficiência das estirpes noduladas foi maior quando o foi utilizado o manejo da irrigação no sistema de produção (MOAWAD & BOHLOOL, 1984). Resultados semelhantes foram encontrados anteriormente (SINGLETON & TAVARES, 1986) (Tabela 3).

Em experimentos realizados com soja, McDERMOTT & GRAHAM (1989) mostraram que duas estirpes recomendadas para esta cultura apresentam baixa ocupação nodular na raiz principal (região da coroa) e nas raízes secundárias em solo com população de rizóbio cem vezes menor que a da estirpe inoculada (Tabela 3). Esse estudo avaliou também que a eficiência do inoculante aplicado em diferentes distâncias da semente, concluindo que a eficiência do inoculante utilizado é inversamente proporcional à distância das células em relação à semente.

Até mesmo estirpes altamente eficientes e recomendadas para a produção de inoculantes podem apresentar nodulação precária, quando inoculadas em condições nas quais a população de rizóbio do solo é muito competitiva. A estirpe PRF 81 de *R. tropici* é uma estirpe altamente eficiente e competitiva, recomendada para a cultura do feijoeiro no Brasil. Esta estirpe apresentou nodulação muito baixa quando inoculada em solo com população rizobiana não detectável pelo método do número mais provável (RAPOSEIRAS et al., 2006). O mesmo resultado foi observado para estirpes selecionadas em ambientes áridos da África para espécies arbóreas de *Acacia* spp. em solo com população rizobiana não detectável mas capaz de nodular *Acacia* spp. Algumas estirpes inoculadas foram capazes de ocupar apenas 50% dos nódulos (SARR & LESUEUR, 2007).

Estirpes recomendadas para a cultura do amendoim também se apresentaram ineficientes na ocupação nodular (>50%) em um experimento realizado em um área com baixa população rizobiana (CASTRO et al., 1999). O amendoim é uma espécie altamente promíscua capaz de nodular com diversos rizóbios presentes no solo, o que resulta na não recomendação técnica da prática da inoculação desta cultura. BORGES et al. (2007) avaliaram a capacidade de diferentes acessos dessa cultura em formar nódulos em dois tipos de solo. Os resultados demonstraram que os nove acessos testados apresentaram nodulação abundante em ambos os solos estudados, porém a eficiência da FBN avaliada através da técnica da redução de acetileno revelou que apenas cinco acessos destacaram-se na atividade dos nódulos.

Estudos relacionados as bases genéticas e moleculares que regulam a relação especificidade/promiscuidade dos pares simbiotes têm auxiliado a elucidar os mecanismos envolvidos nessa relação. A especificidade entre as plantas hospedeiras e as estirpes de rizóbio é controlada por diversos mecanismos genéticos das plantas e da bactéria, sendo que no primeiro momento são controlados por exudados radiculares e bacterianos (PERRET et al., 2000). Os flavonóides produzidos pelas leguminosas são as principais moléculas envolvidas no reconhecimento da espécie vegetal pelas rizóbios. Existem flavonóides que são exudados e reconhecidos por uma gama muito grande de bactérias, enquanto outros são reconhecidos apenas por poucas bactérias. Por outro lado, a produção de fatores “nod” por bactérias é a segunda etapa da comunicação ente os pares simbiotes. Esses fatores “nod” são resultado da expressão dos genes *nod* e podem ser específicos ou ser reconhecidos por uma quantidade muito grande de espécies vegetais, causando produção e encurvamento dos de pêlos radiculares (HIRSCH et al., 2001) No reconhecimento dessas moléculas (flavonóides pelas plantas hospedeiras e fatores nod pelas bactérias) e na expressão dos genes que regulam a sua síntese está a chave para o entendimento da relação entre promiscuidade e especificidade dos pares simbiotes, o que pode colaborar para o desenvolvimento de tecnologias para o aumento da produção destas culturas.

Tabela 3: Resultados de estudos avaliando a competitividade entre estirpes de rizóbio inoculadas e estirpes nativas do solo

Nº Células rizobianas g ⁻¹ de solo (ufc/g)	Nº Células rizobianas g ⁻¹ de inoculante (ufc/g ou mL)	Ocupação nodular (%)	Cultura(s) estudada(s)	Condições experimentais	Técnica utilizada para avaliar ON	Referência
200 31 3480 1610	ND ¹	38,8-65 74,2-87,6 67-86 73-77	Feijão Feijão Feijão-Caupi Amendoim	Experimentos em condições de campo.	Resistência intrínseca a antibióticos	KREMER & PETERSON, 1982
0 6-100 6-100 1-5800 10 ⁴ 3000	ND	100 79-94 88-100 57-96 100 76	Soja Amendoim <i>P. lunatus</i> Feijão-caupi Feijão Leucena	Experimentos em condições de casa de vegetação.	ELISA	SINGLETON & TAVARES, 1986
1,3x10 ⁵	1,3 x 10 ⁷	33±10 13±5	Soja	Experimento de campo. Raiz principal. Experimento de campo. Raízes laterais.	ELISA	McDERMOTT & GRAHAM, 1989
ND	>10 ⁹	0-66 0-44	Leucena	Experimento de campo conduzido em um latossolo utilizando sistema irrigado Experimento de campo conduzido em um mollisol sem sistema de irrigação	ELISA	MOAWAD & BOHLOOL, 1989
1-10 10-100 >100	4,03x10 ⁸ -3,16x10 ⁹	89 86 53	Feijão, feijão-caupi, leucena, alfafa, amendoim, trevo, <i>L. tingeatus</i> e <i>P. lunatus</i>	Experimento de campo	ELISA com imunofluorescência	THIES et al., 1991
>10	5x10 ⁸	Aprox. 85 Aprox. 35	Feijão-comum	Experimento de Casa de Vegetação. Avaliação aos 17 e 21 DAE Experimento de Casa de Vegetação. Avaliação aos 30 DAE	Marcação com gene <i>gus</i>	STREIT et al., 1995
ND	>10 ⁹	92±7,5 88±11,6	Soja	Experimento de campo. Estirpe USDA 110. Experimento de campo. Estirpe SSR 8.	ELISA com imunofluorescência.	PALANIAPPAN et al., 1997
ND	>10 ⁹	15-81	Soja	Experimentos de campo utilizando dois cultivares de soja.	ELISA com imunofluorescência	HUNGRIA et al., 1998
ND	1,8x10 ⁶ por semente	<50	Amendoim	Experimento de campo em área nunca cultivada com leguminosas	Resistência intrínseca a antibióticos e ELISA	CASTRO et al., 1999
9000-3x10 ⁵	6x10 ⁸ -2x10 ⁹	16,6-61,6	Trevo	Experimento de Campo em área cultivada com cevada.	ERIC-PCR	SVENNING et al., 2001
10 ⁴	>10 ⁹	>10-100	Feijão-Caupi	Experimentos de campo em área de sequeiro do semi-árido nordestino.	ELISA	MARTINS et al., 2003
Não detectável	>10 ⁹	0-100	Feijão	Experimento em área anteriormente cultivada com milho e sorgo por 10 anos	PCR-RAPD e ELISA	RAPOSEIRAS et al., 2006
Não detectável	10 ⁹	50-100	<i>Acacia</i> spp.	Experimento de campo com cultivares de <i>Acacia</i> spp. de diferentes procedências	PCR-RFLP	SARR & LESUEUR, 2007

¹ND: Não Determinado

Principais Estresses Ambientais: temperatura, acidez e déficit hídrico

Os estresses ambientais representam importantes fatores que influenciam a eficiência da FBN. Diversas condições ambientais podem ser consideradas limitantes à nodulação e a FBN. Fatores como a acidez dos solos, as elevadas temperaturas e o déficit hídrico, dentre outros, são fatores mais agravantes nas condições tropicais (HUNGRIA & VARGAS, 2000). Na Tabela 4, encontram-se sumarizadas alguns resultados na avaliação de condições estressantes no desempenho dos parceiros.

Acidez do Solo

Os solos tropicais, em sua maioria, são constituídos de solos originários de formações geológicas muito antigas. Por exemplo, a maioria dos solos brasileiros são Latossolos ou Argissolos, solos bem desenvolvidos, bastante profundos, com baixa fertilidade natural e geralmente ácidos.

Na associação rizóbio–leguminosa, o microssimbionte é o parceiro que mais é afetado pelo pH baixo dos solos, mas vale a pena ressaltar que a tolerância à acidez do solo é diferenciada entre as espécies e estirpes de rizóbio. A tolerância a acidez é uma importante característica das estirpes de rizóbio, sendo esta característica utilizada como classificatória das estirpes nas coleções de culturas. Por exemplo, as estirpes que nodulam o feijoeiro são classificadas como do tipo I e tipo II. As do tipo I são estirpes isoladas de nódulos em feijoeiro e que têm especificidade relativamente restrita à essa hospedeira, são mais sensíveis à acidez que estirpes do tipo II, estirpes isoladas de nódulos de outras hospedeiras, como leucena, e que nodulam o feijoeiro e não apresentam uma relação de especificidade tão restrita entre a bactéria e a planta hospedeira (MERCANTE et al., 1998).

A etapa mais sensível a acidez do solo em relação à nodulação do rizóbio é a fase inicial da nodulação, incluindo a fase de exsudação de flavonóides pela leguminosa e síntese dos fatores *nod* pela bactéria, ou seja, a fase de comunicação química entre os parceiros (HUNGRIA & VARGAS, 2000). Resultados experimentais mostraram que a expressão dos gene *nod* de estirpes de rizóbio, induzida pela exsudação radicular de soja e feijão, foi menor em pH 4,5 quando

comparada com o pH 5,8 em condições controladas (HUNGRIA & STACEY, 1997).

Estudos avaliando a produtividade de culturas em solos ácidos mostraram redução da produtividade ao longo dos anos em cultivos sucessivos nessas condições, concomitantemente com a queda da população de rizóbio (WATKIN et al., 1997). Com a sobrevivência de células rizobianas comprometida, existe a necessidade da re-inoculação a cada plantio, para a manutenção da produtividade, mesmo na presença de leguminosas ocupando a área ao longo do ano (WATKIN et al., 2000). A acidez do solo além de ser prejudicial às estirpes de rizóbio pelo baixo pH, outro fator importante associado é o aumento da concentração de Al^{3+} . Diversas estirpes de rizóbio são sensíveis a concentrações medianas de alumínio trocável. Algumas estirpes apresentaram crescimento em meio de cultura com 50 μM de Al^{3+} e nodulação significativamente reduzida quando comparadas com controles sem alumínio em solos com teores de alumínio trocável relativamente baixo (WOOD et al., 1989). Outros estudos *in vitro* têm demonstrado que o crescimento das estirpes de rizóbio em meios de cultura com pHs mais ácidos também é menor (OLIVEIRA & MAGALHÃES, 1999), ocorrendo também alteração do perfil protéico (AARONS & GRAHAM, 1991) e atividade de enzimas como amilases e enzimas proteolíticas (OLIVEIRA et al., 2006). As características culturais e a produção síntese de exopolissacarídeos e fatores nod também são alteradas quando células de rizóbio encontram-se expostas a pHs mais ácidos (MORÓN et al., 2005). A alteração da produção dos fatores nod reforça a sensibilidade dos primeiros passos do estabelecimento da associação entre os pares simbiotes.

A resistência das estirpes de rizóbio à acidez está a capacidade da manutenção do pH celular, mesmo com condições externas não favoráveis. BALLEEN et al. (1998) demonstraram que células de *R. tropici* quando expostas a pHs mais ácidos sintetizam uma membrana externa, e têm modificações citoplasmáticas. A morfologia celular pode ser alterada quando as bactérias são expostas à condições desfavoráveis (FENG et al., 2000). Anteriormente O'HARA et al. (1989) demonstraram que estirpes de rizóbio que apresentam melhor desempenho em solos ácidos, são estirpes que apresentam mecanismos mais ajustados de controle do pH intracelular em resposta ao pH externo.

A resistência intrínseca a acidez, é um fator importante para a seleção de estirpes para o cultivo em ambientes como o cerrado brasileiro, cujos solos são bastante ácidos e apresentam elevados teores de alumínio trocável.

Tabela 4: Avaliação de estresses ambientais no desempenho de estirpes de rizóbio de diversas hospedeiras

Espécie	Hospedeira	Fator(es) avaliado(s)	Condições experimentais	Resultados	Referência
<i>R. meliloti</i> ¹ e <i>R. phaseoli</i> ²	Alfafa	Acidez	Inoculação de estirpes de rizóbio em solos com diferentes pHs e incubação por 30 dias	As estirpes inoculadas em solo com pH 4,8 apresentaram aproximadamente sobrevivência em média 1000 vezes menor.	LOWENDORF, et al., 1981
<i>Rhizobium trifolii</i>	<i>T. repens</i>	Acidez Al ³⁺	Inoculação de estirpes de rizóbio em vasos com solo com diferentes concentrações de Alumínio trocável e diferentes pHs	Plantas submetidas a pHs igual ou inferior a 4,7 não nodularam e não apresentaram pelos radiculares	WOOD et al., 1984
<i>R. trifolii</i> ³	<i>Trifolium</i> sp.	Acidez	Crescimento de 19 isolados em meio de cultura com pH variando entre 4,7 a 6,0. Experimento em casa de vegetação utilizando solo com pH 4,1 e 5,2.	A maioria das estirpes não cresceu em pH mais baixo. A FBN foi menor no tratamento onde o pH do solo foi mais ácido	LINDSTRÖM & MYLLYNIEMI, 1987
<i>B. japonicum</i> e <i>R. loti</i> ⁴	<i>Lotus</i> sp.	Acidez; Al ³⁺	Crescimento em meio líquido em diferentes pHs e concentrações de Al ³⁺ .	Crescimento pouco menor que o controle Crescimento muito menor que o controle	WOOD et al., 1988
<i>R. leguminosarum</i> bv <i>phaseoli</i> .	Feijão	Acidez	Experimento em casa de vegetação em solos com pH entre 4,5 e 6,0	Redução da nodulação e competitividade de estirpes inoculadas	VARGAS & GRAHAM, 1989
<i>Bradyrhizobium</i> spp.	<i>Cyamopsis tetragonoloba</i> (L.)	Temperatura	Experimento em casa de vegetação avaliando a eficiência da FBN em função da temperatura radicular	Plantas submetidas a temperatura radicular de 40°C apresentaram FBN e nodulação muito inferiores (menos de 50%) se comparadas com plantas que foram mantidas com a temperatura radicular de 34°C.	ARAYANGKOON et al., 1990
<i>R. leguminosarum</i> bv <i>phaseoli</i>	Feijão	Acidez	Crescimento em meios líquidos com diferentes graus de acidez	Perfis protéicos diferenciados entre as bactérias que crescerem em meio mais ou menos ácido	AARONS & GRAHAM, 1991
<i>Bradyrhizobium</i> spp.	Amendoim	Temperatura	Crescimento em de estirpes de rizóbio em diferentes temperaturas. Inoculação de estirpes de rizóbio em condições e casa de vegetação em diferentes temperaturas.	Estirpes crescidas em temperaturas mais elevadas apresentaram um perfil protéico diferenciado. As plantas mantidas em temperaturas mais altas 40°C (contínuo ou diurnamente) apresentaram menor nodulação que as estirpes mantidas a temperatura ambiente.	KISHINEVSKY et al., 1992
<i>R. leguminosarum</i> bv <i>phaseoli</i> .	Feijão	Temperatura	Estirpes inoculadas em condições de casa de vegetação e crescimento vegetal em diferentes temperaturas.	As plantas mantidas em 28°C apresentaram nodulação mais abundante que as plantas mantidas à temperaturas de 35 ou 38°C.	HUNGRIA & FRANCO, 1993

Espécie	Hospedeira	Fator(es) avaliado(s)	Condições experimentais	Resultados	Referência
<i>Rhizobium</i> sp	Feijão-caupi	Estresse Hídrico	Avaliação da nodulação em condições irrigada e não irrigada em cultivo no ambiente do semi-árido.	As plantas que não receberam irrigação apresentaram um elevado percentual de abortamento dos nódulos, o que não foi observado em plantas que receberam o tratamento irrigado.	FERREIRA et al., 1994
<i>Rhizobium</i> spp.	Feijão	Temperatura	Avaliação da FBN em diferentes temperaturas	As plantas submetidas a 35 e 40°C apresentaram eficiência da FBN mais de 10 vezes menor que as plantas submetidas a 28°C.	MICHIELS et al., 1994
<i>Rhizobium</i>	Alfafa	Acidez	Avaliação da produtividade de alfafa em solos com diferentes faixas de pHs	Solos com faixas de pHs mais ácidos apresentaram menor quantidade de células rizobianas e a produtividade da alfafa tendeu a diminuir ao longo de 10 anos	KOOPMAN et al., 1995
<i>Rhizobium tropici</i> e <i>Rhizobium etli</i>	Feijão	Acidez	Avaliação do perfil de lipopolissacarídeos de rizóbios crescidos em diferentes pHs em	As estirpes de <i>Rhizobium</i> crescidas em pH ácido (4,0) apresentam diferente perfil de lipopolissacarídeos diferentes das estirpes crescidas em meios de cultura mais neutros.	BALLEN et al., 1998
<i>Rhizobium</i> sp	Leucena	Estresse hídrico	Avaliação da associação em condições de deficiência hídrica	Plantas não irrigadas apresentaram menor atividade da nitrogenase aos 22 DAE e anatomia do nódulo diferenciadas devido à deficiência de água.	MREMA et al., 1997
<i>R. leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i>	Alfafa	Acidez	Avaliação da taxa de reprodução de estirpes de rizóbio crescidas em diferentes níveis de acidez	As estirpes crescidas em pHs mais ácidos apresentaram aumento no tempo de geração se comparadas com aquelas que foram crescidas em pH neutro.	WATKIN et al., 1997
Diversas	Diversas	Acidez	Crescimento de 31 estirpes em meio YMA sólido com pHs 4,5 e 6,5.	Crescimento menos abundante das estirpes com em meio com pH mais baixo.	OLIVEIRA & MAGALHÃES, 1999
<i>R. leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i>	<i>Trifolium subterraneum</i>	Acidez	Avaliação da nodulação e produtividade em condições de campo em solo ácido	Estirpes apresentaram baixa persistência no solo, o que resultou na menor produtividade do trevo.	WATKIN et al., 2000
<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Prosopis juliflora</i>	Temperatura; Acidez; Salinidade.	Crescimento de estirpes em diferentes pHs, concentrações de NaCl e temperaturas.	Os três fatores influenciam na forma celular das bactérias.	KULKARNI & NAUTIYAL, 2000
<i>M. ciceri</i>	Grão de bico	Salinidade	Crescimento do rizóbio em meio YMA líquido com diferentes concentrações de NaCl	Estirpes crescidas em meio com maiores concentrações de NaCl apresentaram diferentes perfis protéicos e a exsudação de EPS também é diferenciada.	SOUSSI et al., 2001
<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago sativa</i> . e <i>M. murex</i>	Acidez	Avaliação da nodulação em função da acidez do solo em condições de campo	Ambas as espécies de <i>Medicago</i> , responderam menos à inoculação de estirpes de rizóbio, nos solos mais ácidos	CHENG et al., 2002
<i>Bradyrhizobium</i> spp.	Soja	Estresse hídrico	Avaliação da nodulação e eficiência da FBN em condições de déficit hídrico em condições de campo	O déficit hídrico reduz a nodulação e a eficiência da FBN em soja. Também há alteração no conteúdo de carboidratos nos nódulos de plantas submetidas a esse estresse ambiental.	STREETER, 2003

Espécie	Hospedeira	Fator(es) avaliado(s)	Condições experimentais	Resultados	Referência
<i>Sinorhizobium arboris</i>	<i>Acacia senegal</i>	Salinidade; Estresse hídrico	Estirpe crescida em meio com diferentes concentrações de NaCl. Bactérias inoculadas em solo com inoculada solo com dois níveis de umidade.	Estirpes bacterianas apresentaram menor crescimento meio de cultivo com maior concentração de NaCl. Estirpes inoculadas em solo com menor umidade apresentaram menor sobrevivência e nodulação. A trealose e betaína diminuíram o efeito dos estresses.	RÄSÄNEN et al., 2004
<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Sesbania rostrata</i> e <i>Neptunia plena</i>	Estresse hídrico	Crescimento das espécies vegetais em meio hidropônico em vasos Leonard.	No crescimento hidropônico as plantas não apresentam pêlos radiculares, ao contrário do cultivo nem vasos de Leonard. Em condições não hidropônicas o fitormônio etileno inibe a infecção através dos pelos radiculares	GOORMACHTIG et al., 2004
<i>Rhizobium tropici</i>	Feijão	Acidez	Estirpe CIAT 899 inoculada em vasos estéreis em diferentes pHs	pH mais ácido induz fatores nod diferentes daquele produzido no pH médio no qual esta estirpe foi isolada (5,5). A nodulação também foi menos abundante nesta condição.	MORÓN et al., 2005
<i>Rhizobium</i> spp.	Feijão-caupi	Estresse hídrico	Inoculação de estirpes de rizóbio em regimes hídricos limitado e não limitado.	Estirpes inoculadas em condições de estresse hídrico apresentam menor nodulação e competitividade.	KRASOVA-WADE et al., 2006
<i>Rhizobium tropici</i> e <i>Ensifer meliloti</i> bv. <i>mediterraneanse</i>	Feijão	Estresse hídrico	Eficiência da nodulação de estirpes inoculadas em condições de estresse hídrico em casa de vegetação e em campo	As plantas submetidas a estresse hídrico, apresentaram nodulação menos abundante e as estirpes inoculadas apresentaram menor ocupação nodular.	MINASRI et al., 2007

¹Atualmente: *Sinorhizobium (Ensifer) meliloti*; ²Atualmente: *R. leguminosarum* bv *phaseoli*; ³ Atualmente: *R. leguminosarum* bv *trifolii*; ⁴ Atualmente: *Mesorhizobium loti*.

Temperaturas e Estresse Hídrico

As elevadas temperaturas são um dos fatores mais limitantes para esse processo nos trópicos (LIE, 1981). Esse estresse ambiental é ainda mais agravado quando combinado com condições de deficiência hídrica, o que ocorre em diversas regiões tropicais, semi-áridas, áridas e em processo de desertificação.

Esses dois fatores influenciam na eficiência do estabelecimento da associação, ou seja, no período de comunicação entre os pares simbioses (VARGAS & HUNGRIA, 1997; KEYSER et al., 1997), mas pode afetar a eficiência da FBN e a manutenção de nódulos durante os estágios mais avançados, com a planta já nodulada e os bacteróides ativos (STREETER, 2003; KRASOVA-WADE et al., 2006).

Em regiões que passam por períodos de estiagem muito grandes ocorre drástica redução da população de rizóbios. Algumas estirpes

com elevada competência saprofítica ainda são capazes de persistir, porém com a ausência prolongada de plantas hospedeiras estas estirpes também podem não persistir no solo. Estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* isoladas de *Cajanus* spp. inoculadas em solos arenosos não foram capazes de sobreviver após um período de estiagem, não persistindo até próxima estação agrícola (ORCHARD & COOK, 1983). Porém em condições similares, estirpes isoladas de ambientes áridos são detectadas no solo mais de um mês após a inoculação das sementes (SHOUSHTARI & PEPPER, 1985).

A produtividade de plantas adaptadas a condições de secas e altas temperaturas também é afetada por deficiência hídrica. O feijão caupi que apresenta elevada tolerância à seca tem queda de produtividade e redução da FBN quando submetido a condições limitantes de disponibilidade hídrica na África (KRASOVA-WADE et al., 2006) e no Brasil (FERREIRA et al., 1994). Os mesmos resultados foram observados para leucena, uma espécie arbórea também resistente a elevadas temperaturas, onde além de redução da FBN e menor produtividade, a anatomia do nódulo apresentou-se diferenciada (MREMA et al., 1997). Redução na produtividade e eficiência na FBN também ocorre em culturas mais sensíveis como a soja (STREETER, 2003) e o feijão comum (MINASRI et al., 2007).

Alguns autores sugerem que a deficiência hídrica desencadeie uma série de respostas fisiológicas e anatômicas nas plantas hospedeiras, como diminuição da emissão de pêlos radiculares, descontinuidade da síntese de leghemoglobina e abortamento dos nódulos (GOORMACHTIG et al., 2004).

As elevadas temperaturas também são limitantes, mesmo quando não há deficiência hídrica. Mais uma vez, todas as fases da associação são afetadas, com ênfase na fase inicial da formação de nódulos. MERCANTE et al. (1998) demonstraram um pequeno percentual de estirpes testadas e apresentaram eficiência no estabelecimento da associação com feijão e leucena, quando submetidas à temperatura de 40°C.

O estabelecimento da associação entre *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* e o feijoeiro é afetado por aumento de 7°C na temperatura (HUNGRIA & FRANCO 1993). Nas mesmas condições, plantas de

feijoeiro podem ter a FBN dez vezes menor se comparadas com plantas mantidas a temperaturas mais baixas (MICHIELS et al., 1994).

Parte da relativa ineficiência no estabelecimento das associações rizóbio leguminosa em condições de temperaturas muito elevadas pode estar associada a modificações fisiológicas e bioquímicas nos pares simbiotes. Estirpes de rizóbio isolados de amendoim apresentaram perfis protéicos diferenciados quando cultivadas em meio de cultura em temperaturas em torno de 40°C. A ineficiência no estabelecimento da associação foi demonstrada em condições de casa de vegetação, para os pares submetidos a 40°C (KISHINEVSKY et al., 1992). Essa alteração no perfil protéico provavelmente está relacionada à síntese de proteínas de choque térmico, o que pode resultar em diminuição da síntese de complexos enzimáticos relacionados à FNB.

KULKARNI & NAUTIYAL (2000) também demonstraram que estirpes de rizóbio cultivadas em temperaturas mais elevadas, apresentam morfologia celular diferente daquelas cultivadas em temperatura ambiente. Essas modificações celulares foram associadas principalmente ao espessamento da parede celular, na tentativa de formar uma barreira à perda de água.

Uma combinação desses estresses ambientais pode resultar em perda da capacidade de nodular e fixar N em estirpes de menor estabilidade genética. Isso foi relatado por HUNGRIA & ARAÚJO (1995), onde um das estirpes então recomendadas para a fabricação de inoculantes para o feijoeiro no Brasil, classificada como *R. leguminosarum* bv. *Phaseoli* perdeu a capacidade a simbiótica após uma série de experimentos de casa de vegetação e campo.

Estratégias Mitigadoras às Limitações à FBN

Desenvolvimento de Formulações de Inoculantes

Os inoculantes rizobianos são compostos por uma suspensão bacteriana e por um substrato que serve como veículo dessas bactérias para a semente. As bactérias são estirpes de rizóbio selecionadas por um exaustivo trabalho de isolamento, caracterização e avaliação agrônômica de estirpes de rizóbio em diferentes regiões. O veículo é composto por um substrato testado e que deve ter certas

características para manutenção da viabilidade de células e ser responsável em parte para a adequação do inoculante às exigências legais de cada país.

Seleção de Estirpes Eficientes e Competitivas: o exemplo do feijão comum e do feijão caupi no Brasil

A seleção de estirpes para ambientes estressantes como o cerrado ou a região semi-árida é importante para a produção das culturas nesses locais. Essa seleção deve considerar não apenas a eficiência agrônômica das estirpes, mas a sua tolerância aos estresses ambientais das diferentes regiões do Brasil, como a tolerância a Al^{3+} para a região o cerrado e tolerância a secas e elevadas temperaturas, para o semi-árido nordestino. Esses trabalhos têm culminado com a recomendação de estirpes rizobianas para culturas como o feijão e o feijão-caupi.

Os rizóbios nodulantes de feijão comum tem uma importante limitação para a utilização extensiva de inoculantes, a instabilidade genética dos isolados, culminando com a perda de plasmídeos e perda da capacidade de nodulação quando armazenadas por muito tempo e quando expostas a elevadas temperaturas no campo (HUNGRIA & VARGAS, 2000). A seleção de estirpes resistentes a elevadas temperaturas e com elevada estabilidade genética começou em 1991, como isolamento e caracterização de estirpes de leucena capazes de nodular e fixar grandes quantidades de nitrogênio em feijoeiro em condições de elevada temperatura. Esses experimentos de inoculação cruzada culminaram com a seleção da estirpe CIAT 899 de *R. tropici*, (MARTINÉZ-ROMERO et al., 1991) uma das estirpes atualmente recomendadas para a produção de inoculantes para a cultura do feijoeiro no Brasil.

Outro estudo realizado no Estado do Paraná utilizou o feijoeiro como planta isca para isolar rizóbios tolerantes a elevadas temperaturas e culminou no isolamento da estirpe PRF 81, de elevada eficiência, tolerância a elevadas temperaturas e capazes de nodular leucena, resultando em produtividade de mais de 900 kg/ha (HUNGRIA et al., 2000). Esta estirpe é recomendada para a produção de inoculantes para a cultura do feijoeiro no Brasil desde 1998.

O feijão-caupi tem três estirpes recomendadas para a produção de inoculantes no Brasil, duas delas, as estirpes INPA3-11B e UFLA 3-84 foram selecionadas em um vasto estudo de seleção, caracterização e avaliação da eficiência agrônômica de estirpes isoladas da região amazônica e do estado de Minas Gerais (LACERDA et al., 2004). A outra estirpe BR 3267 foi isolada caracterizada e avaliada por MARTINS et al. (2003) e realizados experimentos na região de sequeiro do semi-árido nordestino. Essa estirpe tem comprovada eficiência e desempenho quando inoculada ao feijão-caupi em condições de pluviosidade muito baixa e temperaturas muito elevadas, e sua recomendação definitiva para a produção de inoculantes ocorreu em 2006.

Considerações Finais

O sucesso da aplicação de inoculantes de bactérias diazotróficas no Brasil deve-se em grande parte a uma parceria entre a pesquisa e o melhoramento vegetal principalmente no caso da soja. Os fatores limitantes à nodulação e a seleção de estirpes mais eficientes e competitivas gera uma economia de mais de quatro milhões de dólares por ano pela substituição do fertilizante nitrogenado pelo inoculante rizobiano. Infelizmente este sucesso não se estendeu a outras leguminosas como o feijão. Hoje se preconiza a inoculação de feijão caupi para o semi-árido mas apenas uma industria comercializa este produto. Mesmo no caso da soja está ocorrendo uma redução na venda do produto ao agricultor que hoje verifica que a soja onde ele não aplicou o produto está nodulando com as estirpes nativas, que são competitivas e suprem o N fertilizante de graça para a cultura. Um esforço enorme será feito para continuar a sensibilizar o agricultor da necessidade de garantir o rizóbio para o novo plantio. Mas muito se tem a fazer para incorporar na cadeia produtiva de outras leguminosas importantes para o país a utilização de estirpes selecionadas de rizóbio. Neste ponto a pesquisa se faz necessária para recomendar novas estirpes eficientes, capazes de competir com a biota nativa e adaptada aos estresses ambientais e do solo.

Referências Bibliográficas

AARONS, S. R.; GRAHAM, P. H. Response of *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* to acidity. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 134, p. 145-151, 1991.

ALBINO, U. B.; SARIDAKIS, D. P.; FERREIRA, M. C.; HUNGRIA, M.; VINUESA, P.; ANDRADE, G. High diversity of diazotrophic bacteria associated with the carnivorous plant *Drosera villosa* var. *villosa* growing in oligotrophic habitats in Brazil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 287, p. 199-207, 2006.

ARAYANGKON, T.; SCHOMBERG, H. H.; WEAVER, R. W. Nodulation and N₂ fixation of guar at high root temperature. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 126, p. 209-213, 1990.

BALANCHADAR, D.; RAJA, P.; KUMAR, K.; SUNDARAN, S. P. Non-rhizobial nodulation in legumes. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, Oxford, v. 2, p. 49-57, 2007.

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

BORGES, W. L.; SANTOS, C. E. de R. S.; XAVIER, G. R.; RUMJANEK, N. G. Nodulação e fixação biológica de nitrogênio em acessos de amendoim co estirpes nativas de rizóbios **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 2, p. 32-37, 2007.

BURNS, R. C.; HARDY, R. W. I. **Nitrogen fixation in bacteria and higher plants**. New York: Springer-Verlag, 1975. 190 p. (Molecular Biology Biochemistry and Biophysics, 21).

CAPONE, D. G.; BURNS, J. A.; MICHAELS, A. F.; MONTOYA, J. P.; SUBRAMANIAM, A.; CARPENTER, E. J. Nitrogen fixation by *Trichodesmium* spp.: An important source of new nitrogen to the tropical and sub-tropical North Atlantic Ocean. **Global Biogeochemical Cycles**, Washington, v. 19, p. 1-17, 2005.

CASTRO, S.; PERMIGIANI, M.; VINOCUR, M.; FABRA, A. Nodulation in peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots in the presence of native and inoculated rhizobia strains. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 13, p. 39-49, 1999.

CHEN, W. -M.; LAEVENS, S.; LEE, T. -M.; COENYE, T.; VOS, P. de; MERGEAY, M.; VANDAMME, P. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of cystic fibrosis patient. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, p. 1729–1735, 2001.

CHEN, W. -M.; FARIA, S. M. de; STRALIOTTO, R.; PITARD, R. M.; SIMÕES-ARAÚJO, J. L.; CHOU, J. -H.; CHOU, Y. -J.; BARRIOS, E.; PRESCOTT, A. R.; ELLIOTT, G. N.; SPRENT, J. I.; YOUNG, P. W.; JAMES, E. K. Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel mimosa-nodulating strains from South America. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, p. 7461-7471, 2005.

CHENG, Y.; WATKIN, E. L. J.; O'HARA, G. W.; HOWIESON, J. G. *Medicago sativa* and *Medicago murex* differ in the nodulation response to soil acidity. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 238, p. 31-39, 2002.

DÖBEREINER, J. Biological nitrogen fixation in tropics: social and economic contributions. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 771–774, 1997.

FENG, L.; ROUGHLEY, R. J.; COPELAND, L. Morphological Changes of Rhizobia in Peat Cultures. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, p. 1064–1070, 2002.

FERREIRA, L. G. R.; MENDES FILHO, P. F.; ALBUQUERQUE, I. M. de. Fixação simbiótica em caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) em função do déficit hídrico. **Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 25, p. 16–23, 1994.

GOORMACHTIG, S.; CAPOEN, W.; JAMES, E. K.; HOLSTERS, M. Switch from intracellular to intercellular invasion during water stress-tolerant legume nodulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 101, p. 6303–6308, 2004.

HIRSCH, A. M.; LARUE, T. A. Is the legume nodule a modified root or stem or an organ sui generis? **Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v. 16, p. 361–392, 1997.

HIRSCH, A. M.; LUM, M. R.; DOWNIE, J. A. What makes the rhizobia–legume symbiosis so special? **Plant Physiology**, Rockville, v. 127, p. 1484–1492, 2001.

HUANG, B. O.; LU, C. Q.; WU, B.; FAN, L. Q. A rhizobia strain isolated from root nodule of gymnosperm *Podocarpus macrophyllus*. **Science in China**, Series C: Life Sciences, Beijing, v. 50, p. 1–6, 2007.

HUNGRIA, M.; ANDRADE, D. S.; CHUERIE, L. M. O.; PROBENZA, A.; GUTTIERREZ–MAÑERO, F. J.; MEGÍAS, M. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 32, p. 1515–1528, 2000.

HUNGRIA, M.; ARAÚJO, 1995 HUNGRIA, M.; ARAÚJO, 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. (Eds.). **Microbiologia do solo: desafios para o século XXI**. IAPAR/EMBRAPA CNPSo. Londrina. 1995. 476–489.

HUNGRIA, M.; BODDEY, L. H.; SANTOS, M. A.; VARGAS, M. A. T. Nitrogen fixation capacity and nodule occupancy by *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 27, p. 393–399, 1998.

HUNGRIA, M.; FRANCO, A. A. Effects of high temperature on nodulation and nitrogen fixation by *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 149, p. 95–102, 1993.

HUNGRIA, M.; STACEY, G. Molecular signals exchange between host plants and rhizobia: basic aspects and potential application in agriculture. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 519–530. 1997.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with emphasis on Brazil. **Field Crop Research**, v. 65, p. 151–164, 2000.

KEENEY, D.R. Nitrogen management for maximum efficiency and minimum pollution. In: STEVENSON, F. J. (Ed). **Nitrogen in Agricultural Soils**. Madison. ASA Special Publication n° 22, 1982.

KEYSER, H. H.; SOMASEGARAN, P.; BOHLOOL, B. B. Rhizobial ecology and technology. In: METTING Jr., F. B. (Ed.). **Soil Microbial Ecology**. New York: Dekker, 1997. p. 205–206.

KISHINEVSKY, B. D.; SEN, D.; WEAVER, R. W. Effect of high root temperature on *Bradyrhizobium*-peanut symbiosis. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 143, p. 275–282, 1992.

KOOPMAN, D.J.; TOW, P.G.; REEVES, T.G.; GIBSON, A.H. Soil acidification, chlorsulfuron application and *Rhizobium meliloti* as factors in lucerne yield decline. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, p. 673–677, 1995.

KRASOVA-WADE, T.; DIOUF, O.; NDOYE, I.; SALL, C. E.; BRACONNIER, S.; NEYRA, M. Water-condition effects on rhizobial competition for cowpea nodule occupancy. **African Journal of Biotechnology**, Kenya, v. 5, p. 1457-1463, 2006.

KREMER, K. J.; PETERSON, H. L. Nodulation efficiency of legume inoculation as determined by intrinsic antibiotic resistance. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 43, p. 636–642, 1982.

KULKARNI, S.; NAUTIYAL, C. S. Effects of salt and pH stress on temperature-tolerant *Rhizobium* sp. NBRI330 Nodulating *Prosopis juliflora*. **Current Microbiology**, New York, v. 40, p. 221-226, 2000.

LACERDA, A. M.; MOREIRA, F. M. S.; ANDRADE, M. J. B.; SOARES, A. L. L. Efeito de estirpes de rizóbio sobre a nodulação e produtividade do feijão caupi. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 51, p. 67-82, 2004.

LIE, T. A. Environmental physiology of the legume–*Rhizobium* symbiosis. In: BROUGHTON, W. J. (Ed.). **Nitrogen Fixation**. Oxford: Clarendon Press, 1981. p. 104-134.

LINDSTRÖM, K.; MYLLYNIEMI, H. Sensitivity of red clover rhizobia to soil acidity factors in pure culture and in symbiosis. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.98, p. 353-362, 1987.

LOWENDORF, H. S.; BAYA, A. M.; ALEXANDER, M. Survival of *Rhizobium* in acid soils **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 42, p. 951-957, 1981.

LUPWAYI, N. Z.; CLAYTON, G. W.; RICE, W. A. Rhizobial inoculants for legume crops. **Journal of Crop Improvement**, New York, v. 15, p. 289-321, 2005.

MARTÍNEZ, L.; CABALLERI-MELLADO, J.; OROZCO, J.; MARTINEZ-ROMERO, E. Diazotrophic bacteria associated with banana (*Musa* spp). **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 257, p. 35-47, 2003.

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

MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; RANGEL, F. W.; RIBEIRO, J. R. A.; NEVES, M. C. P.; MORGADO, L. B.; RUMJANEK, N. G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 38, p. 333-339, 2003.

McDERMOTT, T. R.; GRAHAM, P. H. *Bradyrhizobium japonicum* inoculant mobility, nodule occupancy, and acetylene reduction in the soybean root system. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 55, p. 2493-2498, 1989.

MERCANTE, F. M.; CUNHA, C. de O.; STRALIOTTO, R.; RIBEIRO JÚNIOR, W. Q.; VANDERLEYDEN, J.; FRANCO, A. A. *Leucaena leucocephala* as a trap – host for *Rhizobium tropici* strains from the brazilian “Cerrado” region. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 29, p. 49-58, 1998.

MICHIELS, J.; VERRETH, C.; VANDERLEYDEN, J. Effects of temperature stress on bean-nodulating *Rhizobium* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, p. 1206-1212, 1994.

MINASRI, B.; AOUANI, M. E.; MHAMDI, R. Nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris*) under water deficiency. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 39, p. 1744-1750, 2007.

MOAWAD, H.; BOHLOOL, B. B. Competition among *Rhizobium* spp. for nodulation of *Leucaena leucocephala* in two tropical soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 48, p. 5–9, 1984.

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

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

MORÓN, B.; SORIA-DÍAZ, M. E.; AUKT, J.; VEROLOS, G.; NOREEN, S.; RODRIGUEZ-NAVARRO, D. N.; GIL-SERRANO, A.; THOMAS-OATES, J.; MEGÍAS, M.; SOUSA, C. Low pH changes the profile of nodulation factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT 899. **Chemistry and Biology**, Cambridge, v. 12, p. 1029-1040, 2005.

MOULIN, L.; MUNIVE, A.; DREYFUS, B.; BOIVIN-MASSON, C. Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. **Nature**, London, v. 411, p. 948–950, 2001.

MREMA, A. F.; GRANHALL, U.; SENNERBY-FORSSE, L. Plant growth, leaf water potential, nitrogenase activity and nodule anatomy in *Leucaena leucocephala* as affected by water stress and nitrogen availability. *Trees-Structure and Function*, New York, v. 12, p. 42-48, 1997.

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

OLIVEIRA, L. A.; MAGALHÃES, H. P. de. Quantitative evaluation of acidity tolerance of root nodule bacteria. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 30, p. 203–208, 1999.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS JÚNIOR, A. F. Atividade enzimática de isolados de rizóbios nativos da Amazônia Central, Crescendo em diferentes níveis de acidez. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, p. 204-210, 2006.

ORCHARD, V. A.; COOK, F. G. Relation between soil respiration and soil moisture. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 15, p. 447–453, 1983.

PALANIAPPAN, S. P.; SUDHI SREEDHAR, P.; LOGANATHAN, P.; THOMAS, J. Competitiveness of native *Bradyrhizobium japonicum* strains in two different soil types. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 25, p. 279–284, 1997.

PERRET, X.; STAHELIN, C.; BROUGHTON, W.J. Molecular basis of symbiotic promiscuity. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 64, p. 180–201, 2000.

PERIN, L.; MARTINEZ-AGUILAR, L.; CASTRO-GONZALEZ, R.; ESTRADA-DE LOS SANTOS, P.; CABELLOS-AVELAR, T.; GUEDES, H. V.; REIS, V. M.; CABALLERO-MELLADO, J. Diazotrophic *Burkholderia* species associated with field-grown maize and sugarcane **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, p. 3103-3110, 2006.

POSTGATE, J.R. **Nitrogen Fixation**. 3 ed. Cambridge, Cambridge University Press, 1998. 122 p.

RAPOSEIRAS, R.; MARRIEL, I. E.; MUZZI, M. R. S.; PAIVA, E.; PEREIRA FILHO, I. A.; CARVALHAIS, L. C.; PASSOS, R. V. M.; PINTO, P. P.; SÁ, N. M. H. de. *Rhizobium* strains competitive ness on bean nodulation in cerrado soils. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 41, p. 439–447, 2006.

RÄSÄNEN, L. A.; SAIJETS, S.; JOKINEN, K.; LINDSTRÖM, K. Evaluation of the roles of two compatible solutes, glycine betaine and trehalose, for the *Acacia senegal*–*Sinorhizobium* symbiosis exposed to drought stress. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 260, p. 237–251, 2004.

REIS, V. M.; ESTRADA-DE-LOS-SANTOS, P.; SALGADO, S. T.; VOGEL, J. S.; GUYON, M.; MAVINGUI, P.; BALDANI, V. L. D.; SCHMID, M.; BALDANI, J. I.; BALANDREAU, J.; HARTMANN, A.; MELLADO, J. C. *Burkholderia tropica* sp. nov., a novel nitrogen-fixing, plant-associated bacterium. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 54, p. 2155-2162, 2004.

RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P. Fixação biológica de nitrogênio. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; SILVA, P. H. S.; VIANA, F. M. P. (Org.). **Feijão caupi: avanços tecnológicos**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p. 281-335.

SARR, A.; LESUEUR, D. Influence of soil fertility on the rhizobial competitive ness for nodulation of *Acacia senegal* and *Acacia nilotica* provenances in nursery and field conditions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 23, p. 705–711, 2007.

SHOUSHTARI, N. H.; PEPPER, L. L. Mesquite rhizobia isolated from the Sonoran desert: competitive ness and survival in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 17, p. 803–806, 1985.

SINGLETON, P. W.; TAVARES, T. W. Inoculation response of legumes in relation to the number and effectiveness of indigenous *Rhizobium* populations. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 51, p. 1013-1018, 1986.

SOUSSI, M.; SANTAMARÍA, M.; OCAÑA, A.; LLUCH, C. Effects of salinity on protein and lipopolysaccharide pattern in a salt-tolerant strain of *Mesorhizobium ciceri*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxon, v. 90, p. 476–481, 2001.

STREET, J. G. Effects of drought on nitrogen fixation in soybean root nodules. **Plant Cell and Environment**, Oxon, v. 26, p. 1199-1204, 2003.

STREIT, W.; BOTERO, L.; WERNER, D.; BECK, D. Competition for nodule occupancy on *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium etli* and *Rhizobium tropici* strains can be efficiently monitored in an ultisol during the early stages of growth using a constitutive *gus* gene fusion. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, p. 1075–1081, 1995.

STRALIOTTO, R.; TEIXEIRA, M. G.; MERCANTE, F. M. Fixação biológica de nitrogênio. In: AIDAR, H.; KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L. F. (Org.). **Produção do feijoeiro comum em várzeas tropicais**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2002. p. 123-153.

SVENNING, M. M.; GUDMUNDSSONT, J.; FAGERLI, I. L.; LEINONEN, P. Competition for nodule occupancy between introduced strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* and its influence on plant production. **Annals of Botany**, Oxford, v. 88, p. 781–787, 2001.

THIES, J. E.; SINGLETON, P. W.; BOHOOL, 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, 19–28, 1991.

TIRICHINE, L.; JAMES, E. K.; SANDAL, N.; STOUGAARD, J. Spontaneous root-nodule formation in the model legume *Lotus japonicus*: a novel class of mutants nodulates in the absence of rhizobia. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v. 19, p. 373–382, 2006.

TIRICHINE, L.; SANDAL, N.; MADSEN, L. H.; RADOTOIU, S.; ALBREKTSSEN, A. S.; SATO, S.; ASAMIZU, E.; TABATA, S.; STOUGAARD, J. A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. **Science**, Washington, v. 315, p. 104–107, 2007.

VARGAS, M. 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.; HUNGRIA, M. **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina, DF: EMBRAPA–CPAC, 1997. 524 p.

VESSEY, J. K.; PAWLOWSKI, K.; BERGMAN, B. Root-based N₂-fixing symbioses: Legumes, actinorhizal plants, *Parasponia* sp. and cycads. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 266, p. 205–230, 2004.

WATKIN, E. L. J.; O'HARA, G. W.; GLEEN, A. R. Calcium and acid stress interact to affect the growth of *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 1427-1432, 1997.

WATKIN, E. L. J.; O'HARA, G. W.; HOWIESON, J. G.; GLEEN, A. R. Identification of tolerance to soil acidity in inoculant of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 32, p. 1393-1403, 2000.

WILLEMS, A. The taxonomy of rhizobia: an overview. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 287, p. 3-14, 2006.

WOOD, M.; COOPER, J. E.; HOLDING, A. J. Soil acidity factors and nodulation of *Trifolium repens*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 78, p. 367-379, 1984.

WOOD, M.; COOPER, J. E.; BJOURSON, A. J. Response of lotus rhizobia to acidity and aluminium in liquid culture and in soil. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 107, p. 227-231, 1988.

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

Embrapa

Agrobiologia

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

