**DIVERSIDADE DE RIZÓBIOS NATIVOS DE SOLOS
DO ESTADO DE SÃO PAULO**

MARIA LUIZA COLOGNESI DE OLIVEIRA LOMBARDI
Engenheira Agrônoma

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA CARDOSO

**Tese apresentada à Escola Superior
de Agricultura "Luiz de Queiroz" ,
da Universidade de São Paulo, para
a obtenção do título de Doutor em
Agronomia, Área de Concentração:
Solos e Nutrição de Plantas.**

**PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Janeiro - 1995**

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCLQ/USP

L842d Lombardi, Maria Luiza Colognesi de Oliveira
Diversidade de rizóbios nativos de solos do Estado
de São Paulo. Piracicaba, 1994.
164p.

Tese - ESALQ
Bibliografia.

1. Bactéria fixadora de nitrogênio 2. Leguminosa -
Inoculação 3. Rizóbio - Diversidade 4. Solo - Microbio-
logia - São Paulo I. Escola Superior de Agricultura
Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 631.46
589.5

DIVERSIDADE DE RIZÓBIOS NATIVOS DE SOLOS DO ESTADO DE SÃO PAULO

MARIA LUIZA COLOGNESI DE OLIVEIRA LOMBARDI

Aprovada em 15.3.95

Comissão julgadora:

Dr ^a . Elke J.B.N. Cardoso	ESALQ/USP
Dr. Eli Sidney Lopes	IAC
Dr. Wanderley Dias da Silveira	IB/UNICAMP
Dr. Heitor Luiz Costa Coutinho	EMBRAPA/CNPMA
Dr. Jorge Kiehl	ESALQ/USP

Prof^a. Dr^a. Elke J.B.N. Cardoso
Orientadora

*Aos meus filhos Leonardo e
Fabrício, dedico.*

*Ao meu marido Francisco,
ofereço.*

AGRADECIMENTOS

À Dr^a Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso pela orientação, amizade e compreensão.

À Ana Maria Futino, da Seção de Técnica Experimental e Cálculo do Instituto Agronômico, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao meu marido Dr. Francisco Lombardi Neto pela valiosa ajuda, compreensão e carinho.

Aos Drs. Ricardo M. Coelho, Hélió do Prado, Emílio Sakai e Antonio Lúcio M. Martins do Instituto Agronômico de Campinas, pelo auxílio nas amostragens dos solos.

Ao Dr. Wanderley Dias da Silveira do Depto. de Microbiologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, pelo auxílio no emprego das técnicas eletroforéticas.

Ao Dr. Heitor L.C. Coutinho, da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia "André Tosello" pela liofilização das culturas.

Às colegas da Seção de Microbiologia do Solo, Dras. Adriana Parada Dias da Silveira e Sueli dos Santos Freitas, pela colaboração, sugestões e amizade.

Às funcionárias da Seção de Microbiologia do Solo, Maria Angelina S. Giarola, Rosana Gierts Gonçalves, Valéria Cristina Vieira e Maria Leonilde Machado de Souza, pela valiosa colaboração.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq. pelo auxílio no desenvolvimento da pesquisa.

A todos aqueles que colaboraram para a realização deste trabalho.

O JEHOVA

*Quam magnifica sunt Tua Opera !
Vir insipiens non cognoscit ea
& stultus non animadvertit ea.*

David

Salmo de David referenciado
por Carolus Linnaeus.
Systema Naturae, cap. Imperium Naturae, 1758

SUMÁRIO

Página

LISTA TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xiv
SUMMARY.....	xviii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Biologia e taxonomia dos rizóbios.....	4
2.2. Diversidade da população.....	6
2.3. Tolerância à acidez e ao alumínio.....	18
2.4. Tolerância a antibióticos.....	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1. Solos.....	32
3.2. Leguminosas utilizadas.....	35
3.4. Isolamentos.....	37
3.5. Testes de nodulação e especificidade hospedeira	39
3.6. Tolerância à acidez e ao alumínio.....	40
3.7. Tolerância a antibióticos.....	41
3.8. Testes sorológicos.....	43
3.9. Caracterização isoenzimática.....	45
3.10. Análises estatísticas.....	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.1. Ocorrência de rizóbios X características edáficas e climáticas dos locais estudados.....	48
4.2. Características morfológicas das colônias e fi- siológicas das culturas.....	54
4.3. Nodulação e especificidade hospedeira.....	57
4.4. Tolerância à acidez e ao alumínio	65
4.5. Resistência intrínseca a antibióticos.....	77
4.6. Perfis isoenzimáticos de alfa e beta-esterases.	90

4.7. Diversidade sorológica.....	108
4.8. Discussão Geral.....	116
5. CONCLUSÕES.....	132
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	133
APÊNDICES.....	158

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
1 Distribuição mensal e totais anuais de chuvas e temperaturas médias dos locais de amostragens dos solos .(médias de 1961 a 1990).	33
2 Características químicas dos solos utilizados..	33
3 Número de rizóbios/g de solo encontrado em três leguminosas cultivadas em amostras de solos provenientes de diferentes municípios de São Paulo.....	49
4 Número de nódulos por planta de crotalária, feijão e guandu nos diferentes solos.....	49
5 Isolados de <i>Rhizobium</i> spp e <i>Bradyrhizobium</i> spp. de solos de cinco locais do Estado de São Paulo.....	58
6 Nodulação ausente ou presente e peso de matéria seca de plantas de amendoim, crotalária feijão, guandu e leucena inoculados com <i>Rhizobium</i> sp. isolados de feijão.....	59
7 Nodulação ausente ou presente e peso de matéria seca de amendoim, crotalária, feijão e guandu,inoculados com <i>Bradyrhizobium</i> sp. isolado de crotalária.....	62
8 Nodulação ausente ou presente e peso de matéria seca de amendoim, crotalária, feijão e guandu, inoculados com <i>Bradyrhizobium</i> sp. isolados de guandu.....	63
9 Crescimento de <i>Bradyrhizobium</i> sp. isolado de crotalária, em meio ELMA a pH 6,8 e em meio KM a pH 6,8 e pH 4,5 contendo ou não doses de alumínio.....	66

10	Crescimento de <i>Rhizobium</i> sp isolado de feijão, em meio ELMA a pH 6,8, e em meio KM a pH 6,8 e a pH 4,5 contendo ou não doses crescentes de alumínio.....	67
11	Crescimento de rizóbios isolados de guandu, em meio ELMA a pH 6,8 e em meio KM a pH 6,8 e pH 4,5 contendo ou não doses crescentes de alumínio.....	68
12	Número e porcentagem de isolados tolerantes a acidez e a doses de alumínio, originados dos solos dos 5 locais.....	70
13	Número e porcentagem de isolados tolerantes a acidez e a doses de alumínio, provenientes das diferentes leguminosas.....	70
14	Concentrações de antibióticos que limitaram o crescimento de <i>Bradyrhizobium</i> sp. isolado de crotalária cultivada em solos provenientes de diferentes locais.....	79
15	Concentrações de antibióticos que limitaram o crescimento de <i>Rhizobium</i> sp. isolado de feijão cultivado em solos provenientes de diferentes locais.....	81
16	Concentrações de antibióticos que limitaram o crescimento de rizóbios isolados de guandu cultivado em solos provenientes de diferentes locais.....	82
17	Reações sorológicas entre antígenos preparados com isolados de crotalária e antissoros obtidos de estirpes de referência.....	109
18	Reações sorológicas entre antígenos preparados com isolados de feijão e antissoros obtidos de estirpes de referência.....	110
19	Reações sorológicas entre antígenos preparados com isolados de guandu e antissoros obtidos de estirpes de referência.....	111

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Dendrograma ilustrando os graus de similaridade entre isolados de crotalária, quanto à tolerância à acidez e ao alumínio.....	73
2	Dendrograma ilustrando os graus de similaridade entre isolados de feijão, quanto à tolerância à acidez e ao alumínio.....	74
3	Dendrograma ilustrando os graus de similaridade entre isolados de guandu, quanto à tolerância à acidez e ao alumínio.....	75
4	Dendrograma ilustrando os graus de similaridade entre isolados de crotalária, feijão e guandu, quanto à tolerância à acidez e ao alumínio.....	78
5	Dendrograma ilustrando os graus de similaridade entre isolados de crotalária quanto à tolerância a antibióticos.....	83
6	Dendrograma ilustrando os graus de similaridade entre isolados de feijão quanto à tolerância a antibióticos.....	85
7	Dendrograma ilustrando os graus de similaridade entre isolados de guandu quanto à tolerância a antibióticos.....	86

8	Dendrograma ilustrando os graus de similaridade entre isolados de crotalária, feijão e guandu quanto à tolerância aos antibióticos.....	87
9	Dendrograma ilustrando os graus de similaridade entre isolados de crotalária, feijão e guandu quanto à tolerância à acidez, alumínio e a antibiótico.....	88
10	Distância relativa entre bandas de alfa e beta-esterases de isolados de crotalária...	91
11	Distância relativa entre bandas de alfa e beta-esterases de isolados de feijão.....	92
12	Distância relativa entre bandas de alfa e beta-esterases de isolados de guandu.....	93
13	Dendrograma mostrando o relacionamento entre os isolados de crotalária quanto ao perfil de alfa-esterase.....	95
14	Dendrograma mostrando o relacionamento entre os isolados de crotalária quanto ao perfil de beta-esterase.....	98
15	Dendrograma mostrando o relacionamento entre os isolados de feijão quanto ao perfil de alfa-esterase.....	100
16	Dendrograma mostrando o relacionamento entre os isolados de feijão quanto ao perfil de beta-esterase.....	101

17	Dendrograma mostrando o relacionamento entre os isolados de guandu quanto ao perfil de alfa-esterase.....	102
18	Dendrograma mostrando o relacionamento entre os isolados de guandu quanto ao perfil de beta-esterase.....	103
19	Dendrograma ilustrando o relacionamento entre isolados de crotalária, feijão e guandu quanto aos perfis de alfa-esterase.....	105
20	Dendrograma ilustrando o relacionamento entre isolados de crotalária, feijão e guandu quanto aos perfis de beta-esterase.....	106
21	Dendrograma ilustrando o relacionamento entre isolados de crotalária, feijão e guandu quanto aos perfis de alfa e beta-esterases.....	107
22	Dendrograma ilustrando o relacionamento sorológico entre isolados de crotalária ...	113
23	Dendrograma ilustrando o relacionamento sorológico entre isolados de feijão	114
24	Dendrograma ilustrando o relacionamento sorológico entre isolados de guandu.....	115
25	Dendrograma ilustrando o relacionamento sorológico entre os isolados de crotalária, feijão e guandu.....	117

26	Dendrograma ilustrando o relacionamento entre os isolados da crotalária, quanto às cinco características estudadas.....	125
27	Dendrograma ilustrando o relacionamento entre os isolados do feijão, quanto às cinco características estudadas.....	126
28	Dendrograma ilustrando o relacionamento entre os isolados do guandu, quanto às cinco características estudadas.....	127
29	Dendrograma ilustrando o . relacionamento entre os isolados da crotalária, do feijão e do guandu, quanto às cinco características estudadas.....	128

DIVERSIDADE DE RIZÓBIOS NATIVOS DE SOLOS DO ESTADO DE SÃO PAULO

Autora: MARIA LUIZA COLOGNESI DE OLIVEIRA LOMBARDI

Orientadora: Prof^ª Dr^ª ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA CARDOSO

RESUMO

Isolados de *Rhizobia* e *Bradyrhizobia* originários de plantas de crotalária (*C. juncea*), feijão (*Phaseolus vulgaris*) e guandu (*Cajanus cajan*) cultivadas em solos de cinco locais do Estado de São Paulo, foram caracterizados quanto à tolerância à acidez, alumínio e antibióticos, diversidade sorológica, perfis enzimáticos de alfa e beta-esterases e especificidade hospedeira em crotalária, feijão guandu e amendoim. Relacionaram-se algumas características do microrganismo com características dos solos de origem.

Avaliou-se também a viabilidade dos testes utilizados para identificar os rizóbios em nódulos.

Os solos amostrados foram: podzólico vermelho-amarelo distrófico, sob pastagem (PVd); latossolo vermelho amarelo álico, sob cerrado (LVa); latossolo roxo eutrófico, sob cerradão (LRe); latossolo amarelo húmico álico, sob mata (LAa) e podzólico vermelho-amarelo distrófico, sob mata (PVd). As características químicas do solo de origem, principalmente o alumínio, influenciou o número de rizóbios em cada solo: observou-se o maior número de células no latossolo roxo eutrófico, sendo que nesse solo houve boa nodulação das três leguminosas. Observou-se o menor número de rizóbios no latossolo amarelo e álico sob mata onde somente o guandu apresentou poucos nódulos. No podzólico vermelho amarelo distrófico sob mata apenas o feijão e o guandu nodularam. No podzólico vermelho amarelo sob pastagem e no latossolo vermelho amarelo e álico sob cerrado, as três leguminosas nodularam. O feijão foi o que apresentou maior número de nódulos em todos os solos em que nodulou.

Quanto à especificidade hospedeira, a associação com o feijoeiro foi a mais específica, seguindo-se as do amendoim, da crotalária e do guandu, cuja planta foi a mais promíscua.

A maior incidência de isolados sensíveis ao alumínio se deu entre os provenientes da crotalária e menor entre os originados do guandu. Os isolados da crotalária foram em geral mais sensíveis aos antibióticos. Os isolados do feijão e do guandu foram os mais tolerantes à acidez, ao alumínio e aos antibióticos.

Os testes sorológicos mostraram a ocorrência de reações homólogas entre isolados e as 3 estirpes de referência, recomendadas para crotalária, feijão e guandu, em todos os solos.

A melhor diferenciação ocorreu com os perfis enzimáticos, principalmente quando se considerou a alfa e beta-esterases conjuntamente. Houve isolados idênticos entre si em cada leguminosa dentro de cada solo, não ocorrendo identidade enzimática entre isolados dos diferentes solos.

Os isolados da crotalária apresentaram morfologia de colônias, crescimento lento e produção de álcali em meio de cultura as quais são características típicas do gênero *Bradyrhizobium*. Os isolados de feijão apresentaram características típicas do gênero *Rhizobium* quanto à morfologia de colônias, produção de ácido em meio de cultura e crescimento rápido. Muitos dos isolados do guandu

apresentaram velocidade de crescimento e morfologia de colônias típicas do gênero *Rhizobium*, mas produziram álcali no meio de cultura, característica típica do gênero *Bradyrhizobium*.

Os testes de tolerância aos antibióticos nas doses testadas e os testes sorológicos não podem ser confiáveis na identificação de estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*.

DIVERSITY OF WILD RIZOBIA FROM SOILS OF SÃO PAULO STATE, BRAZIL.

Author:MARIA LUIZA COLOGNESI DE OLIVEIRA LOMBARDI

Adviser: Prof^ª Dr^ª ELKE JURANDY BRAN NOGUEIRA CARDOSO

SUMMARY

Isolates of *Rhizobia* and *Bradryrhizobia* originated from crotalaria (*Crotalaria juncea*), elderly beans (*Phaseolus vulgaris*) and pigeon pea (*Cajanus cajan*) cultivated in soils located in five sites of State of São Paulo, Brazil, were characterized for tolerance to soil acidity, to aluminum and to antibiotic, as well to, serological diversity, alfa and beta-esterases isoenzymes pattern and host specificity to crotalaria, elderly bean, pigeon pea and peanut. Some microorganism characteristics were tentatively related to characteristics of the soil from

each site. The viability of the tests for rhizobia identification was also evaluated.

The soils sampled were: Red-Yellow Podzolic dystrophic (Tropudult) under pasture; Red-Yellow Latosol, alic (Umbriortox) under savana; Dusky-Red Latosol eutrophic (Eutrortox) under savana; Humic Yellow Latosol alic (Umbriortox) under forest and Red-Yellow Podzolic dystrophic (Tropudult) under forest.

Chemical properties of the original soil, specially the aluminum concentration, influenced the number of *Rhizobia* in each soil: it was observed the greatest number of cells in the Dusky-Red Latosol, and there was a good nodulation for the three legume plants in this soil. It was also observed the lowest number of rhizobia in the Humic Yellow Latosol under forest, where only the pigeon pea showed few nodules. In the Red-Yellow Podzolic dystrophic under forest, only the elderly beans and pigeon pea plants nodulated. The three legumes nodulated in the Red Yellow Podzolic under pasture and in the Red-Yellow Latosol, under savana. The elderly beans, among all legumes, presented the greatest number of nodules in all of the soils studied.

In respect to the host specificity, the association with the elderly beans was the most specific, following those with peanuts, crotalaria and pigeon pea.

The gratest incidences of isolates sensitive to aluminum were observed among those obtained from crotalaria and the lowest among the isolates from pigeon pea. Crotalaria isolates were in general more sensitive to the antibiotics. Elderly beans and pigeon pea isolates were the most tolerant to soil acidity, aluminum and antibiotics

Serological tests showed the occurrence of serogroups of the isolates of three legumes in all soils.

The best differentiation occurred with the esterase isoenzyme specially when the alfa and beta-esterases were considered together. There were identical isolates for each legume and for each soil, but no enzymatic identity occurred among isolates of different soils.

Crotalaria isolates showed colony morphology, slow growth and alcali productions, in liquid medium, typical characteristics of *Bradyrhizobium*. Elderly beans isolates showed colony morphology, fast growth and acid production in liquid medium, typical characteristics of *Rhizobium*. Many of pigeon pea isolates showed growth velocity and colony morphology of *Rhizobium*, but produced alcali in liquid medium a typical characteristics of *Bradyrhizobium*.

The test for antibiotic tolerance and the serological test showed low reability to indentify *Rhizobia* and *Bradyrhizobia* isolates.

1. INTRODUÇÃO

Leguminosas tropicais podem encontrar-se bem noduladas no campo por rizóbios nativos, com os quais estabelecem uma simbiose aparentemente eficaz em termos de fixação do nitrogênio. Isso denota ausência de especificidade hospedeira ou uma comunidade heterogênea desses microrganismos nos solos.

Esse fato dificulta o estudo de seleção de isolados em campo, impedindo em muitos casos de se concluir sobre a necessidade da inoculação em leguminosas tropicais. Isolados de rizóbios que apresentam alta eficiência em fixar N_2 em teste de seleção em condições controladas, nem sempre mostram o mesmo desempenho no campo. Isso porque rizóbios autóctones podem ser tão eficientes e mais competitivos do que os introduzidos. Embora não se conheçam claramente os fatores que determinam a competitividade, supõe-se que uma população já adaptada às condições do meio tenha maior oportunidade de formar nódulos e sobreviver no solo.

As comunidades nativas de rizóbios têm sido pouco avaliadas em relação a características como tolerância a condições adversas do meio, bem como a diversidade dessas

comunidades. Aparentemente a associação entre rizóbios e leguminosas tropicais é bastante promíscua e, em alguns trabalhos os pesquisadores demonstram falta de resposta de leguminosas tropicais à inoculação com estirpes selecionadas. Entretanto, a maioria dos estudos de seleção de estirpes tem sido feita em áreas já cultivadas, onde o manejo da cultura pode alterar as comunidades originais, uma vez que o meio seleciona os organismos, tornando-os mais adaptados às novas condições. Daí a necessidade de se avaliar a comunidade em local que se aproxime da melhor maneira das condições originais.

Neste trabalho pretendeu-se avaliar a especificidade hospedeira, tolerância a acidez, à concentração de alumínio e a antibióticos, os perfis isoenzimáticos de alfa e beta-esterases e a diversidade sorológica de rizóbios nativos de solos virgens sob diversos tipos de vegetação natural ou implementada há longo tempo. Pretendeu-se também avaliar a viabilidade do emprego de testes como a tolerância a antibióticos e a sorologia na identificação de rizóbios.

Partiu-se da premissa de que algumas características, como a tolerância à acidez e ao alumínio, possam estar relacionadas às condições do solo de origem. Sendo assim, rizóbios provindos de solos ácidos seriam mais tolerantes à acidez. Por outro lado, a acidez desfavorece a ocorrência de actinomicetos produtores de antibióticos, o que leva a supor

que rizóbios que vivam em solo ácido e que convivam com uma população baixa ou inexistente desses microrganismos, sejam mais suscetíveis aos antibióticos. A especificidade hospedeira em leguminosas além da de origem também foi avaliada, na tentativa de contribuir para um melhor conhecimento da diversidade dos rizóbios tropicais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Biologia e taxonomia dos rizóbios

Rizóbios são bactérias em forma de bastonetes, Gram negativas, flageladas, não fotossintéticas que se associam com plantas da família *Leguminosae* formando em suas raízes ou caule pequenas estruturas denominadas nódulos onde ocorre a fixação biológica do nitrogênio atmosférico.

A primeira classificação (FRED et al, 1932) considerou a especificidade hospedeira da associação como o único critério para compor as 6 espécies num único gênero, *Rhizobium*.

A classificação atual proposta por JORDAN (1984), reuniu as espécies em dois gêneros onde a velocidade do crescimento em meio de cultura contendo extrato de levedura como fonte de nitrogênio e fatores de crescimento e manitol como fonte de carbono juntamente com a especificidade hospedeira, foram os principais critérios adotados.

Assim no gênero *Rhizobium* estão as espécies que se associam no geral, com leguminosas de clima temperado,

apresentam crescimento rápido em meio com extrato de levedura (tempo de geração < 6h) e produzem catabólitos ácidos. Em geral, são mais sensíveis à tetraciclina e estreptomicina e à acidez e alumínio do meio e produzem grande quantidade de polissacarídeos. O gênero *Rhizobium* abrange as espécies *R. leguminosarum* e os biovares *trifolii* (trevos), *phaseoli* (feijão) e *viciae* (ervilha, vagens), *R. meliloti* (alfafa), *R. loti* (*Lotus*, *Cicer*, *Leucaena*).

O gênero *Bradyrhizobium* agrupa espécies de crescimento lento (tempo de geração > 6 h) onde se inclui o *Bradyrhizobium japonicum* (soja), *B. elkanii* (soja) e *Bradyrhizobium* spp., antigo "grupo cowpea".

Até o presente a família *Rhizobiaceae* conta com mais as seguintes espécies:

Rhizobium fredii (SCHOLLA & ELKAN, 1984): nodula a soja

Azorhizobium caulinodans (DREYFUS, et al., 1988): nodula raízes e caule de sesbânia (*S. rostrata*).

Sinorhizobium fredii e *S. xinjiangensis* (CHEN et al., 1988): nodulam soja (*G. max*). Esta nomenclatura ainda não está aceita pelo comitê de taxonomia.

Rhizobium tropici (MARTÍNEZ-ROMERO et al, 1991): nodula o feijão e a leucena.

Rhizobium galegae (LINDSTROM, 1989): forma nódulos em *Galega orientalis*.

Rhizobium huakuii (CHEN et al, 1991): nodula *Astragalus sinicus*.

Bradyrhizobium elkanii (KUYKENDALL et al., 1992): nodula a soja.

Rhizobium etli (SEGOVIA et al, 1993): nodula o feijão.

Atualmente as metodologias que caracterizam a estrutura genética da bactéria são indispensáveis para sua adequada classificação taxonômica. Embora a família *Leguminosae* seja a terceira maior família de plantas, com aproximadamente 19 000 espécies, calcula-se que menos que 15% dos representantes têm sido avaliados quanto à simbiose com rizóbios e o potencial de fixação do nitrogênio. Portanto, levantamentos feitos em ecossistemas naturais têm o potencial de isolar bactérias com configurações genéticas ainda não descritas.

2.2. Diversidade da população

A inoculação com estirpes selecionadas de rizóbios é feita com o objetivo de suprir as necessidades das leguminosas em nitrogênio, diminuindo ou eliminando a dependência dessas culturas em fertilizantes nitrogenados.

No entanto, a viabilidade e o sucesso da inoculação com estirpes exóticas estão diretamente relacionadas com a presença das comunidades naturais dos rizóbios dos solos. Estes podem ser tão eficientes quanto a estirpe introduzida ou mais competitivos e já adaptados às condições do meio.

No Brasil muitos trabalhos têm sido conduzidos com a finalidade de selecionar estirpes de *Rhizobium* spp. e *Bradyrhizobium* spp. visando a aumentar a fixação do nitrogênio nas leguminosas, entre as quais a soja e o feijão têm merecido destaque em relação a outras leguminosas, (VARGAS & SUHET, 1981; VARGAS et al., 1991; PERES et al., 1993 e TSAI et al., 1993)). A soja e outras leguminosas não nativas quando recém-introduzidas num local, respondem bem à inoculação por não encontrarem rizóbios nativos nos solos, que poderiam competir por sítios de infecção nas raízes. Já as leguminosas tropicais apresentam-se bem noduladas pela população nativa aparentemente eficiente em fixar nitrogênio.

LOPES et al. (1972), verificaram que rizóbios nativos formaram associação eficiente com soja perene em 4 grande grupos de solos do Estado de São Paulo. Em amendoim a falta de resposta à inoculação com estirpes selecionadas está associada à presença de uma comunidade nativa com diferentes graus de eficiência na fixação do nitrogênio, altamente adaptada às condições do meio e capaz de induzir boa

nodulação (LOPES et al., 1976; GIARDINI et al., 1985 & LOMBARDI et al., 1992).

Os trabalhos realizados com leguminosas utilizadas como adubos verdes mostram maior preocupação com a produção de matéria seca e aos benefícios que essas culturas trazem à fertilidade do solo, às culturas subsequentes, ao controle de plantas invasoras, redução da população de nematóides e dos efeitos da erosão, melhorando as condições físicas, químicas e biológicas do solo (MIYASAKA et al., 1966; RESCK et al., 1982; MUZZILLI et al., 1983 e FRANCO & SOUTO, 1984.). Quanto à fixação simbiótica do N_2 sabe-se que a comunidade nativa dos rizóbios pode suprir as necessidades da planta. No entanto, num estudo sobre adubação de seis leguminosas para adubos verdes não houve diferenças significativas da inoculação com estirpes de *Rhizobium* recomendadas e houve resposta à adubação nitrogenada (CHADA & DE-POLLI, 1988). Mais recentemente, RODRIGUES et al, (1994) não encontraram respostas à inoculação de mucuna preta e feijão-de-porco. Não foi feita caracterização das estirpes em nenhum desses dois trabalhos, mas a resposta à adição do N mineral no trabalho de CHADA & DE-POLLI (1988) indica que tanto as estirpes inoculadas quanto a comunidade nativa não foram eficientes para satisfazer a necessidade das plantas em nitrogênio. Indicam também, que a comunidade nativa é pouco estudada quanto a diversas características, além da eficiência em

fixar nitrogênio. Em alguns casos a resposta obtida pode ser devido a falta de manejo adequado da cultura, como por exemplo deficiência em algum micronutriente essencial, o que impede a expressão do potencial genético dos rizóbios (VIEIRA, 1994).

No passado, a eficiência em fixar nitrogênio era o principal critério empregado na seleção de estirpes, sem considerar características da população nativa com maiores detalhes. Atualmente, além da capacidade fixadora do N_2 , outros atributos da estirpe selecionada e o conhecimento da população nativa têm merecido atenção dos microbiologistas.

A caracterização de rizóbios nativos oferece elementos adicionais, além de sua eficiência simbiótica as quais contribuem para o conhecimento da diversidade desses microrganismos em nossos solos. O conhecimento de técnicas que permitam distinguir as diferentes bactérias e o estudo do manejo do sistema rizóbio-leguminosa são de importância fundamental. Há de se considerar que algumas características intrínsecas da bactéria, como a tolerância a antibióticos e a outros fatores adversos do meio, podem melhorar o desempenho de estirpes em determinadas situações. Também os novos gêneros e espécies descritos atualmente resultam de uma série de trabalhos que se iniciaram com as características fenotípicas dos rizóbios e levaram os pesquisadores a

caracterizar geneticamente os isolados mais expressivos obtidos de uma dada comunidade (ELKAN, 1992).

SINGLETON & TAVARES (1986) observaram que a falta de resposta à inoculação nem sempre está relacionada com a eficiência de fixação do nitrogênio da população nativa. Para esses autores, a quantidade de células presentes também influencia a resposta, pois verificaram que onde a comunidade nativa correspondia a mais de 20 rizóbios por grama de solo, as estirpes introduzidas não conseguiram competir por sítios de infecção nas raízes. A comunidade estudada apresentava isolados com diferentes graus de eficiência na fixação do nitrogênio. Os resultados obtidos por THIES et al (1991 e 1992) com diversas leguminosas e em solos de diferentes locais do Havaí confirmaram que o número de rizóbios nativos é um fator importante que afeta a resposta da planta à inoculação com estirpes selecionadas, embora outros fatores ambientais e a ocorrência de leguminosas promíscuas capazes de nodularem com rizóbios autóctones também influencie o desempenho das estirpes selecionadas.

A magnitude de resposta de feijão caupí (*Vigna unguiculata* (L) Walp), à inoculação com três estirpes de *Bradyrhizobium* sp., em três solos com diferentes texturas e índices de pH, variou com o tipo de solo. Essas estirpes formaram maior número de nódulos que a população nativa que nodulou essa leguminosa. A maior resposta foi observada num

solo de textura média com pH 5,1 e que continha maior número de rizóbios nativos. Foi menor no solo mais arenoso, mais ácido e com menor número de rizóbios autóctones. (DANSO & OWIREDU, 1988).

Nota-se que existem muitas controvérsias na literatura e os resultados mostrados nos trabalhos permitem especular que a capacidade competitiva da estirpe a ser introduzida é um dos fatores importantes a ser considerado, não se conhecendo exatamente as características da estirpe que a tornam mais competitivas.

As comunidades de rizóbios variam consideravelmente de um solo para outro. Muitos trabalhos mostram que a ocorrência natural de leguminosas promíscuas quanto à nodulação contribuem para haver maior número de rizóbios na área. Também o histórico de cultivo com determinada leguminosa seleciona o rizóbio nativo a ela homólogo.

TROTMAN & WEAVER (1986) observaram que o número de *Bradyrhizobium* sp. de *Vigna unguiculata* (L.) Walp estava relacionado com o cultivo da planta, pois a referida leguminosa apresentou nodulação baixa onde nunca tinha sido cultivada. Também a população de rizóbios de grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) foi mais baixa onde este não tinha histórico de cultivo e foi influenciada pelo tipo de solo, sendo menor num solo arenoso e pouco fértil (RUPELA et al, 1987). Resultados semelhantes foram obtidos por THURMAN &

BROMFIELD (1988) num trabalho sobre a composição e dinâmica da comunidade de *Rhizobium meliloti* em espécies de *Medicago* e *Melilotus* em três tipos de solos. Espécies dos gêneros *Acacia*, *Leucaena* e *Robinia* nodularam bem onde essas leguminosas compunham a vegetação natural. Não foi observada nodulação na *Leucaena* onde esta não ocorria naturalmente ou não tinha sido cultivada (TURK et al, 1993).

Existem evidências de que em solos não cultivados as comunidades de rizóbios autóctones embora heterogêneas, estão em equilíbrio (LEUNG, et al., 1994).

É de supor que fatores edáficos e climáticos também possam condicionar as comunidades de rizóbios. Como pode ser observado nos trabalhos de RUPELA et al. (1987) e DANSO & OWIREDU (1988), tanto a população nativa como a resposta da leguminosa à inoculação foram influenciados pelas condições do solo. Temperatura, pluviosidade, pH e retenção de fósforo foram os fatores que influenciaram a população de rizóbios nativos em solos de 14 locais do Havaí, capazes de nodularem trevo, alfafa, feijão-vagem, leucena e siratro. Em todos os locais examinados houve predominância de *Bradyrhizobium* sp. (WOOMER et al, 1988)). Além da presença do hospedeiro, YOUSEF et al (1987) verificaram que a comunidade nativa dos rizóbios capazes de nodularem o amendoim foi influenciada por algumas características de solos do Iraque, como o teor de matéria

orgânica, condutividade elétrica, valores de pH, teor de cálcio e capacidade de troca de cátions.

Em estudos que propõe determinar a diversidade das comunidades ou mesmo a competitividade entre estirpes, é fundamental o conhecimento de características que permitem diferenciar isolados.

A caracterização dos isolados tem sido tradicionalmente feita por técnicas sorológicas, resistência intrínseca a antibióticos, perfil de proteínas, enzimas e polissacarídeos, morfologia de colônias, características simbióticas e tolerância a condições adversas do meio. Atualmente utilizam-se técnicas mais sensíveis que analisam DNA como RFLP, PCR, hibridização do DNA e outras (MARTÍNEZ-ROMERO, 1994) e que, além de oferecer uma visualização mais precisa da diversidade, são fundamentais para a classificação taxonômica. A escolha de uma determinada técnica depende muito do objetivo do trabalho e das facilidades do laboratório.

A célula bacteriana possui em sua composição proteínas e polissacarídeos com propriedades antigênicas, isto é, induzem a formação de anticorpos quando injetada em um animal. A reação que ocorre entre os anticorpos presentes no soro do sangue do animal e o antígeno que lhe deu origem é altamente específica e constitui-se a base para as técnicas sorológicas. Devido a esse fato a sorologia tem sido

frequentemente utilizada para identificação de rizóbios. Isolados de uma população que apresentam a mesma reação antígeno-anticorpo, pertencem a um sorogrupo e podem ser considerados semelhantes (VINCENT, 1970; SOMASEGARAN & HOBEN, 1985).

As metodologias baseadas em princípios sorológicos como aglutinação, imunodifusão e imunofluorescência são empregadas nem sempre com sucesso na caracterização de rizóbios para o conhecimento da diversidade da população (LAWRIE, 1983; KINGSLEY & BOHLOOL, 1983; DEMEZAS & BÔTOMLEY, 1984; EAGLESHAM et al, 1984, CHAN et al, 1988; BROCKMAN & BEZDICEK, 1989 & THIES et al, 1992).

A capacidade de competir com a comunidade natural do solo é um dos requisitos exigidos para uma estirpe ser recomendada para produção de inoculantes. Em trabalhos que objetivam a seleção de estirpes é indispensável o conhecimento da competitividade em diversas condições. A avaliação dessa propriedade dos rizóbios também tem sido feita frequentemente por testes sorológicos: antissoros produzidos com estirpes selecionadas são testados com antígenos obtidos a partir de nódulos formados em condições de campo (MOAWAD & BOHLOOL, 1984; DANSO & OWIREDU, 1988; BEATTIE et al., 1989; ABAIDOO et al., 1990; TRINICK & HADOBAS, 1990 & THIES et al, 1992).

A heterogeneidade dos constituintes proteicos, polissacarídicos e enzimáticos da célula, determinada por

eletroforese em gel de poliacrilamida, permite maior discriminação entre isolados, detectando diferenças entre estirpes pertencentes ao mesmo sorogrupo. Essas técnicas também tem sido empregadas com sucesso, para estudos sobre diversidade, dinâmica da população e comparação entre isolados de uma mesma espécie e entre diferentes espécies (NOEL & BRILL. 1980; FUQUAY et al, 1984, KAMICKER & BRILL, 1986, ARAUJO et al, 1994).

O perfil de isoenzimas como esterases e fosfatases apresenta confiabilidade para diferenciar isolados de rizóbios em vida livre e em bacteróides e mesmo diferenciar variantes de uma mesma estirpe (MOUSTAFA & GREENWOOD, 1967; MYTTON et al, 1978, SELANDER et al, 1986 & ANDREANI, 1993).

Embora cada método tenha sua utilidade para um determinado propósito, a utilização de mais de uma técnica tem sido recomendada, pois KINGSLEY & BOHLOOL (1983) observaram que isolados de *Rhizobium* sp. (*Cicer arietinum* L.) que diferiram por testes sorológicos, apresentaram o mesmo padrão de tolerância a antibióticos. Também CHAN et al (1988) utilizando o teste de aglutinação sorológica, resistência intrínseca a antibióticos e perfil de plasmídeos, para diferenciar isolados de rizóbios de *Astragalus sinicus* observaram maiores diferenças entre isolados pelo teste sorológico.

A nodulação no hospedeiro tem se mostrado característica útil para o estudo da diversidade da população. A identificação de isolados que fogem do padrão de nodulação da leguminosa, juntamente com características sorológicas e genéticas da bactéria, vem contribuindo para o aparecimento de novos gêneros e espécies na família *Rhizobiaceae*.

Até 1982 acreditava-se que a soja nodulava exclusivamente com *Bradyrhizobium japonicum*. Keyser et al (1982) isolaram estirpes de crescimento rápido, de nódulos de soja coletados na China, os quais foram descritos como uma nova espécie, *Rhizobium fredii*, incluída no gênero *Rhizobium* por apresentar maior semelhança sorológica com rizóbios de crescimento rápido do que com o *B. japonicum*. CHAMBER & IRUTHAYATHAS (1988) sugerem que o *R. fredii* ocupa uma posição intermediária entre o *Rhizobium* sp. e o *Bradyrhizobium* sp., pois além da soja, o *R. fredii* formou associação eficiente com plantas convencionalmente noduladas por *Bradyrhizobium*, como o feijão caupi (*Vigna unguiculata*), feijão mungo (*Vigna radiata*) e com feijão comum que nodula com rizóbios de crescimento rápido. Analisando o *Rhizobium fredii* por técnicas genéticas e sorológicas, CHEN et al (1988) propuseram o gênero *Sinorhizobium* onde incluem-se as espécies *S. fredii* e *S. xinjiangensis*.

A literatura mostra que muitas leguminosas associam-se a rizóbios de crescimento lento e rápido como é o caso de

Lab-lab purpureus (TRINICK, 1980), algumas espécies de *Acacia* (DREYFUS & DOMMERGUES, 1981), *Cajanus cajan* e *Cicer arietinum* (BROMFIELD & KUMAR RAO, 1983) e *Lotus* (PANKHURST, 1977 e WOOD et al, 1988).

Por meio de nodulação cruzada, observou-se que o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) nodula eficientemente com rizóbios isolados de *Leucaena*. Esses dados deram início aos estudos genéticos que levaram à divisão de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* em dois grupos: grupo I onde permaneceu o *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* nodula só o feijão e difere geneticamente daqueles que nodulam o feijão e a *leucena*, hoje classificados como *Rhizobium tropici* (grupo II) (MARTÍNEZ-ROMERO et al, 1991). HUNGRIA et al (1993) observaram nodulação eficiente do feijoeiro por rizóbios isolados de *Gliricidia*, *Lonchocarpus* e *Leucaena*, os quais conseguiram nodular e fixar eficientemente o nitrogênio no feijoeiro exposto a uma temperatura de 40⁰C por 8 horas. Os rizóbios pertencentes ao grupo II apresentam duas importantes características que devem ser consideradas em testes de seleção de estirpes em nossas condições de solo e clima. Os *R. tropici* são tolerantes a acidez do solo e a altas temperaturas.

CHEN et al., (1988) caracterizaram várias estirpes de *Bradyrhizobium* sp., isoladas de *Astragalus sinicus* L. CHEN et al. (1991), trabalhando também com *A. sinicus*, isolaram dos

nódulos dessa leguminosa, um rizóbio que apresentava características relacionadas mais ao gênero *Rhizobium*, mas tinha algumas semelhanças com o gênero *Bradyrhizobium*. A esses rizóbios foi proposta a classificação no gênero *Rhizobium* sendo a espécie típica o *R. huakuii*.

2.3. Tolerância à acidez e ao alumínio

A acidez do solo, natural ou provocada, compromete grande parte dos solos com potencial para a agricultura devido ao próprio efeito dos íons H^+ sobre as plantas e os microrganismos, mas principalmente pela liberação de formas tóxicas do alumínio quando os valores do pH diminuem (GILLMAN, 1991; GLENN & DILWORTH, 1991).

O efeito prejudicial da acidez do solo sobre a fixação do nitrogênio foi notado desde que a importância desse processo vem sendo reconhecida na agricultura (BRYAN, 1923).

Atualmente muitos trabalhos têm enfatizado o impacto da acidez do solo e dos fatores a ela associados sobre os rizóbios e, conseqüentemente, sobre o estabelecimento da associação e a fixação do nitrogênio.

Rizóbios são no geral habitantes normais do solo tanto em regiões tropicais como temperadas. A presença e a sobrevivência desses microrganismos é bastante influenciada

pela acidez do solo, sendo que solos ácidos podem abrigar população baixa ou mesmo ausente de certas espécies de rizóbios, como mostram trabalhos realizados por BRYAN (1923), RICE et al. (1977), LOWENDORF et al. (1981) e COVENTRY et al. (1985).

O estabelecimento da associação compreende várias etapas que se iniciam com a colonização da rizosfera e o reconhecimento entre o rizóbio e a planta hospedeira (SCHMIDT, 1979). Em leguminosas de clima temperado segue-se o encurvamento dos pelos radiculares, formação do cordão infectivo e formação dos nódulos (DAZZO, et al., 1984 e BHUVANESVARI & SOLHEIN, 1985). Algumas leguminosas de clima tropical, da tribo *Aeschynomeneae*, onde o representante típico é o amendoim, a formação do nódulo se dá por meio de uma lesão de onde emergem as raízes laterais, não havendo portanto, o cordão infectivo (SPRENT, 1994). Em qualquer dos casos a fase inicial é a mais importante, pois nela os rizóbios se multiplicam e colonizam a rizosfera da planta.

Sendo assim, muitos trabalhos têm sustentado a hipótese de que a acidez e o alumínio desempenham importante papel na colonização da rizosfera por afetar a divisão celular dos rizóbios, diminuindo ou impedindo a multiplicação das células na fase exponencial.

KEYSER & MUNNS, (1979a, 1979b) e MUNNS & KEYSER (1981) observaram em *Bradyrhizobium* spp. que a adição de 50 μ M de

alumínio ao meio de cultura aumentou o tempo para iniciar a divisão celular, sendo que em alguns casos esta iniciou e não se completou. Houve uma duplicação no comprimento das células expostas ao alumínio em cultura sincrônica e diminuição da divisão celular. Também WOOD & COOPER (1988a, 1988b) e WHELAN & ALEXANDER (1986) observaram diminuição do número de células em meio de cultura devido à adição de alumínio na concentração de 50 μM .

JOHNSON & WOOD (1990) levantaram a hipótese de que o sítio de atuação do alumínio pode ser o DNA. Nesse caso, o alumínio positivamente carregado se ligaria às cargas negativas do fosfato da hélice do DNA, aumentando sua estabilidade e impedindo sua replicação. Estirpes tolerantes também alojariam o Al no DNA, mas teriam um mecanismo que permite sua replicação e a célula continuaria o processo de divisão.

Além do efeito direto do alumínio, que parece ser o mais importante, pode ocorrer um efeito indireto na disponibilidade de fosfato para a célula (KEYSER & MUNNS, 1979b, CASSMAN, 1981).

O cálcio é importante para os rizóbios, possivelmente estabilizando os lipopolissacarídeos da parede celular (O'HARA et al., 1988).

Efluxo de cálcio e potássio citoplasmático foi observado em células de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* sensíveis

à acidez e expostas a baixo pH e pode ser um dos possíveis efeitos da acidez sobre os rizóbios, mas precisa ser melhor esclarecido (AARONS & GRAHAM, 1991). Esse fato pode ter fundamento nas evidências de que estirpes de *Rhizobium meliloti* sensíveis a acidez requerem quantidades de cálcio mais altas em relação a estirpes tolerantes (O'HARA et al., 1989; HOWIESON et al., 1992). Observações feitas por REEVE et al. (1993) reforçam os resultados de O'HARA et al. (1989) AARONS & GRAHAM (1991) e HOWIESON et al. (1992), pois observaram que em pH próximo à neutralidade o cálcio não exercia efeito sobre o crescimento de estirpes de *Rhizobium meliloti*. Quando o pH do meio diminuiu, o aumento da concentração do cálcio estimulou o crescimento das estirpes.

O mecanismo que leva uma estirpe a ser sensível ou tolerante à acidez continua a ser obscuro. O'HARA et al. (1989), trabalhando com estirpes de *Rhizobium meliloti* sensíveis e tolerantes à acidez observaram que as tolerantes conseguiram manter as condições intracelulares mesmo quando o pH externo era baixo, o que não ocorria com as sensíveis.

O conceito de NORRIS (1965) de que catabólitos ácidos ou alcalinos do meio teriam a função de proteger as células contra a alcalinidade ou acidez do meio, deixou de ser considerado após os trabalhos que comprovaram estar a natureza do catabólito relacionada com a fonte de carbono

utilizada (ZABLOTOWICZ & FOCHT, 1981; HERNANDEZ & FOCHT, 1984).

O fato é que com todos os efeitos prejudiciais da acidez e do alumínio existem diferenças no comportamento de estirpes de rizóbios quando expostas a esses fatores.

Também não se pode afirmar que uma estirpe tolerante à acidez seja tolerante ao alumínio, pois a tolerância a essas condições de estresse varia entre estirpes das diversas espécies e dentro de uma mesma espécie de rizóbio (KEYSER & MUNNS, 1979a e 1979b; LOWENDORF et al., 1981; GRAHAM et al., 1982; AYANABA et al. e 1983 & THORNTON & DAVEY, 1983).

A generalização de que as espécies do gênero *Bradyrhizobium* sp. são mais tolerantes à acidez e ao alumínio não deve ser considerada, pois diferenças entre estirpes desse gênero quanto à tolerância já foram encontradas (MUNNS & KEYSER, 1981; AYANABA et al., 1983).

A hipótese de que as condições do solo de origem da estirpe podem influenciar a tolerância à acidez e ao alumínio, já foi aventada. Existem também trabalhos que mostram que o melhor desempenho de estirpes inoculadas em condições de campo e em solo ácido com alumínio, não foi atribuído às estirpes selecionadas para tolerarem essas condições de estresse (THORNTON & DAVEY, 1983).

DATE & HALLIDAY (1979), trabalhando com rizóbios isolados de nódulos de várias espécies de estilozantes cultivadas em

um solo ácido e um alcalino, obtiveram melhor crescimento em meio de cultura ácido, das estirpes provenientes do solo ácido. LINDSTROM & MYLLYNIEMI (1987) sugerem que o pH do solo de origem pode ser utilizado para prever o desempenho de estirpes, pois em solo ácido os melhores resultados da fixação do N_2 por *Rhizobium trifolii* em trevo foram devidos à estirpe originada do solo mais ácido. Também no trevo houve melhor colonização da rizosfera em solo ácido pelas estirpes originadas de solos ácidos, sendo que as sensíveis só colonizaram bem e nodularam bem no segundo ano (GEMELL & ROUGHLEY, 1993). No entanto WOOD & COOPER (1984) e WOOD & SHEPHERD (1987) não confirmaram tais conclusões, pois houve variação na tolerância de estirpes originadas de solos cujos valores de pH variaram entre 3,6 a 5,6. Também RICHARDSON & SIMPSON (1989) não notaram correlação entre a tolerância a acidez de estirpes provenientes de solo que tinha ou não recebido calagem .

Sendo o problema complexo e onde muitos outros fatores estão envolvidos, os pesquisadores têm buscado selecionar estirpes que além de possuir atributos fundamentais para o estabelecimento de uma associação eficiente, sejam também capazes de tolerar condições adversas do meio como a acidez e aos fatores a ela associados.

Se por um lado a calagem pode atenuar as condições de estresse e aumentar o número de rizóbios no solo (COVENTRY et

al., 1985) e favorecer a nodulação (RAI, 1991 e HODGE, 1991) a seleção de estirpes considerando a tolerância à acidez e ao alumínio tem demonstrado ser uma alternativa adequada, principalmente em locais onde a calagem não é economicamente praticável.

A importância da seleção de estirpes tolerantes a baixos valores de pH e teores de Al^{3+} , foi claramente demonstrada por WOOD et al. (1988) em lotus, por TAYLOR et al. (1991) em soja; por HARTEL & BOUTON (1991) em alfafa e por WRIGHT & ZETO (1991) em trevo. Em todos esses trabalhos as estirpes selecionadas quanto à tolerância à acidez e alumínio foram superiores na nodulação, fixação de nitrogênio e propiciaram maiores quantidades de matéria seca.

Em nossas condições, apesar da ocorrência de solos ácidos em áreas de cultivo, poucos trabalhos têm procurado verificar o comportamento de estirpes de rizóbios diante desse fatores de estresse.

A acidez em dois solos do Rio Grande do Sul provocou o declínio na população de duas estirpes de *Rhizobium phaseoli* devido à baixa multiplicação das células (LOVATO et al., 1985). Em testes para avaliar a tolerância à acidez e ao alumínio 155 isolados de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* provenientes de 31 amostras de solos coletados em região de cultivo do feijoeiro, VARGAS et al. (1992) encontraram 111 isolados tolerantes a pH 4,5 e 77 toleraram

esse valor de pH em presença de 100 uM de alumínio. No entanto, não há informação sobre o desempenho dessas estirpes em condições de campo.

2.4. Tolerância a antibióticos

As relações antagônicas existentes entre microrganismos no solo podem estar relacionadas à produção de substâncias tóxicas pelos próprios, onde se incluem os antibióticos .

Antibióticos podem ser definidos como substâncias elaboradas por microrganismos ou plantas, capazes de agir em pequenas concentrações.

A ação de um antibiótico pode se dar por inibição da síntese de proteínas, da síntese da parede celular, da síntese de ácidos nucleicos ou em processos oxidativos da célula (LACAZ, 1969).

É difícil quantificar os antibióticos no solo o que pode levar à suposição que as quantidades existentes não ocorram a ponto de prejudicar o desenvolvimento de determinados grupos de microrganismos .

No entanto, estudos realizados por PRAMER & STARKEY, 1962; SOULIDES et al. (1961 e 1962); e SOULIDES (1965 e 1969) demonstraram que as quantidades de antibióticos no solo podem ser subestimadas, pois esses compostos estão sujeitos à

adsorção por argilas. A falta de um extrator adequado também contribui para dificultar a determinação das quantidades dos antibióticos, segundo os autores acima mencionados .

Existem evidências de que a calagem estimula a ocorrência de microrganismos produtores de antibióticos (SCOTTI et al., 1982 e BALDANI et al., 1982) aumentando as quantidades desses produtos no solo. Nesse caso passam a predominar microrganismos tolerantes em detrimento dos mais sensíveis aos antibióticos.

Muitos microrganismos têm se mostrado antagônicos aos rizóbios no solo, sendo que muitos foram produtores de antibióticos (VAN SCHREVEN, 1964; DAMIRGI & JOHNSON, 1966; CHATEL & PARKER 1968 e PATEL, 1974).

A tolerância natural a antibióticos ou resistência intrínseca (RIA) ou espontânea é uma característica do microrganismo que lhe confere a capacidade de sobreviver em condições onde um ou mais antibióticos estão presentes.

A origem da tolerância às drogas pode ser explicada pela teoria genética e pela teoria da adaptação fenotípica. De acordo com a teoria genética a mutação de uma célula sensível em resistente ocorre espontaneamente numa população de células sensíveis. Espera-se nesse caso que as bactérias resistentes apareçam mesmo em ausência da droga, ocorrendo em número pequeno. Sendo uma característica genética é hereditária, é portanto estável em várias gerações. Também o

fator genético que confere a resistência pode ser transferido de uma para outra célula. Já pela teoria da adaptação fenotípica podem ocorrer alterações na célula que surgem como resposta a um estímulo fornecido pelo antibiótico e que favorecem o crescimento das células em presença do mesmo. Esse tipo de alteração é induzida, não se dá no material genético da célula, podem ocorrer em um grande número de células e não têm obrigatoriamente caráter hereditário (GURGEL & AZEVEDO, 1969).

A resistência a antibióticos, natural ou induzida, é muito utilizada em rizobiologia com muitas finalidades, sendo obtida inoculando-se estirpes em meio de cultura acrescido de diferentes doses de antibióticos que segundo BUSHBY (1981) consiste em um modo preciso e confiável de avaliação.

A marcação de estirpes quanto à tolerância a antibióticos se mostra como uma ferramenta útil para identificar rizóbios em nódulos. A mutação induzida com a finalidade de se obter estirpes tolerantes a elevadas doses de antibiótico foi bastante discutida, mas deve ser examinada cuidadosamente, uma vez que pode provocar perdas na eficiência em fixar nitrogênio, na infectividade ou mesmo na competitividade. (SCHWINGHAMER, 1964; SCHWINGHAMER & DUDMAN, 1973; PANKHURST, 1977; HAGEDORN, 1979 e BROMFIELD & JONES, 1979).

A resistência intrínseca ou natural, comparada à induzida, apresenta a vantagem de não alterar características

importantes dos rizóbios envolvidos na fixação do N_2 , sendo registrados poucos casos de alteração na competitividade. (RYNNE et al., 1991).

O método é apontado como útil na identificação de isolados em nódulos e em estudos de ecologia, como mostram trabalhos de LABANDERA & VINCENT (1975); BUSHBY (1981); AMARGER & LOBREAU (1982); KREMER & PETERSON (1982); KINGSLEY & BOHLOOL (1983); TURCO et al. (1986); GUPTA et al. (1989) e SHISHIDO & PEPER (1990).

Em estudos sobre comunidades nativas de rizóbios nos quais a resistência intrínseca foi avaliada juntamente com outras características, houve boa correlação desta com propriedades sorológicas (JENKINS & BOTTOMLEY, 1985).

Rizóbios resistentes a antibióticos têm a vantagem de persistir, colonizar e sobreviver no solo. Estirpes comerciais de *Bradyrhizobium japonicum* não formaram nódulos na soja, num solo de cerrado que havia recebido calagem. A pesquisa demonstrou que essas estirpes eram sensíveis a estreptomicina e resolveu-se o problema com a utilização de estirpes tolerantes a 80 e 150 ug de estreptomicina/ml (SCOTTI et al., 1982).

A turfa é o veículo mais utilizado na produção de inoculantes. Embora a esterilização da turfa seja recomendada, é pouco praticada em nossas condições. A presença de actinomicetos e protozoários em turfa não

esterilizada foi detectada por FONSECA et al. (1985) e as estirpes resistentes à estreptomicina empregadas nesse inoculante sobreviveram por mais tempo, em relação às sensíveis.

LI & ALEXANDER, (1988 e 1990) obtiveram aumentos significativos na nodulação e produção da alfafa e da soja inoculadas conjuntamente com estirpes de rizóbios tolerantes a antibióticos e linhagens de *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp. e *Streptomyces gryseus*, produtoras desses compostos. Os autores sugerem que os antibióticos produzidos não afetariam os rizóbios tolerantes, mas inibiriam a presença de outros microrganismos antagônicos, propiciando condições para melhor nodulação e fixação do nitrogênio.

Embora o emprego de estirpes resistentes a antibióticos para inoculação de leguminosas, seja muito útil, o conhecimento do grau de resistência da população indígena não deve ser desprezado. Também a ocorrência de rizóbios nativos com o mesmo padrão de resistência não desqualifica o método.

Num estudo de competitividade, onde quatro estirpes de *R. leguminosarum* bv. *trifolii* foram inoculadas individualmente no trevo em campo, três estirpes distinguiram-se da população nativa (Mc LOUGHLIN, 1984), sendo que apenas uma apresentou o mesmo padrão de resistência.

A maneira pela qual os rizóbios do solo adquirem resistência à antibióticos ainda é uma questão obscura. Num artigo de revisão, EAGLESHAM (1987) cita trabalhos onde sugere que a resistência pode ser induzida devido ao uso de pesticidas, poluição com metais pesados e adubações químicas, que podem agir como agentes mutagênicos.

A hipótese de que a presença do antibiótico num solo que propicie condições favoráveis ao desenvolvimento de microrganismos produtores, pode conferir resistência ao rizóbio é pouco discutida, mas presumível. Se solos com níveis de pH próximos à neutralidade favorecem a presença de microrganismos produtores de antibióticos, supõe-se que rizóbios que vivem nessas condições sejam mais tolerantes. Contrariamente, o solo ácido pode abrigar populações mais sensíveis. Esse fato foi demonstrado por RAMOS et al. (1987) que obtiveram isolados mais resistentes de nódulos de feijão cultivado em solo com calagem do que os obtidos no solo sem calagem. VARGAS et al. (1992), testando 123 isolados de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* de solos de várias procedências e índices de pH no Estado de São Paulo observaram que a maior porcentagem de isolados sensíveis era originada de solos mais ácidos e as tolerantes, de solos com índices de pH próximos à neutralidade. Para tal hipótese também existem controvérsias pois, num experimento com *Bradyrhizobium* spp. isolados de várias leguminosas tropicais, observou-se

resistência a doses elevadas de antibióticos e essa não se correlacionou com o pH dos solos de origem (ROUGHLEY et al., 1992).

Num estudo sobre diversidade de populações utilizando-se da resistência intrínseca a antibióticos, de isolados de *Bradyrhizobium* spp., SINCLAIR & EAGLESHAM (1984) relacionaram a tolerância com produção de goma, sendo as colônias do tipo úmido mais tolerantes que as do tipo seco. Já ROUGHLEY et al. (1992) não notaram tal correlação, pois entre as colônias examinadas observaram tolerância a antibióticos tanto nas do tipo seco como nas do tipo úmido .

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram efetuados diversos testes na casa de vegetação e no laboratório da Seção de Microbiologia do Solo do Instituto Agronômico de Campinas.

Na tabela 1 estão apresentadas as médias mensais e os totais anuais de precipitação pluvial e de temperatura, referentes ao período de 1961 - 1990.

3.1. Solos

As unidades de solos estudadas foram:

- 3.1.1. Latossolo roxo (LR), epieutrófico, textura argilosa sob cerradão, do município de Morro Agudo, (SP). (PRADO, 1993).
- 3.1.2. Latossolo vermelho-amarelo (LVa), distrófico, álico, textura média, sob cerrado, do município de Campinas, (SP). (OLIVEIRA et al., 1979).
- 3.1.3. Podzólico vermelho-amarelo (PVd) Tb, distrófico, A fraco, textura arenosa/média, há 10 anos sob

Tabela 1 Distribuição mensal e totais anuais de chuvas e temperaturas médias dos locais de amostragens dos solos. Médias de 1961 a 1990.⁽¹⁾

MBS	CAMPINAS		ANHENBÍ		PINDORAMA		PARIQUEIRA-AÇU		MORRO AGUDO	
	TEMP	PPT	TEMP	PPT	TEMP	PPT	TEMP	PPT	TEMP	PPT
	°C	mm	°C	mm	°C	mm	°C	mm	°C	mm
JAN	23,0	240,2	24,8	211,0	24,1	252,0	24,5	210,3	24,0	286,0
FEB	23,3	190,9	25,0	151,0	24,1	207,0	24,8	199,3	24,0	215,0
MAR	22,9	147,3	34,4	127,0	23,8	168,3	23,9	219,4	23,7	179,0
ABR	21,0	71,0	22,1	63,0	22,3	70,1	21,6	108,8	22,0	90,0
MAI	18,7	65,1	19,8	67,0	20,1	59,4	19,4	97,1	19,8	55,0
JUN	17,3	48,7	18,4	55,0	18,9	30,1	17,6	78,9	18,8	31,0
JUL	17,3	36,8	18,2	37,0	18,8	24,6	17,2	68,5	18,7	25,0
AGO	18,9	37,4	20,0	35,0	20,8	28,0	17,7	55,3	20,7	28,0
SET	20,3	65,6	21,4	70,0	22,4	58,0	18,3	92,0	22,5	69,0
OUT	21,3	123,6	22,5	129,0	23,4	116,3	20,1	116,9	23,3	161,0
NOV	22,1	137,5	23,4	113,0	23,9	141,1	22,0	118,4	23,4	204,0
DEZ	22,5	217,1	24,1	186,0	23,8	235,3	23,4	156,0	23,6	275,0
TOTAL	20,7	1381,2	22,0	1244,0	22,2	1390,2	20,9	1520,9	22,0	1618,0

(1) TEMP : temperatura ; PPT: precipitação

Tabela 2. Características químicas dos Solos Utilizados¹

Local	SOLO	pH ⁽²⁾	M.O. %	P ug/cm ³	K ⁺	$\frac{1}{2}$ Ca ⁺⁺	$\frac{1}{2}$ Mg ⁺⁺	H+ $\frac{1}{2}$ AL ⁺⁺⁺	S	T	γ %
Morro Agudo	LR	5,4	6,0	75	6,6	68	28	4,3	10,26	14,60	70
Campinas	LV	3,9	3,3	2	0,9	1	1	9,9	0,29	10,20	3
Anhembi	PV	5,0	1,6	5	4,3	12	5	2,5	2,13	4,63	46
Pariquera-Açu	LA	3,3	4,4	12	1,8	4	3	20,5	0,88	21,40	4
Pindorama	PV	4,6	2,7	8	3,5	19	8	3,2	3,05	6,30	48

* pH - Ca Cl₂.

pastagem de grama batatais (*Paspalum notatum*), do município de Anhembi¹ (SP).

- 3.1.4. Latossolo amarelo (LAd), distrófico, álico, textura argilosa, sob mata, do município de Pariquera-Açu (SP). (SAKAI & LEPSCH, 1984).
- 3.1.5. Podzólico vermelho-amarelo (PV) distrófico, textura fino-arenosa no horizonte A, sob mata, do município de Pindorama (SP) anteriormente classificado como Podzolizado var. Marília, por LEPSCH & VALADARES, 1976.

As amostras de solo foram retiradas dos 20cm superficiais, sendo compostas de vinte sub-amostras tomadas a uma distância de aproximadamente 15m uma da outra. As sub-amostras foram peneiradas, misturadas e bem homogeneizadas. As propriedades químicas das amostras estão na tabela 2. Para a retirada das amostras, todo o material utilizado como enxada, enxadão e pá foram flambados, para evitar problemas de contaminação.

¹ Coelho, R.M. (Instituto Agronômico, Seção de Pedologia, Campinas) Comunicação Pessoal, 1992.

3.2. Leguminosas utilizadas

Utilizaram-se três leguminosas nativas comumente noduladas pela população natural:

3.2.1. Crotalária (*Crotalaria juncea*, L.), cv.IAC-1.2

Gênero tropical e sub-tropical, extenso. Praticamente todos os países tropicais possuem espécies nativas. A *Crotalaria juncea* é planta anual, ereta, arbustiva, sendo recomendada para recuperação de solos arenosos de baixa fertilidade e como planta fibrosa (WHYTE et al, 1955 e WUTKE, 1993). O sistema fixa até 280 kg de N/ha. ano. (SIQUEIRA & FRANCO, 1988).

3.2.2. Feijão comum (*Phaseolus vulgaris*, L.), cv. IAC-

carioca. Gênero originário da América, sendo constituído de plantas arbustivas, de ciclo anual ou perene. Constitui-se de importante fonte de proteína e ferro, sendo tradicional na alimentação do povo brasileiro. (ZIMMERMMANN et al, 1988). A associação fixa até 110 kg de N/ha.ano. (SIQUEIRA & FRANCO, 1988).

3.2.3. Guandu (*Cajanus cajan*, L.), cv. IAC-fava larga.

Gênero nativo dos trópicos (WHYTE 1955). Planta semi-perene, arbustiva, ereta, sistema radicular profundo. Possui múltiplos usos: alimentação, adubação verde e recuperação de áreas degradadas. (WUTKE et al, 1993). A associação fixa até 280 kg de N/ha.ano. (SIQUEIRA & FRANCO, 1988).

3.3. Número de rizóbios nos solos.

Com o objetivo de estimar o número de rizóbios para cada planta e em cada solo, fez-se contagem pelo método da diluição do solo e inoculação em plantas (número mais provável - NMP).

Os experimentos foram conduzidos em copos plásticos com capacidade para 300 ml, lavados com água destilada e desinfestados com hipoclorito de sódio comercial, em solução contendo uma parte de hipoclorito e duas partes de água. O substrato constou de areia de rio lavada, tratada com ácido clorídrico comercial a 5% e lavada em água corrente. Após secagem a areia foi esterilizada em autoclave por 1h 30min.

Antes do plantio, as sementes da crotalária foram esterilizadas com ácido sulfúrico concentrado, por 3 minutos e em seguida lavadas com água destilada e esterilizada. As sementes do feijão e do guandu foram esterilizadas com

solução de hipoclorito de sódio (1:2) por 5 minutos e lavadas com água esterilizada. Plantaram-se 3 sementes por copo. Após germinação procedeu-se ao desbaste para uma planta por copo.

Extratos de solos foram diluídos conforme metodologia descrita por SOMASEGARAN & HOBEN (1985), utilizando-se o fator 4 para as diluições. Fizeram-se quatro repetições de cada diluição, com as quais inocularam-se as plantas.

Semanalmente as plantas receberam solução nutritiva isenta de nitrogênio (NORRIS, 1965) e esterilizada, e foram mantidas sob condições controladas, em câmara de crescimento. Aos 40 dias da inoculação, procedeu-se à colheita para avaliar a nodulação.

3.4. Isolamentos

Os isolamentos tiveram por objetivo a obtenção das culturas dos rizóbios a partir de nódulos de cada leguminosa cultivada em cada solo.

Cultivaram-se a crotalária, o feijão e o guandu em copos plásticos de 500ml, com uma mistura de duas partes de areia e uma parte da amostra do solo. As amostras dos solos homogeneizadas foram utilizadas sem adubação ou calagem. A desinfecção dos copos, o preparo da areia e a esterilização das sementes foram feitas conforme descrito no item 3.3.

Plantaram-se seis sementes de cada leguminosa/copo e após germinação desbastaram-se para duas plantas. Copos contendo somente areia esterilizada foram preparados para cada planta, com o objetivo de controlar a assepsia. Foram feitas cinco repetições tanto dos copos para o isolamento como dos copos controles.

Semanalmente as plantas receberam solução nutritiva de NORRIS (1965), sem nitrogênio e esterilizada. Quando necessário procedeu-se a irrigação com água esterilizada.

Aos quarenta dias do plantio fez-se a colheita para retirada e contagens dos nódulos.

Os nódulos das cinco repetições foram misturados e seis nódulos, tomados ao acaso para os isolamentos.

Após desinfecção em solução de bicloreto de mercúrio (Hg Cl_2) a 0,1% e lavagens sucessivas em água esterilizada, os nódulos foram colocados em tubos de ensaio contendo 1ml de água esterilizada e macerados. Em seguida, inocularam-se as suspensões de células em placas de Petri contendo meio de NORRIS & DATE (1976).

O meio de NORRIS & DATE (1976) foi utilizado para cultivo e manutenção das culturas. Contém extrato de levedura, manitol e sais minerais (meio ELMA). Para placas utilizou-se o vermelho Congo como corante. Quando líquido utilizou-se o azul de bromotimol como indicador da reação produzida no

meio. Características de coloração e reação em meio de cultura são feitas com base no crescimento nesses meios.

As colônias crescidas nas placas foram purificadas, liofilizadas e mantidas em tubo com meio ELMA + vaselina e armazenadas na geladeira a 4⁰C, para serem submetidas aos outros testes.

3.5. Teste de nodulação e especificidade hospedeira

Teve como objetivo autenticar as culturas como rizóbios, inoculando cada um dos isolados na leguminosa de origem e também verificar o grau de especificidade hospedeira por meio da inoculação dos isolados nas outras três leguminosas. Neste teste, além da crotalária, feijão e guandu, incluiu-se o amendoim (*Arachis hypogaea* L.) que também é nativo e apresenta-se freqüentemente nodulado pela população autóctone. Os isolados de feijão foram inoculados também na *Leucaena leucocephala* para verificar se pertencem à espécie *R. tropici*.

Esses experimentos foram conduzidos em vasos de Leonard com areia e solução nutritiva de NORRIS (1965), sem nitrogênio, e esterilizados, em autoclave a 121⁰C, 1atm por 1h 30min., conforme metodologia de VINCENT (1970).

Quatro sementes, esterilizadas conforme descrito no item 3.3., foram plantadas por vaso. Após germinação e desbaste para uma planta/vaso, inocularam-se 2ml da suspensão de células dos isolados contendo aproximadamente 10^9 céls./ml. Neste teste foram feitos controles sem e com nitrogênio e sem inoculação. O nitrogênio foi adicionado como solução de $\text{NH}_4 \text{ NO}_3$ 0,18M de N, sendo adicionados 10ml semanalmente. Foram feitas três repetições por vaso, mantidas de maneira inteiramente casualizada.

Procedeu-se a colheita 40 dias após a inoculação. Observou-se a presença ou ausência de nódulos nas raízes. Separou-se a parte aérea, para secagem e obtenção de massa de matéria seca. Para cada isolado calculou-se a eficiência relativa, conforme fórmula:

$$ER = \frac{\text{matéria seca das plantas inoculadas}}{\text{matéria seca das plantas com N}} \times 100$$

3.6. Tolerância à acidez e ao alumínio

Teve por objetivo observar o crescimento das culturas em meio ácido contendo quantidades crescentes de alumínio.

Transferiram-se 100 µl de suspensão de células dos isolados para placas de Petri contendo meio ELMA utilizadas

como testemunhas, e em placas com meio de KEYSER & MUNNS (1979). O pH do meio ELMA foi ajustado para 6,8 e o pH do meio de KEYSER & MUNNS (1979) ajustado para pH 6,8 e para pH 4,5.

Culturas crescidas em meio com pH 4,5 foram testadas no mesmo meio acrescido de doses de 50, 75 e 100 μ M de alumínio. Este foi preparado com solução de $AlCl_3$ esterilizada por filtração em filtro 0,45 μ m e adicionado ao meio agarificado a 47⁰C, nas doses correspondentes. Foram feitas três repetições por isolado.

Avaliou-se a tolerância à acidez e ao alumínio, comparando-se o crescimento dos isolados no meio ELMA, e no meio de KEYSER & MUNNS (1979a) com pH 4,5 sem e com alumínio.

3.7. Tolerância a antibióticos

Os antibióticos utilizados e respectivos modos de ação estão descritos a seguir (LACAZ, 1969).

Estreptomicina - produzida por *Streptomyces griseus*. Age principalmente em microrganismos Gram negativos, inibindo a síntese de proteínas.

Espectinomicina - produzida por *Streptomyces* sp. Age em microrganismos Gram negativos, inibindo a síntese proteica.

Cloranfenicol - produzido por *Streptomyces venezuelae*, largo espectro de ação agindo em microrganismos Gram negativos e Gram positivos, inibindo a síntese de proteínas.

Eritromicina - produzido por *Streptomyces erythreus*, age principalmente em microrganismos Gram positivos, mas pode também inibir a síntese protéica dos Gram negativos.

Kanamicina - produzida por *Streptomyces kanamyceticus*, age em microrganismos Gram negativos e Gram positivos, inibindo a síntese protéica e afetando a permeabilidade da parede celular .

Tetraciclina - produzida por diversas espécies de *Streptomyces*. Age em microrganismos Gram positivos e Gram negativos, como inibidor da síntese protéica.

Neomicina - produzida por *Streptomyces fradiae*, age principalmente em microrganismos Gram negativos. Inibe a síntese protéica e afeta a permeabilidade da parede celular.

Testaram-se os antibióticos sob concentrações de 40, 100, 150 e 200 mg/l. As doses foram preparadas em solução estoque, esterilizadas por filtração em membrana de 0,45 µm e adicionadas ao meio ELMA agarificado esterilizado e resfriado a 47⁰C (SOMASEGARAN & HOBEN, 1985).

Transferiu-se 20 µl de suspensão de células de cada isolado para as placas contendo meio de cultura mais os antibióticos. Transferiram-se também as suspensões para placas com meio sem antibióticos, como testemunhas. Para cada isolado fez-se três repetições.

Avaliou-se a tolerância, comparando-se o crescimento das culturas nos meios das placas testemunhas com o das placas contendo os antibióticos.

3.8. Testes sorológicos

Utilizou-se da técnica da soroaglutinação (VINCENT, 1970), para observar a diversidade antigênica dos isolados .

A técnica consiste em reagir antígenos preparados com culturas puras dos isolados, com antissoros produzidos por estirpes de referência. Os antígenos, tanto dos isolados como das estirpes de referência, foram preparados cultivando-se as culturas em meio de Bergersen, descrito em SOMASEGARAN & HOBEN (1985). Após centrifugação, as culturas foram

ressuspensas em solução salina (NaCl 0,85%) e novamente centrifugadas. Repetiu-se a lavagem das células com solução salina, por três vezes. Ressuspenderam-se as células em solução salina de maneira a obter-se uma densidade ótica correspondente ao tubo nº. 3 da escala de Mc Farland, que estima uma concentração de 10^9 células/ml. Procedeu-se à fervura da solução a 100^0C por 30min. para eliminação dos antígenos flagelares. Obtiveram-se os antissoros por injeções das estirpes de referência em coelhos. Seguiu-se o esquema de injeções proposto por SCHMIDT et al. (1968), o qual consiste numa série de injeções por via endovenosa, distribuídas da seguinte maneira:

- 1⁰. dia - 0,5 ml de suspensão de células
- 2⁰. dia - 1,0 ml de suspensão de células
- 3⁰. dia - 1,5 ml de suspensão de células
- 4⁰. , 5⁰. e 6⁰. dias - repouso
- 7⁰. dia - 1,0 ml de suspensão de células
- 8⁰. dia - 2,0 ml de suspensão de células
- 9⁰. dia - 2,0 ml de suspensão de células

Após 15 dias procedeu-se a sangria e o antissoro foi separado do sangue e centrifugado para retirada das hemáceas. Aos antissoros adicionaram-se na proporção de 1:1, glicerol, como conservante e crioprotetor. A reação de aglutinação se fez pela mistura em partes iguais dos antissoros e dos antígenos.

Prepararam-se os antissoros por injeções das seguintes estirpes, tomadas como referência por serem recomendadas para produção de inoculantes (IPAGRO-MIRCEN, 1991):

- SEMIA-6145= SMS-633= BR-2801, *Bradyrhizobium* sp., origem do Brasil, recomendada para crotalária.

- SEMIA-4077= SMS-731= CIAT-899, *Rhizobium tropici*, origem da Colômbia, recomendada para feijão .

- SEMIA-6157= SMS-634= BR-2001, origem do Brasil, recomendada para guandu.

Antígenos preparados a partir de cada isolado foram testados com cada um dos antissoros. Foram feitas três repetições para cada isolado por antissoro.

3.9.Caracterização isoenzimática

Os isolados foram cultivados em meio ELMA líquido. Após centrifugação, lavagem com solução tampão TEMM (tris, EDTA, anidrido maleico e $MgCl_2$, pH 8.1) (SELANDER et al., 1986), centrifugação e ressuspensão em 200 microlitros de TEMM, os isolados foram armazenados em "freezer". Procedeu-se a seguir

à ruptura das células por meio da retirada do "freezer" até descongelamento e volta ao "freezer" até congelamento . Essa operação foi repetida por 15 vezes. As culturas foram mantidas no "freezer".

Preparou-se gel de poliacrilamida onde foram feitas cavidades para colocação das amostras. Utilizaram-se as estirpes de referência descritas no item 3.8. como padrões para os perfís isoenzimáticos. Submeteu-se o gel a uma corrente de 100 volts e, 10 mA por um período de 16 horas. Utilizou-se como substrato para a coloração do gel para a reação de alfa e beta-esterase, o alfa-naftil-acetato e o beta-naftil-acetato, respectivamente, diluídos em solução tampão fosfato pH 6,5, contendo fast-blue RR e acetona.

A diferenciação entre padrão e isolados e de isolados entre si foi feita pela medida da distância percorrida do ponto de adição da amostra do gel ao final da corrida, comparada com a distância percorrida pelo azul de bromofenol, adicionado às cavidades das extremidades.

3.10. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram utilizadas para comparar a eficiência relativa dos isolados.

As médias da ER de cada isolado foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, após análise da variância do delineamento inteiramente casualizado.

Para observar a semelhança dos isolados quanto à tolerância à acidez, ao alumínio, antibióticos e perfis sorológicos, fez-se a análise de agrupamentos. Utilizou-se o coeficiente de Jaccard (BUSSAB et al., 1990) o qual fornece a matriz de similaridade entre os isolados. Uma vez obtidas as matrizes, os isolados foram agrupados pelo método da média das distâncias e foram plotados num programa FITOPAC 2¹.

Já para os resultados dos perfis isoenzimáticos, utilizou-se a distância euclidiana simples, que fornece o grau de dessemelhança entre isolados (BUSSAB et al, 1990). Os isolados foram agrupados pelo método da média das distâncias e plotados no programa FITOPAC 2¹.

¹ Shepherd, G. (Depto. de Botânica, Instituto de Biologia, UNICAMP), comunicação pessoal.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ocorrência de rizóbios x características edáficas e climáticas dos locais estudados.

O número de rizóbios nos cinco solos estudados foi baixo (tabela 3), mas está dentro dos limites citados na literatura: alguns trabalhos mostram dados que variam de zero a $5,7 \times 10^4$ /g de solo para *Bradyrhizobium* sp. e de zero a 10^4 para outros rizóbios (SINGLETON & TAVARES, 1986 e WOOMER et al., 1988).

As condições climáticas dos locais estudados foram semelhantes entre si (Tabela 1). No entanto, em Pariquêra-Açu o inverno é mais chuvoso em relação às outras regiões onde as quantidades de chuva são maiores nos meses mais quentes. Pluviosidade mais elevada aliada à constituição do solo provoca lixiviação de bases, propiciando maior acidez, a qual, por sua vez, propicia solubilização do alumínio. Essa condição é bem marcante em Pariquêra-Açu onde ocorreram poucos rizóbios.

Observando as características químicas dos solos (tabela 2) pode-se verificar que não houve um fator de fertilidade

Tabela 3. Número de rizóbios/g de solo encontrado em três leguminosas cultivadas em amostras de solos provenientes de diferentes municípios de São Paulo.

MUNICÍPIO	SOLO ⁽¹⁾	Leguminosa			TOTAL
		CROTALÁRIA	FEIJÃO	GUANDU	
Anhembi	PVd	31,5	65,0	22,5	119,0
Campinas	LVa	65,0	90,0	31,5	186,5
Morro Agudo	LR	170,0	700,0	44,5	914,5
Pariquera-Açu	LAA	n.d.*	n.d.*	11,0	11,0
Pindorama	PVd	n.d.*	22,5	31,5	54,0

(1) PV podzólico vermelho amarelo
 LV latossolo vermelho amarelo
 LR latossolo roxo
 LA latossolo amarelo
 PV podzólico vermelho amarelo

* n.d. = não detectado.

Tabela 4. Número de nódulos/planta de crotalária, feijão e guandu, nos diferentes solos. Médias de 10 plantas.

LOCAL	SOLO ⁽¹⁾	LEGUMINOSA			TOTAL
		CROTALÁRIA	FEIJÃO	GUANDU	
Anhembi	PVd	5,2	16,9	3,7	25,8
Campinas	LVa	23,0	31,0	3,0	57,0
Morro Agudo	LR	31,9	87,7	18,2	137,8
Pariquera-Açu	LAA	n.d.*	n.d.*	8,0	8,0
Pindorama	PVd	n.d.*	3,2	4,9	8,1

(1) PV podzólico vermelho amarelo
 LV latossolo vermelho amarelo
 LR latossolo roxo
 LA latossolo amarelo
 PV podzólico vermelho amarelo

* n.d. = não detectado.

isolado que determinou a ocorrência dos rizóbios, mas a fertilidade do solo de maneira geral. A maior ocorrência de *Rhizobium* sp. e *Bradyrhizobium* sp. foi observada no LR de Morro Agudo, que apresentou boa fertilidade natural. Os demais solos eram ácidos e com alta saturação por alumínio, principalmente o LA de Pariqüera-Açu. Neste último era de se esperar até mesmo ausência de rizóbios, sendo inesperada a nodulação do guandu, pois em solo com pH 5,3 WOOMER et al. (1988) não observaram nodulação do siratro (*Macroptilium atropurpureum*), leguminosa das mais promíscuas utilizada como indicadora de população natural de *Bradyrhizobium* sp..

Teores de fósforo muito baixos nos quatro solos podem ser responsáveis pelos baixos números de células, pois o solo de Morro Agudo apresentou alto teor desse elemento e foi o que apresentou o maior número de rizóbios. BECK & MUNNS (1984) apontam a deficiência de fósforo como um dos fatores que inibem a ocorrência de rizóbios nos solos e se torna mais grave quando a deficiência do elemento está aliada à presença do alumínio trocável. Essas condições estiveram presentes no PV de Anhembi, LVa de Campinas, LA de Pariqüera-Açu e PV de Pindorama. O cálcio não é exigido em altas concentrações por rizóbios. No entanto, em situações críticas de acidez e quantidades de alumínio trocável elevadas, esse elemento se torna importante, pois pode ser utilizado para manter o pH citoplasmático estável ou mobilizar o fósforo se este

estiver disponível (O'HARA et al., 1989). Todos os solos com exceção do LR de Morro Agudo apresentaram baixo teor de cálcio. O efeito prejudicial da acidez do solo sobre a ocorrência de rizóbios também foi observado por LOWENDORF et al. (1981) & COVENTRY et al. (1985). Os solos LVa de Campinas e LAa de Pariquera-Açu têm características semelhantes, e no entanto no LV de Campinas o número de rizóbios foi bem maior, considerando o total de células/g de solo encontrado nas três leguminosas, de 186,5 em Campinas e 11,0 em Pariquera-Açu. O PVd de Anhembi e Pindorama pertencem à mesma unidade e também se assemelham quanto às características químicas, e nesse caso o solo de Anhembi apresentou um total de rizóbios duas vezes maior. Neste caso, observa-se que o solo de Pindorama tinha maior saturação por Al e ambos estavam associados a uma baixa saturação por bases (tabela 2).

Quanto à textura esta parece não ter exercido grande influência no número de rizóbios. Os dois solos arenosos, o PVd de Anhembi e o PVd de Pindorama, apresentaram menor número de rizóbios em relação aos solos argilosos de Campinas (LVa) e Morro Agudo, (LR) que abrigaram maior número de células (tabela 3). A única exceção foi o LAa de Pariquera-Açu que é argiloso e teve o número mais baixo de rizóbios. Poucos trabalhos enfatizam a influência da textura do solo na ocorrência das comunidades indígenas, mas DANSO & OWIREDU

(1988) observaram uma população indígena de *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna unguiculata*) mais baixa num solo arenoso e ácido, em relação ao solo argiloso e com índice de pH maior. RUPELA et al. (1987) também observaram poucos *Rhizobium* spp. (*Cicer arietinum*) num solo arenoso e ácido, e encontraram uma comunidade mais numerosa no solo argiloso.

Outro fator que colabora com a ocorrência de rizóbios nativos no solo é a presença de hospedeiros homólogos ou promíscuos, como observaram TROTMAN & WEAVER (1986), RUPELA et al. (1987), WOOMER et al., (1988) e TURK et al. (1993).

Considerando a vegetação dos locais onde os solos foram amostrados, com exceção do PVd de Anhembi, sob pastagem, todos os solos estavam sob cobertura vegetal natural e diversificada: mata em Pariquera-Açu e Pindorama, cerrado em Campinas e cerradão em Morro Agudo. Em qualquer desses locais ocorrem leguminosas nativas. MATTHES et al (1988), estudando a composição florística numa área de Campinas que ainda permanece pouco alterada em sua composição original, observaram que a família *Leguminosae* foi a que apresentou o maior número de espécies, demonstrando os resultados estarem de acordo com os de outros autores que também observaram que a *Leguminosae* é uma das famílias de maior abundância nas florestas do Estado de São Paulo. Numa área sob cerrado de Mogi Guaçu, MANTOVANI (1983) observou dentro das famílias mais representadas na flora como um todo a *Leguminosae*, sendo

numerosos os componentes arbustivos-arbóreos e herbáceos. O fato de não ser detectada a presença de rizóbios para o feijão e a crotalária em Pariquera-Açu deve estar mais ligado às condições de acidez e alumínio do solo do que à vegetação. O solo de Anhembi está sob pastagem de grama-batatais (*Paspalum notatum*) há 10 anos, tendo sido anteriormente cultivado com milho. Na área em que as amostras foram retiradas não havia ocorrência de leguminosas. No entanto em locais próximos ao local de amostragem existem áreas com mata onde ocorrem leguminosas nativas.

O guandu apresentou poucos nódulos por planta (tabela 4), mas nodulou em todos os solos. O feijão só não formou nódulos no latossolo amarelo de Pariquera-Açu e nodulou pouco no podzólico vermelho amarelo de Pindorama. Nos solos de Anhembi, Campinas e Morro Agudo, foi a leguminosa que apresentou o maior número de nódulos por planta. A ausência de nódulos na crotalária no solo de Pindorama não era esperada. Em Pariquera-Açu a elevada acidez e alto teor de alumínio podem ter sido os responsáveis pela ausência de nódulos, mas no podzólico vermelho amarelo de Pindorama, outro fator pode ter influenciado, pois essa leguminosa forma nódulos com *Bradyrhizobium* sp., de ocorrência comum em solos tropicais e é considerada como tolerante a condições de estresse do meio. WOOMER et al., (1988) observaram maior ocorrência de *Bradyrhizobium* sp. em solos do Havaí, estando

presente em 13 dos 14 locais examinados. Neste trabalho se se considerar os quatro solos observa-se que houve predominância de *Rhizobium* sp., pois o feijão foi a planta que mais nodulou, só não apresentando nódulos no solo de Pariquera-Açu. Uma das possibilidades para explicar esse fato é de que o feijão nodula com rizóbios de plantas arbóreas e arbustivas e, como já foi discutido, a família *Leguminosae* é a que contribui com maior número de representantes na vegetação natural no Estado de São Paulo. Atualmente sabe-se que existe grande diversidade entre rizóbios que nodulam o feijoeiro como mostram os trabalhos de LAGUERRE et al(1993) e SOUZA et al (1994).

4.2. Características morfológicas das colônias e fisiológicas das culturas

Os isolados da crotalária formaram colônias pequenas, de 1 mm de diâmetro ou mesmo punctiformes e convexas quanto à elevação. Absorveram levemente o corante do meio de cultura, tornando-se rosadas. Em meio sólido com azul de bromotimol a cor variou entre esbranquiçada e amarelada. Apresentaram aspecto opaco na maior parte e muitas pareciam ter sido pulverizadas com um pó branco na superfície, sendo por esse motivo chamadas de "pulverulentas" neste trabalho. As colônias

foram por nós classificadas em aquosas, quando ao serem tocadas desmanchavam-se facilmente, e gomosas, quando ao serem tocadas formavam um fio consistente, dando a impressão de um elástico. A maioria produziu reação alcalina no meio líquido com azul de bromotimol, sendo que apenas dois isolados produziram reação ácida. O crescimento em placas foi em geral lento, sendo as colônias bem visíveis somente seis a oito dias após a transferência para as placas.

Os isolados do feijão foram semelhantes em todos os solos. Formaram colônias que variaram de 2 a 5 mm de diâmetro, de coloração rosada bem clara, denotando pouca absorção do corante em placas. Quando em meio sólido com azul de bromotimol, apresentaram-se levemente amareladas. Ocorreram colônias de aspecto brilhante e opaco. A maioria apresentou consistência aquosa. É interessante notar que dos seis isolados de Morro Agudo, onde o solo é mais argiloso e com pH mais alto, cinco apresentaram consistência gomosa. Todas produziram reação de levemente a fortemente ácida no meio com azul de bromotimol. O crescimento na placa foi rápido, sendo que as colônias apareceram visíveis a olho nu, um a dois dias após a inoculação.

O tipo de solo também não influenciou a morfologia das colônias dos isolados de guandu. Estes diferiram em sua maioria dos isolados da crotalária, e muitas assemelharam-se às do feijão. As colônias apresentaram-se maiores em relação

às da crotalária, com 1 a 3 mm de diâmetro. Absorveram pouco mais o corante do que os isolados de crotalária e de feijão quando em meio contendo vermelho Congo. Quanto à elevação, grande parte apresentou-se de forma quase plana, mas ocorreram formas pouco mais convexas e três isolados punctiformes. O aspecto opaco predominou. A maior parte dos isolados produziu reação que variou de neutra a fortemente alcalina no meio com azul de bromotimol. O crescimento nas placas foi no geral mais rápido do que os da crotalária, sendo que as colônias foram bem visíveis quatro a cinco dias após a inoculação. Embora alguns isolados tenham apresentado consistência gomosa, predominou a consistência aquosa.

EAGLESHAM et al. (1984), estudando a diversidade das populações de *Bradyrhizobium* spp. (*Vigna*) de solos de três locais da Nigéria, observaram dois tipos de colônia, seco e úmido , os quais correlacionaram-se com o solo de origem . O tipo seco, o qual os autores afirmam ser característica comum aos rizóbios de crescimento lento, ocorria na maioria das vezes no solo com pH mais alto, que era de 6,1. As colônias do tipo úmido ocorreram em grande parte no solo com pH 5,4. No solo mais ácido, de pH 4,1 ocorriam os dois tipos, sem predominância de um ou de outro.

Neste trabalho, não foram observadas colônias do tipo seco como descrito por EAGLESHAM et al (1984). Entre as do

tipo aquoso e gomoso, a maior parte das colônias foi do tipo aquoso.

4.3. Nodulação e especificidade hospedeira

Na tabela 5 estão identificados os isolados por leguminosa, solo e local de origem.

O feijão mostrou-se a leguminosa mais específica, só apresentando nódulos com os isolados homólogos (tabela 6). Três dos isolados do guandu formaram poucos nódulos no feijão (tabela 8), o que não é comum. No entanto, a literatura tem mostrado que dentre espécies do gênero *Rhizobium* existe grande diversidade fenotípica e genotípica (PIÑERO et al., 1988; MARTINEZ-ROMERO et al., 1991; LAGUERRE et al., 1993 e SOUZA et al., 1994), acreditando-se que por meio da inoculação com isolados de outras espécies é possível melhorar o sistema simbiótico do feijoeiro. Em parte, essa melhora vem acontecendo desde a observação de que os isolados de rizóbios de leucena, hoje classificados como *R. tropici*, formam associação eficiente com o feijoeiro e são melhor adaptados à acidez do solo e altas temperaturas, condições normais na região dos trópicos. (MARTINEZ-ROMERO et al., 1991). Trabalho semelhante realizado por HUNGRIA et al., (1993) mostrou que além da leucena, isolados de *Gliricidia* e

Tabela 5 . Isolados de *Rhizobium* spp e *Bradyrhizobium* spp. de solos de cinco locais do Estado de São Paulo.

Isolado	Leguminosa	Local	Solo	Vegetação
F ₁ A a F ₆ A	feijão	Anhembi	PVd	pastagem
C ₁ A a C ₆ A	crotalária	Anhembi	PVd	pastagem
G ₁ A a G ₆ A	guandu	Anhembi	PVd	pastagem
F ₁ C a F ₆ C	feijão	Campinas	LVa	cerrado
C ₁ C a C ₆ C	crotalária	Campinas	LVa	cerrado
G ₁ C a G ₆ C	guandu	Campinas	LVa	cerrado
G ₁ P a G ₆ P	guandu	Pariquera-Açu	LAa	mata
F ₁ Pma a F ₆ Pma	feijão	Pindorama	PVd	mata
G ₁ Pma a G ₆ Pma	guandu	Pindorama	PVd	mata
F ₁ MA a F ₆ MA	feijão	Morro Agudo	LR	cerradão
C ₁ MA a C ₆ MA	crotalária	Morro Agudo	LR	cerradão
G ₁ MA a G ₆ MA	guandu	Morro Agudo	LR	cerradão

Tabela 6. Nodulação ausente (-) ou presente(+) e peso de matéria seca (g/planta) de plantas de amendoim, crotalária, feijão, guandu e leucena inoculadas com *Rhizobium* sp. isolados de feijão. Médias de 3 repetições.

Isolado	Amendoim	Crotalária	Feijão	Guandu	Leucena
F ₁ A	(-) 1,03	(-) 0,54	(+) 1,03	(-) 0,50	(+) 0,78
F ₂ A	(-) 0,98	(-) 0,44	(+) 0,94	(-) 0,63	(+) 1,30
F ₃ A	(-) 0,95	(-) 0,52	(+) 0,83	(+) 0,60	(+) 0,58
F ₄ A	(-) 1,07	(-) 0,59	(+) 0,72	(-) 0,62	(+) 0,91
F ₅ A	(-) 1,13	(-) 0,54	(+) 0,65	(-) 0,55	(+) 1,02
F ₆ A	(-) 0,87	(-) 0,40	(+) 0,68	(-) 0,58	(+) 0,45
F ₁ C	(-) 0,95	(-) 0,48	(+) 0,71	(-) 0,65	(+) 0,94
F ₂ C	(-) 1,08	(-) 0,56	(+) 0,76	(+) 0,58	(+) 0,96
F ₃ C	(-) 1,00	(-) 0,67	(+) 2,10	(-) 0,51	(+) 0,84
F ₄ C	(-) 0,98	(-) 0,45	(+) 1,77	(+) 0,54	(+) 0,85
F ₅ C	(-) 0,92	(-) 0,57	(+) 1,49	(-) 0,57	(+) 1,23
F ₆ C	(-) 0,85	(-) 0,59	(+) 1,46	(-) 0,50	(+) 1,72
F ₁ MA	(-) 0,74	(-) 0,49	(+) 1,15	(-) 0,57	(-) 0,38
F ₂ MA	(-) 0,68	(-) 0,43	(+) 1,46	(+) 0,47	(+) 0,87
F ₃ MA	(-) 0,84	(-) 0,51	(+) 0,93	(+) 0,41	(+) 0,84
F ₄ MA	(-) 0,79	(-) 0,52	(+) 0,74	(-) 0,35	(+) 0,79
F ₅ MA	(-) 1,21	(-) 0,48	(+) 0,77	(-) 0,62	(+) 0,85
F ₆ MA	(-) 0,90	(-) 0,58	(+) 0,69	(+) 0,50	(+) 1,09
F ₁ Pma	(-) 1,02	(-) 0,50	(+) 0,71	(+) 0,63	(-) 0,49
F ₂ Pma	(-) 0,94	(-) 0,48	(+) 0,85	(-) 0,59	(-) 0,27
F ₃ Pma	(-) 1,07	(-) 0,37	(+) 0,90	(+) 0,53	(-) 0,53
F ₄ Pma	(-) 0,86	(-) 0,49	(+) 0,81	(-) 0,49	(-) 0,48
F ₅ Pma	(-) 0,91	(-) 0,53	(+) 0,87	(-) 0,62	(-) 0,37
F ₆ Pma	(-) 0,94	(-) 0,54	(+) 0,90	(+) 0,59	(-) 0,47
Controle	(-) 0,74	(-) 0,40	(-) 0,59	(-) 0,53	(-) 0,34
Nitrogênio	(-) 3,27	(-) 1,95	(-) 2,03	(-) 2,31	(-) 1,34
Inoculado*	(+) 2,72	(+) 1,69	(+) 2,21	(+) 1,88	(-) 1,09

* Amendoim: *Bradyrhizobium* sp., SMS - 400
 Crotalária: *Bradyrhizobium* sp., SMS - 633
 Feijão e Leucena: *Rhizobium tropici*, SMS - 731
 Guandu: *Bradyrhizobium* sp., SMS - 634

Lonchocarpus também formam simbiose eficiente com o feijoeiro, apresentando tolerância às mesmas condições adversas que *R. tropici*. Esses resultados sugerem que leguminosas nativas que nodulam com *Rhizobium* spp. constituem-se uma fonte para isolamento nos estudos que visam melhorar a simbiose do feijoeiro.

Neste trabalho, com exceção de um isolado de Morro Agudo e dos seis isolados de Pindorama, todos os demais isolados do feijão formaram nódulos na leucena (tabela 6), sugerindo a classificação como *R. tropici*.

Quanto à eficiência, não era objetivo do trabalho e além do mais, experimentos para se testar eficiência da fixação devem ter maior duração e número de repetições. Como se incluíram tratamentos com nitrogênio mineral nos testes de nodulação e se obteve o peso de matéria seca das plantas, fez-se comparação do peso da parte aérea obtida com os isolados, com o peso da parte aérea obtida no tratamento com N, calculando-se a eficiência relativa. Dessa maneira foi possível ter-se uma idéia preliminar sobre a eficiência dos isolados. Nos apêndices 1, 2, 3, 4 e 5 estão apresentados os resultados das comparações de médias feitas para a eficiência relativa de todos os isolados que nodularam o feijão, a leucena, o amendoim, a crotalária e o guandu respectivamente. Pela análise estatística e comparando-se as médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, observa-se que apenas os

isolados F_4C , F_5C , F_6C e F_2MA , foram relativamente eficientes (apêndice 1). No feijoeiro somente o isolado F_3C , foi comparável ao tratamento com nitrogênio. Cabe comentar que a massa de matéria seca das plantas inoculadas com esse isolado superou a do tratamento com nitrogênio (Tabela 6) e por esse motivo, no cálculo da eficiência relativa, deu-se o valor 100 também para esse tratamento. Os isolados de guandu que nodularam o feijão não foram eficientes (apêndice 1). Três dos isolados que nodularam a leucena, o F_2A , F_5C e F_6MA , (apêndice 2) mostraram-se com eficiência relativa alta nessa leguminosa e o F_6C mostrou-se mais eficiente que o tratamento com o N mineral.

O amendoim, a crotalária e o guandu são consideradas como plantas promíscuas e apresentam-se bem noduladas com rizóbios nativos.

Nenhum isolado do feijão nodulou o amendoim (tabela 6), 88% dos isolados da crotalária e somente 36% dos isolados do guandu, nodularam essa leguminosa, como pode ser observado nas tabelas 7 e 8, respectivamente, o que mostra certo grau de especificidade. Esse fato já foi observado por GIARDINI et al. (1984) e LOMBARDI & OLIVEIRA, (1990), os quais testaram estirpes isoladas de diversas leguminosas e de várias procedências no amendoim. É interessante comentar que os isolados do guandu tiveram crescimento mais rápido no meio

Tabela 7. Nodulação ausente (-) ou presente (+) e peso de matéria seca (g/planta) de amendoim, crotalária, feijão e guandu, inoculados com *Bradyrhizobium* sp. isolado de crotalária. Médias de 3 repetições.

Isolado	Amendoim	Crotalária	Feijão	Guandu
C ₁ A	(+) 1,80	(+) 0,31	(-) 0,55	(+) 0,44
C ₂ A	(-) 1,11	(+) 0,24	(-) 0,62	(+) 0,58
C ₃ A	(+) 1,45	(+) 0,35	(-) 0,51	(-) 0,64
C ₄ A	(+) 1,47	(+) 0,41	(-) 0,49	(+) 0,59
C ₅ A	(+) 1,98	(+) 0,50	(-) 0,60	(+) 0,53
C ₆ A	(+) 1,39	(+) 0,42	(-) 0,58	(-) 0,61
C ₁ C	(+) 1,02	(+) 0,51	(-) 0,70	(+) 0,52
C ₂ C	(+) 1,48	(+) 0,37	(-) 0,61	(+) 0,48
C ₃ C	(+) 1,44	(+) 0,55	(-) 0,49	(+) 0,53
C ₄ C	(+) 1,78	(+) 0,59	(-) 0,47	(-) 0,63
C ₅ C	(+) 1,57	(+) 0,51	(-) 0,55	(-) 0,57
C ₆ C	(+) 2,18	(+) 0,48	(-) 0,57	(+) 0,59
C ₁ MA	(+) 1,75	(+) 0,44	(-) 0,42	(+) 0,45
C ₂ MA	(-) 0,99	(+) 0,49	(-) 0,51	(-) 0,64
C ₃ MA	(+) 1,87	(+) 0,37	(-) 0,47	(-) 0,51
C ₄ MA	(-) 1,08	(+) 0,61	(-) 0,63	(+) 0,42
C ₅ MA	(+) 1,43	(+) 0,61	(-) 0,51	(-) 0,63
C ₆ MA	(+) 1,42	(+) 0,39	(-) 0,50	(+) 0,70
Controle	(-) 1,01	(-) 0,28	(-) 0,47	(-) 0,41
Nitrogênio	(-) 2,76	(-) 1,79	(-) 1,68	(-) 1,94
Inoculado*	(+) 2,07	(+) 1,38	(+) 1,52	(+) 1,71

* Amendoim: *Bradyrhizobium* sp., SMS - 400

Crotalária: *Bradyrhizobium* sp., SMS - 633

Feijão: *Rhizobium tropici*, SMS - 731

Guandu: *Bradyrhizobium* sp., SMS - 634

Tabela 8. Modulação ausente (-) ou presente (+) e peso de matéria seca (g/planta) de amendoim, crotalária, feijão e guandu, inoculados com rizóbios isolados de guandu.

Isolado	Amendoim	Crotalária	Feijão	Guandu
G ₁ A	(+) 1,35	(+) 0,75	(-) 0,56	(+) 0,68
G ₂ A	(+) 1,67	(+) 0,65	(-) 0,54	(+) 0,71
G ₃ A	(+) 1,58	(+) 0,47	(-) 0,51	(+) 0,73
G ₄ A	(+) 1,42	(-) 0,74	(-) 0,63	(+) 0,65
G ₅ A	(-) 1,34	(+) 2,86	(-) 0,62	(+) 0,74
G ₆ A	(+) 1,38	(+) 1,43	(-) 0,54	(+) 0,71
G ₁ C	(+) 1,83	(+) 0,52	(-) 0,57	(+) 0,77
G ₂ C	(+) 1,21	(-) 0,99	(-) 0,54	(+) 0,61
G ₃ C	(-) 1,17	(+) 1,90	(-) 0,58	(+) 0,69
G ₄ C	(-) 1,08	(+) 0,47	(-) 0,53	(+) 0,80
G ₅ C	(+) 1,49	(+) 0,59	(-) 0,60	(+) 0,70
G ₆ C	(-) 1,82	(-) 0,66	(-) 0,55	(+) 0,88
G ₁ MA	(-) 1,31	(+) 0,70	(+) 0,57**	(+) 0,71
G ₂ MA	(+) 1,63	(+) 0,56	(-) 0,45	(+) 0,65
G ₃ MA	(-) 1,57	(+) 0,93	(-) 0,50	(+) 0,59
G ₄ MA	(+) 1,39	(-) 2,70	(-) 0,65	(+) 0,71
G ₅ MA	(-) 1,44	(-) 0,49	(-) 0,59	(+) 0,64
G ₆ MA	(-) 1,29	(+) 1,30	(+) 0,64*	(+) 0,68
G ₁ P	(-) 1,37	(+) 0,41	(+) 0,79*	(+) 0,73
G ₂ P	(-) 1,23	(-) 0,58	(-) 0,57	(+) 0,54
G ₃ P	(-) 1,18	(+) 0,52	(-) 0,88	(+) 0,61
G ₄ P	(-) 1,45	(+) 0,53	(-) 0,84	(+) 0,73
G ₅ P	(-) 1,09	(-) 0,61	(-) 0,53	(+) 0,73
G ₆ P	(-) 1,05	(+) 0,42	(-) 0,61	(+) 0,62
G ₁ Pma	(-) 1,20	(+) 2,89	(-) 0,56	(+) 0,70
G ₂ Pma	(-) 1,42	(+) 1,11	(-) 0,53	(+) 0,76
G ₃ Pma	(-) 1,24	(+) 1,33	(-) 0,65	(+) 1,19
G ₄ Pma	(-) 0,89	(+) 1,21	(-) 0,57	(+) 1,44
G ₅ Pma	(-) 1,00	(+) 1,33	(-) 0,56	(+) 0,95
G ₆ Pma	(-) 1,10	(+) 1,05	(-) 0,52	(+) 1,07
Controle	(-) 1,01	(-) 0,41	(-) 0,44	(-) 0,66
Nitrogênio	(-) 3,03	(-) 2,96	(-) 1,80	(-) 2,10
Inoculado***	(+) 2,83	(+) 2,24	(+) 1,62	(+) 1,87

* 3 nódulos

** 10 nódulos

*** Amendoim: *Bradyrhizobium* sp., SMS - 400

Crotalária: *Bradyrhizobium* sp., SMS - 633

Feijão: *Rhizobium tropici*, SMS - 731

Guandu: *Bradyrhizobium* sp., SMS - 634

ELMA em relação aos isolados de crotalária e, dos 30 isolados do guandu, somente 11 nodularam o amendoim. Isso parece indicar que o amendoim nodula preferencialmente com rizóbios de crescimento lento. Calculando-se a eficiência relativa para os isolados que nodularam o amendoim (apêndice 3), não houve nenhum isolado que tenha se mostrado promissor. Embora o teste de nodulação tenha tido pouca duração, observa-se que apenas o isolado C₆ C se distinguiu dos demais pois não foram observadas diferenças significativas quando as médias de matéria seca das plantas inoculadas, foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Apenas as plantas que receberam N mineral tiveram desenvolvimento satisfatório.

A crotalária nodulou com todos os isolados homólogos (tabela 7), com 76,7% dos isolados do guandu (tabela 8), só não formando nódulos com os isolados do feijão, (tabela 6) o que era de alguma forma esperado, pois até o presente consta que a crotalária se associa estritamente com *Bradyrhizobium*. Apesar dos isolados do guandu apresentarem crescimento mais rápido do que os da crotalária, foram capazes de se associar com a mesma. A comparação de médias pelo teste de Tukey a 5%, feita para a eficiência relativa, mostrou que 3 isolados do guandu, G₁ Pma, G₅ A e G₄ MA, foram tão eficientes quanto os tratamentos com nitrogênio (tabela 8). Os demais isolados

apresentaram eficiência relativa inferior na crotalária (apêndice 4).

O guandu nodulou com todos os isolados homólogos (tabela 8), com 67% dos isolados da crotalária (tabela 7) e com 33% dos isolados do feijão (tabela 6), o que denota maior grau de promiscuidade. Vale lembrar que essa leguminosa nodula tanto com rizóbios de crescimento lento como com rizóbios de crescimento rápido, como mostra a literatura (BROMFIELD & KUMAR RAO, 1983, ANAND & DOGRA, 1991). Portanto os resultados do presente trabalho estão de acordo com a literatura. Quanto à eficiência, nenhum dos isolados mostrou eficiência comparável à do nitrogênio no período em que durou o experimento (apêndice 5).

4.4.Tolerância à acidez e ao alumínio

Houve grande variação na tolerância à acidez e ao alumínio, e o solo de origem do isolado não exerceu influência acentuada nessa característica, pois observou-se que muitos dos isolados dos solos mais ácidos não toleraram essas condições. As tabelas 9, 10 e 11 mostram o crescimento das culturas nos diferentes meios.

Analisando-se os isolados de cada solo, sem considerar a planta de origem, observa-se que nos solos mais ácidos, que

Tabela 9. Crescimento de *Bradyrhizobium* sp. isolado de crotalária, em meio BLMA a pH 6,8 e em meio KM a pH 6,8 e pH 4,5 contendo ou não doses de alumínio.

Isolado	Meios de Cultura*			uM de Al^{3+}		
	BLMA	KM, pH 6,8	KM, pH 4,5	50	75	100
C ₁ A	+	+	-	-	-	-
C ₂ A	+	+	+	+	-	-
C ₃ A	+	+	+	+	-	-
C ₄ A	+	+	+	+	+	-
C ₅ A	+	+	+	-	-	-
C ₆ A	+	+	+	+	-	-
C ₁ C	+	+	+	-	-	-
C ₂ C	+	+	-	-	-	-
C ₃ C	+	+	+	+	+	-
C ₄ C	+	+	+	+	+	+
C ₅ C	+	+	+	+	+	-
C ₆ C	+	+	+	+	+	-
C ₁ NA	+	+	+	-	-	-
C ₂ NA	+	+	+	+	-	-
C ₃ NA	+	+	+	+	-	-
C ₄ NA	+	+	+	+	-	-
C ₅ NA	+	+	-	-	-	-
C ₆ NA	+	+	-	-	-	-

* BLMA com extrato de levedura e manitol.

KM= meio de Keyser e Nunns.

Tabela 10. Crescimento de *Rhizobium* sp. isolado de feijão, em meio BLMA a pH 6,8, e em meio KN a pH 6,8, e a pH 4,5 contendo ou não doses crescentes de alumínio.

Isolado		BLMA	KN, pH 6,8	KN, pH 4,5	uM de alumínio		
					50	75	100
F ₁	A	+	+	+	+	-	-
F ₂	A	+	+	+	-	-	-
F ₃	A	+	+	+	+	-	-
F ₄	A	+	+	+	+	-	-
F ₅	A	+	+	+	+	-	-
F ₆	A	+	+	+	+	-	-
F ₁	C	+	+	+	+	+	+
F ₂	C	+	+	+	+	+	+
F ₃	C	+	+	+	+	+	+
F ₄	C	+	+	+	+	+	+
F ₅	C	+	+	+	+	+	+
F ₆	C	+	+	+	+	+	+
F ₁	MA	+	+	-	-	-	-
F ₂	MA	+	+	+	+	+	+
F ₃	MA	+	+	-	-	-	-
F ₄	MA	+	+	-	-	-	-
F ₅	MA	+	+	+	+	+	+
F ₆	MA	+	+	-	-	-	-
F ₁	Pma	+	+	+	-	-	-
F ₂	Pma	+	+	+	+	+	+
F ₃	Pma	+	+	+	+	+	+
F ₄	Pma	+	+	+	+	+	+
F ₅	Pma	+	+	+	+	+	+
F ₆	Pma	+	+	+	+	+	+

* BLMA com extrato de levedura e manitol.

KN= meio de Keyser e Munns.

Tabela 11. Crescimento de rizóbios isolado de guandu, em meio BLMA a pH 6,8 e em meio KM a pH 6,8 e pH 4,5 contendo ou não doses crescentes de alumínio.

Isolado	BLMA	KM, pH 6,8	KM, pH 4,5	uM de alumínio		
				50	75	100
G ₁ A	+	+	+	+	-	-
G ₂ A	+	+	+	+	+	+
G ₃ A	+	+	+	+	-	-
G ₄ A	+	+	+	+	+	+
G ₅ A	+	+	+	+	+	+
G ₆ A	+	+	+	+	+	+
G ₁ C	+	+	+	+	-	-
G ₂ C	+	+	+	+	+	+
G ₃ C	+	+	+	+	-	-
G ₄ C	+	+	+	+	+	+
G ₅ C	+	+	+	+	+	+
G ₆ C	+	+	+	+	-	-
G ₁ MA	+	+	+	+	+	+
G ₂ MA	+	+	+	+	+	+
G ₃ MA	+	+	+	+	+	+
G ₄ MA	+	+	+	+	+	+
G ₅ MA	+	+	+	+	+	+
G ₆ MA	+	+	+	+	+	+
G ₁ P	+	+	+	+	+	+
G ₂ P	+	+	+	+	+	+
G ₃ P	+	+	+	+	+	+
G ₄ P	+	+	+	+	+	+
G ₅ P	+	+	+	+	+	-
G ₆ P	+	+	+	+	+	+
G ₁ Pma	+	+	+	+	-	-
G ₂ Pma	+	+	+	+	+	+
G ₃ Pma	+	+	+	+	+	+
G ₄ Pma	+	+	+	+	-	-
G ₅ Pma	+	+	+	+	-	-
G ₆ Pma	+	+	+	+	+	+

* BLMA com extrato de levedura e manitol.
KM meio de Keyser e Munns.

foram os de Anhembi, Campinas, Pariquera-Açu e Pindorama ocorreu maior porcentagem de isolados tolerantes a pH 4,5 (tabela 12), correspondendo a 94% do total dos isolados no PVd de Anhembi e LVa de Campinas, 100% no LAa de Pariquera-Açu e 92% no PVd de Pindorama. No LR de Morro Agudo, os isolados foram mais sensíveis, sendo que somente 67% do total de isolados tolerou o pH 4,5. No entanto, LR de Morro Agudo 92% dos isolados que toleraram pH 4,5, cresceram no meio 50 μM de Al, e 67% cresceram a 75 e 100 μM de Al (tabela 12). No LAa de Pariquera-Açu observou-se o maior número de isolados tolerantes às 3 doses de alumínio. No LVa de Campinas grande parte dos isolados tolerou 50 e 75 μM de alumínio, mas não foram muitos os que toleraram 100 μM . No PVd de Anhembi foram mais baixos os números de isolados tolerantes a 75 e 100 μM de Al (tabela 12). Embora as características do solo de origem não influenciem acentuadamente o isolado quanto à tolerância à acidez, parece haver maior probabilidade de se encontrar rizóbios tolerantes em solos mais ácidos.

Considerando-se o total de isolados de cada planta, observa-se que os da crotalária se apresentaram como os mais sensíveis tanto às condições ácidas do meio quanto às doses de Alumínio (tabela 13). Dos isolados do feijão 79% toleraram pH 4,5 no entanto foram os isolados dessa

Tabela 12. Número e porcentagem de isolados tolerantes a acidez e a doses de alumínio, originados dos solos dos 5 locais.

LOCAL	SOLO	Tol. a pH 4,5			Tol. ao Alumínio					
		TOTAL DE ISOLADOS	ISOL.TOL. A pH 4,5	%	50uM		75 uM		100 uM	
					N ⁰ . ISOL.	%	N ⁰ . ISOL.	%	N ⁰ . ISOL.	%
Anhembi	PVd	18	17	94	16	94	5	29	4	24
Campinas	LVa	18	17	94	16	94	13	76	10	59
M. Agudo	LR	18	12	67	11	92	8	67	8	67
Pariquera-Açu	LAa	6	6	100	6	100	6	100	5	83
Pindorama	PVd	12	11	92	11	100	8	73	8	73

* Calculada sobre o total de isolados de cada solo.

** Calculada sobre o n⁰. de isolados tolerantes a pH 4,5.

Tabela 13. Número e porcentagem de isolados tolerantes a acidez e a doses de alumínio, provenientes das diferentes leguminosas.

SOLO	Tol. a pH 4,5			Tol. ao Alumínio					
	TOTAL DE ISOLADOS	N ⁰ . ISOL.	%	50uM		75 uM		100 uM	
				N ⁰ . ISOL.	%	N ⁰ . ISOL.	%	N ⁰ . ISOL.	%
CROTALÁRIA	18	14	78	11	79	5	36	1	7
FRIJÃO	24	19	79	19	100	13	68	13	68
GUANDU	30	30	100	30	100	22	73	21	70

* Calculada em relação ao total de isolados

** Calculada em relação ao número de isolados tolerantes a pH 4,5

leguminosa tão tolerantes às doses de alumínio quanto os do guandu (tabela 13). No guandu 100% dos isolados apresentaram-se tolerantes a pH 4,5 e a 50 μ M de Al.

Na literatura encontram-se trabalhos como os de DATE & HALLIDAY (1979) e de LINDSTROM & MYLLYNIEMI (1987) mostrando maior grau de tolerância à acidez e ao alumínio de isolados originados de solos que apresentam tais condições. VARGAS et al. (1992) obtiveram maior número de isolados de feijão tolerantes a pH 4,5 e 100 μ M de Al em solos que apresentavam concentrações altas desse elemento.

Os resultados aqui apresentados estão mais de acordo com WOOD & SHEPHERD (1987), que observaram diferenças na tolerância de isolados provenientes de solos com valores de pH entre 3,6 e 5,6, faixa de variação semelhante à dos solos estudados neste trabalho.

A tolerância à acidez nem sempre confere tolerância ao alumínio. Dos 72 isolados 64 cresceram no meio ácido e desses, 61, 35 e 32 foram capazes de crescer a 50, 75 e 100 μ M de Al, respectivamente. Esses resultados também estão de acordo com a bibliografia referenciada.

Observa-se que não se pode generalizar as afirmativas de que os *Bradyrhizobia* seriam mais resistentes às condições de acidez e concentrações de alumínio, mesmo sendo originados de solos onde existem essas situações. Os isolados do feijão que pertecem ao gênero *Rhizobium*

apresentaram maior tolerância e ocorreram em número maior em relação aos da crotalária que são *Bradyrhizobia*. Os do guandu apresentaram características mais semelhantes ao gênero *Rhizobium* pela velocidade de crescimento, mas foram produtores de álcali no meio, peculiaridade comum ao *Bradyrhizobium*. Nesses isolados de guandu a maior parte tolerou as condições adversas do meio, assemelhando-se aos isolados do feijoeiro.

Nas figuras 1, 2 e 3 podem ser observados os dendrogramas dos isolados da crotalária, do feijão e do guandu respectivamente, agrupados segundo a tolerância a acidez e ao Al. Observam-se que os isolados da crotalária foram mais heterogêneos, formando 4 grupos cujos níveis de semelhanças mostrados pelo coeficiente de Jaccard estavam em torno de 0,77, 0,67 e 0,50 (figura 2). Considerando que quanto mais alto é o coeficiente de Jaccard, mais semelhantes são os grupos, nota-se que a maioria dos isolados de crotalária do PVd de Anhembi e do LAa Campinas se assemelham mais ajuntando-se a 3 isolados do LR de Morro Agudo. A correlação entre o nível de fusão e o coeficiente de Jaccard foi de 0,9210, indicando que esse coeficiente é confiável para avaliar as semelhanças entre isolados. Os rizóbios isolados do feijoeiro foram mais homogêneos, formando 2 grandes grupos (figura 3). O maior grau de semelhança foi observado entre a maioria dos isolados do

Figura 1 Dendrograma ilustrando os graus de similaridade entre isolados de crotalária, quanto à tolerância a acidez e alumínio.

Figura 2 Dendrograma ilustrando os graus de similaridade entre isolados de feijão, quanto à tolerância a acidez e alumínio.

Figura 3 Dendrograma ilustrando os graus de similaridade entre isolados de guandu, quanto à tolerância a acidez e alumínio.

LVa de Campinas e os d LVd de Pindorama, com os do PVd de Anhembi, os quais se assemelharam ao nível de 0,67 pelo coeficiente de Jaccard. Verificaram-se maiores diferenças entre 4 isolados do LR de Morro Agudo e um do PVd de Pindorama, os quais se uniram aos isolados do PVd de Anhembi num nível de similaridade aproximadamente de 0,38.

A correlação neste caso também foi alta, num valor de 0,9851.

No caso do guandu, a tolerância à acidez e ao alumínio, mostrou maior homogeneidade, havendo formação de 2 grandes grupos (figura 3). O coeficiente de similaridade foi maior, com valores aproximados de 0,83 e 0,65 entre os grupos.

Houve alta correlação entre o nível de fusão e o coeficiente de Jaccard, com um valor de 0,9938. Não houve com os isolados do guandu uma tendência de separação pela origem, como ocorreu com o feijão. No maior grupo de similaridade como também no segundo, observaram-se isolados de todos os solos.

Quando o coeficiente de Jaccard foi calculado para o total de isolados, maiores semelhanças ocorreram entre isolados de feijão e de guandu, independentemente da origem. Esses se assemelharam a 4 isolados de crotalária num nível de fusão igual de 0,84. Os outros dois grupos foram compostos pela maioria dos isolados de crotalária e

de alguns isolados de feijão e guandu. Como pode ser observado, ocorreram semelhanças tanto entre isolados dentro de um mesmo solo, como entre os isolados dos diferentes solos.(figura 4).

Esses resultados reforçam os de alguns trabalhos da literatura de que a tolerância à acidez e ao alumínio não se relaciona com as características químicas do solo de origem, sendo bastante provável que seja uma característica intrínseca ao microrganismo, pois em qualquer um dos solos ocorreram rizóbios sensíveis e tolerantes.

4.5.Resistência intrínseca a antibióticos.

Segundo JORDAN (1984), *Bradyrhizobium* é no geral mais resistente do que *Rhizobium* a diversos antibióticos, mas existe variação entre isolados, segundo esse mesmo autor.

Os isolados da crotalária apresentaram alto grau de tolerância à neomicina, sendo os mais tolerantes os do LR de Morro Agudo dos quais 5 dos 6 isolados cresceram no meio com 200mg/l de antibiótico e um isolado cresceu a 150 mg/l. O mesmo ocorreu com os isolados do PVd de Anhembi, sendo 5 tolerantes a 150mg/l e um a 200mg/l. (tabela 14).

Tabela 14. Concentrações de antibióticos que limitaram o crescimento de *Bradyrhizobium* sp. isolado de crotalária cultivada em solos provenientes de diferentes locais.

Isolado	STR ⁽¹⁾	SPC	CLF	BRY	KAN	NBO	TTC
mg/L							
C ₁ A	<40	<40	<40	<40	<40	200	100
C ₂ A	<40	<40	<40	<40	<40	150	40
C ₃ A	<40	<40	<40	<40	<40	150	<40
C ₄ A	200	200	200	200	<40	150	200
C ₅ A	<40	<40	<40	<40	<40	150	<40
C ₆ A	40	<40	200	<40	<40	150	200
C ₁ C	40	<40	40	<40	<40	<40	100
C ₂ C	40	<40	40	<40	<40	<40	<40
C ₃ C	40	<40	40	<40	<40	<40	<40
C ₄ C	40	<40	40	<40	<40	<40	<40
C ₅ C	40	<40	40	<40	<40	<40	<40
C ₆ C	<40	<40	40	<40	<40	<40	<40
C ₁ MA	<40	<40	<40	<40	<40	150	<40
C ₂ MA	<40	<40	<40	<40	40	200	<40
C ₃ MA	<40	<40	<40	<40	40	200	40
C ₄ MA	<40	<40	<40	<40	40	200	40
C ₅ MA	<40	<40	<40	<40	40	200	<40
C ₆ MA	<40	<40	<40	<40	40	200	<40

- (1) STR: estreptomicina
 SPC: espectinomicina
 CLF: cloranfenicol
 BRY: eritromicina
 KAN: canamicina
 NBO: neomicina
 TTC: tetraciclina

A tolerância à estreptomicina, espectinomicina, cloranfenicol, canamicina e tetraciclina foi baixa para os isolados da crotalária, variando de 40mg/l a menos. Houve exceção de dois isolados do PVd de Anhembi, o C₄ A que teve baixa resistência somente à canamicina e o C₆ A que tolerou 200mg/l de cloranfenicol e de tetraciclina e do C₁ A e C₁ C que toleraram 100mg/l de tetraciclina.

Os isolados do feijoeiro, procedentes de todos os solos mostraram no geral, alta resistência a neomicina (200mg/l), variando na tolerância aos outros antibióticos (tabela 15). Com exceção dos isolados do PVd de Pindorama, observa-se que o restante apresentou baixa tolerância a tetraciclina, o que está de acordo com a classificação de JORDAN (1984) que afirma que a tetraciclina e a estreptomicina são mais ativas contra os representantes do gênero *Rhizobium*. Contrariamente a JORDAN (1984), houve alta tolerância à estreptomicina.

A maior resistência espontânea a altos níveis de qualquer dos antibióticos, ocorreu entre os isolados do guandu. (tabela 16).

O dendrograma feito com os isolados da crotalária (figura 5) revelou 3 grupos de isolados, sendo apenas um grupo com nível de similaridade médio, como mostra o valor de 0,56 do coeficiente de Jaccard. A similaridade entre os outros grupos foi baixa, sendo de 0,2 e <0,1 pelo

Tabela 16. Concentrações de antibióticos que limitaram o crescimento de rizóbios isolados de guandu cultivado em solos provenientes de diferentes locais.

Isolado	STR ⁽¹⁾	SPC	CLF	BRY	KAN	NBO	TTC
mg/L							
G ₁ A	<40	<40	<40	100	200	200	40
G ₂ A	150	150	100	100	200	200	200
G ₃ A	<40	<40	<40	<40	<40	200	40
G ₄ A	100	<40	<40	<40	40	200	40
G ₅ A	<40	<40	<40	<40	200	200	100
G ₆ A	40	40	<40	<40	150	200	200
G ₁ C	150	<40	200	100	200	200	150
G ₂ C	150	<40	200	100	200	200	150
G ₃ C	150	<40	100	100	200	200	40
G ₄ C	100	<40	100	<40	40	200	100
G ₅ C	100	<40	<40	<40	40	200	100
G ₆ C	100	<40	<40	40	40	200	100
G ₁ MA	150	150	200	100	100	200	200
G ₂ MA	200	150	200	100	200	200	200
G ₃ MA	150	150	200	100	200	200	200
G ₄ MA	200	200	200	<40	200	200	200
G ₅ MA	150	200	200	<40	150	200	150
G ₆ MA	200	200	200	100	150	200	200
G ₁ P	200	200	200	<40	200	200	200
G ₂ P	200	200	200	<40	200	200	200
G ₃ P	200	200	200	<40	200	200	200
G ₄ P	200	200	200	<40	200	200	200
G ₅ P	200	200	200	<40	200	200	200
G ₆ P	200	200	200	<40	150	200	200
G ₁ Pma	150	200	200	150	200	200	200
G ₂ Pma	200	200	200	150	200	200	200
G ₃ Pma	200	200	200	150	150	200	200
G ₄ Pma	200	200	200	150	150	200	200
G ₅ Pma	150	200	200	150	150	200	200
G ₆ Pma	200	200	200	150	150	200	200

(1) STR: estreptomicina
 SPC: espectinomicina
 CLF: cloranfenicol
 BRY: eritromicina
 KAN: canamicina
 NBO: neomicina
 TTC: tetraciclina

Figura 5 Dendrograma ilustrando os graus de similaridade entre isolados de crotalária quanto à tolerância a antibióticos.

coeficiente de Jaccard. A correlação existente entre o nível de fusão e o coeficiente de Jaccard foi de 0,9821.

Já os rizóbios do feijoeiro foram mais heterogêneos em relação aos da crotalária (figura 6). Mesmo assim nota-se a formação de três grupos unidos por um nível de similaridade maior com valores de 0,73 , 0,50 e 0,30 para o coeficiente de Jaccard. Também, foi alto o coeficiente de correlação, tendo um valor de 0,9446.

Maior heterogeneidade foi observada entre os isolados do guandu (figura 7). Houve apenas 3 grupos de identidade, unidos por um alto coeficiente de Jaccard. Ocorreram muitos isolados que diferiram na tolerância a pelo menos um antibiótico. Houve nesse caso boa correlação, com um coeficiente igual a 0,9483.

O dendrograma que reuniu os isolados das três leguminosas, tanto quanto à tolerância à antibióticos (figura 8) como quanto à tolerância à acidez, alumínio e antibióticos (figura 9) mostrou maior similaridade entre os isolados do guandu e do feijão. De maneira semelhante ao que ocorreu com a tolerância à acidez e ao alumínio, os isolados da crotalária formaram um grupo mais distante os quais se uniram num valor de aproximadamente 0,27 aos isolados das outras leguminosas.

Figura 6 Dendrograma ilustrando os graus de similaridade entre isolados de feijão quanto à tolerância a antibióticos.

Figura 7 Dendrograma ilustrando os graus de similaridade entre isolados de guandu quanto à tolerância a antibióticos.

Figura 8 Dendrograma ilustrando os graus de similaridade entre isolados de crotalária, feijão e guandu quanto à tolerância antibióticos.

A hipótese testada neste trabalho, de que as condições do solo de origem poderiam influenciar em algumas características intrínsecas dos isolados, não pôde ser comprovada. Em todos os solos, independentemente dos valores de pH e da concentração de alumínio, ocorreram rizóbios tolerantes e sensíveis a esses fatores.

Pensava-se também que nos solos mais ácidos os rizóbios fossem mais sensíveis aos antibióticos, pois a maioria dos microrganismos produtores desses compostos desenvolvem-se melhor em condições mais neutras. (BALDANI et al., 1982). Isso também não ocorreu, pois mesmo os isolados do LAa de Pariqüera-Açu, cujo valor do pH 3,3, mostraram, alta tolerância a 6 dos 7 antibióticos testados, sendo sensíveis apenas a eritromicina. VARGAS et al (1992), observaram que grande parte de isolados de feijão tolerantes a altas concentrações de antibióticos, originavam-se de solos com valores de pH próximos à neutralidade. Os resultados do presente trabalho estão mais de acordo com os de ROUGHLEY et al. (1992), que não observaram relação entre a resistência a antibióticos e o pH dos solos de origem.

O que pode ser observado é que tanto a tolerância a acidez e ao alumínio como a tolerância a antibióticos são duas características que parecem depender mais da carga genética dos isolados. Para determinação dessas características são utilizados métodos simples, econômicos

e fáceis de serem manuseados no laboratório. A tolerância a antibióticos é mais utilizada em estudos de ecologia, como demonstrado na revisão de literatura. A tolerância à acidez é no entanto, um recurso utilizado em situações onde a inoculação é feita em solos que apresentam condições adversas e onde a calagem é impraticável. Tem sido pouco utilizada em estudos de ecologia em nossas condições, mas poderia ser considerada como um fator a mais em testes de seleção. Há de se considerar que em grande parte dos solos do Estado de São Paulo ocorrem valores baixos de pH, muitas vezes associados à presença do alumínio. Também a calagem não tem sido praticada intensivamente, sendo utilizada com maior frequência por agricultores mais tecnificados, o que justificaria a inclusão do teste de tolerância à acidez e ao alumínio na seleção de rizóbios.

4.6. Perfis isoenzimáticos de alfa e beta-esterases

Nas figuras 10, 11 e 12 estão apresentados os resultados das distâncias relativas entre bandas para alfa e beta-esterases para os isolados de crotalária, feijão e guandu, respectivamente.

Para as três leguminosas a diversidade foi observada entre isolados dos diferentes solos, pois dentro do mesmo

Figura 10 Distância relativa entre bandas de alfa e beta-esterases de isolados de crotalária.

Figura 11 Distância relativa entre bandas de alfa e beta-esterases de isolados de feijão.

Figura 12 Distância relativa entre bandas de alfa e beta-esterases de isolados de guandu.

ocorreram isolados, principalmente de feijão e guandu, com o mesmo padrão enzimático.

No caso da crotalária o perfil de alfa esterase separou entre os 6 isolados do solo do Anhembi, 5 diferentes (figura 13). A homogeneidade foi maior no solo de Campinas onde dos 6 isolados apenas 3 se diferenciaram. Dos 5 isolados de Morro Agudo 4 mostraram padrões diferentes de alfa-esterase. Todos os isolados diferiram da estirpe SMS-633, utilizada como referência. Pela alfa-esterase observaram-se 12 tipos enzimáticos diferentes de isolados de crotalária. Dois isolados não formaram bandas. A beta-esterase identificou 13 tipos enzimáticos de *Bradyrhizobium* sp., de crotalária, dos 16 analisados. No caso dessa enzima o isolado C₅ C foi idêntico ao C₂ A e C₃ A, apresentando a mesma distância eletroforética e apenas uma banda. A formação de uma só banda ocorreu em 12 dos 16 isolados da crotalária. Não houve nenhum isolado com o mesmo padrão de beta-esterase da estirpe de referência.

Pelo perfil enzimático da alfa-esterase observaram-se apenas 11 tipos diferentes de isolados de feijão. Também as diferenças entre isolados deram-se entre os solos e somente no solo de Morro Agudo observou-se maior variação entre isolados. Nenhum isolado foi idêntico a estirpe SMS-731, mas o F₆ MA apresentou uma banda com distância relativa muito próxima. A beta-esterase já foi mais discriminativa

Figura 13 Dendrograma mostrando o relacionamento entre os isolados de crotalária quanto ao perfil de alfa-esterase.

para os isolados do feijão, separando 14 tipos diferentes, dos 24 analisados. Novamente a heterogeneidade enzimática se deu entre isolados das diferentes procedências. Não ocorreu identidade entre qualquer dos isolados e a SMS-731, utilizada como padrão. Os isolados de feijão formaram em sua maioria apenas duas bandas.

Para isolados do guandu o perfil de alfa-esterase separou 19 tipos diferentes dos 30 analisados sendo verificada a heterogeneidade entre isolados das várias procedências e ocorrendo identidade dentro de um mesmo solo. Todos os isolados diferiram quanto ao padrão enzimático de alfa-esterase da estirpe SMS-634, de referência. Pelo perfil de beta-esterase foi possível separar 21 isolados diferentes. Houve homogeneidade dentro de um mesmo solo e heterogeneidade entre isolados dos diversos solos. Ocorreram no caso de beta-esterase semelhanças entre isolados do solo de Anhembi que apresentaram uma banda com distância relativa de 0,38 e um isolado do solo de Pariquera-Açu, cuja distância relativa teve um valor de 0,39.

Para qualquer das leguminosas, quando foram analisados juntos os perfis de alfa e beta-esterases, houve maior diferenciação, pois dos 17 isolados da crotalária foi possível diferenciar 16 isolados. Para o feijão dos 24 isolados, 16 foram diferentes entre si e do guandu, 25

mostraram perfis enzimáticos diferentes, entre os 30 analisados. Quando se consideraram os 71 isolados para alfa-esterase, 43 mostraram perfis diferentes e para beta-esterase dos 70 isolados que formaram bandas, 45 se diferenciaram.

Bandas com valores de distância relativa pequenas, referem-se a enzimas com peso molecular maior. Então, os isolados do guandu, de maneira geral, apresentaram enzimas com os maiores pesos moleculares. Os isolados da crotalária apresentaram enzimas com valores de peso molecular intermediários entre o guandu e o feijão. Neste último as enzimas apresentaram menores pesos moleculares.

Devido a esse fato, pode-se especular que a constituição enzimática da bactéria isolada de cada espécie vegetal parece ser uma característica intrínseca da bactéria, não sendo muito influenciada pelo solo de origem, pois para uma mesma leguminosa, a constituição enzimática dos isolados apresentou pequenas diferenças de um solo para outro.

Nos dendrogramas apresentados nas figuras 13 e 14, estão agrupados os isolados da crotalária de acordo com os perfis de alfa e beta-esterases, respectivamente. As distâncias euclidianas simples utilizadas para o cálculo das matrizes fornece coeficiente de dessemelhança e quanto mais alto o seu valor, mais diferentes são os isolados.

Figura 14 Dendrograma mostrando o relacionamento entre os isolados de crotalária quanto ao perfil de beta-esterase.

Pode-se observar pelos dendrogramas, que poucos isolados apresentaram identidade enzimática. Os isolados idênticos muitas vezes tiveram semelhança com outros grupos pelo fato de terem formado pelo menos uma banda com valores iguais.

Os dendrogramas relativos ao perfil eletroforético dos isolados do feijão estão apresentados nas figuras 15 e 16, respectivamente para alfa e beta-esterases. Formaram-se 6 grupos de identidade para alfa-esterase e 7 grupos idênticos para beta-esterase. Também houve semelhanças próximas entre grupos iguais devido à formação de uma banda com valores de distâncias relativas iguais. Observam-se 3 grupos divergentes no dendrograma da figura 16 sendo que os 2 primeiros formado pela maioria dos isolados do PV de Anhembi, do Lva Campinas e do LR de Morro Agudo ainda guardam um certo grau de semelhança. O terceiro grupo engloba todos os isolados do PVd de Pindorama, alguns do Lva de Campinas e 2 do LR de Morro Agudo, separados por um coeficiente de desigualdade de 0,55. Já para beta-esterase observa-se que houve maiores diferenças. A separação entre dois grandes grupos ocorreu num nível pouco maior de desigualdade, com valores da distância próximos a 0,6. Os outros grupos apresentaram maior grau de semelhança com valores da distância abaixo de 0,2.

No caso do guandu as figuras 17 e 18 mostram os perfis de alfa e beta-esterase, respectivamente. Tanto pela alfa

Figura 15 Dendrograma mostrando o relacionamento entre os isolados de feijão quanto ao perfil de alfa-esterase.

Figura 16 Dendrograma mostrando o relacionamento entre os isolados de feijão quanto ao perfil de beta-esterase.

Figura 17 Dendrograma mostrando o relacionamento entre os isolados de guandu quanto ao perfil de alfa-esterase.

Figura 18 Dendrograma mostrando o relacionamento entre os isolados de guandu quanto ao perfil de beta-esterase.

como pela beta-esterase, os graus de dessemelhança entre os isolados foi relativamente baixo e novamente esse fato pode ser atribuído à existência de bandas comuns entre os isolados, no caso das duas enzimas.

Quando todos os isolados foram analisados juntos, considerando tanto a alfa-esterase (figura 19) como beta-esterase (figura 20), houve formação de 16 grupos de identidade nos dois casos e 4 grandes grupos unidos por graus de dessemelhança parecidos, como pode ser observado pelos valores das distâncias euclidianas simples.

Ao juntarem-se todos os isolados quanto aos perfis de alfa e beta-esterases (figura 21), formaram-se 10 grupamentos de identidade e cinco grandes grupos com graus de dessemelhança menores. Houve maior número de isolados diferentes, cuja semelhança se deve à formação de bandas com valores comuns.

Na maioria dos casos a identidade enzimática ocorreu entre isolados de um mesmo solo, para uma mesma espécie de leguminosa sendo raros os casos entre isolados de solos e plantas diferentes serem iguais nessa característica. Pode-se por esse motivo, especular que as condições do solo de origem podem exercer pequena influência na composição enzimática do rizóbio, além dessa ser uma característica da espécie.

Figura 20 Dendrograma ilustrando o relacionamento entre isolados de crotalária, feijão e guandu quanto aos perfis de beta-esterase.

Figura 21 Dendrograma ilustrando o relacionamento entre isolados de crotalária, feijão e guandu quanto aos perfis de alfa e beta-esterase.

4.7. Diversidade sorológica

Nas tabelas 17, 18 e 19 estão os resultados das reações de aglutinação observadas entre os isolados de crotalária, feijão e guandu e os antissoros obtidos com as estirpes de referência.

Nota-se que dentre 18 isolados da crotalária, 11 apresentaram reação de identidade com a estirpe SMS-633 recomendada para inoculação da crotalária, e quatro isolados reagiram positivamente com a SMS-634, recomendada para inoculação do guandu. Nenhum isolado da crotalária reagiu positivamente com a estirpe SMS-731, recomendada para feijão.

Esses resultados sugerem que os isolados da crotalária divergem bastante dos isolados do guandu e do feijão, pois a maior parte deles formou reação positiva com a SMS-633. Cinco dos isolados da crotalária não apresentaram reações positivas com nenhum dos antissoros. Observa-se que nos três solos de origem dos isolados da crotalária ocorreram isolados do sorogrupo da SMS-633 e da SMS-634.

Quanto ao feijão, os isolados deste apresentaram identidade sorológica apenas com a SMS-731, recomendada para o feijão, sendo que essa estirpe formou um sorogrupo

Tabela 17. Reações sorológicas entre antígenos preparados com isolados de crotalária e antissoros obtidos de estirpes de referência.

Isolado	AS-633(1)	AS-634	AS - 731
C1 A	+	-	-
C2 A	+	-	-
C3 A	-	-	-
C4 A	+	+	-
C5 A	-	-	-
C6 A	+	-	-
C1 C	-	-	-
C2 C	+	-	-
C3 C	-	-	-
C4 C	+	-	-
C5 C	-	+	-
C6 C	+	-	-
C1 MA	+	-	-
C2 MA	-	-	-
C3 MA	+	-	-
C4 MA	+	-	-
C5 MA	-	+	-
C6 MA	-	+	-
633	+	-	-

(1) AS-633: antissoro obtido da estirpe SMS-633
Bradyrhizobium sp.

AS-634: antissoro obtido da estirpe SMS-634
Bradyrhizobium sp.

AS-731: antissoro obtido da estirpe SMS-731
Rhizobium tropici

Tabela 18. Reações sorológicas entre antígenos preparados com isolados de feijão e antissoros obtidos de estirpes de referência.

Isolado	AS-633(1)	AS-634	AS-731
F1 A	-	-	-
F2 A	-	-	+
F3 A	-	-	+
F4 A	-	-	-
F5 A	-	-	+
F6 A	-	-	-
F1 C	-	-	+
F2 C	-	-	+
F3 C	-	-	-
F4 C	-	-	-
F5 C	-	-	+
F6 C	-	-	+
F1 MA	-	-	-
F2 MA	-	-	-
F3 MA	-	-	+
F4 MA	-	-	+
F5 MA	-	-	-
F6 MA	-	-	-
F1 Pma	-	-	-
F2 Pma	-	-	+
F3 Pma	-	-	-
F4 Pma	-	-	-
F5 Pma	-	-	+
F6 Pma	-	-	-
731	-	-	+

(1) AS-633: antissoro obtido da estirpe SMS-633
Bradyrhizobium sp.

AS-634: antissoro obtido da estirpe SMS-634
Bradyrhizobium sp.

AS-731: antissoro obtido da estirpe SMS-731
Rhizobium tropici

Tabela 19. Reações sorológicas entre antígenos preparados com isolados de guandu e antissoros obtidos de estirpes de referência.

Isolado	AS-633(1)	AS-634	AS-731
G1 A	-	+	-
G2 A	+	-	-
G3 A	+	+	-
G4 A	-	-	-
G5 A	-	-	-
G6 A	+	+	-
G1 C	-	+	-
G2 C	-	-	-
G3 C	-	-	-
G4 C	-	+	-
G5 C	+	+	-
G6 C	-	+	-
G1 MA	+	-	+
G2 MA	+	+	-
G3 MA	+	-	-
G4 MA	-	-	-
G5 MA	-	+	-
G6 MA	-	+	+
G1 P	-	-	+
G2 P	-	-	-
G3 P	-	-	+
G4 P	-	+	-
G5 P	+	+	-
G6 P	-	-	-
G1 Pma	-	+	-
G2 Pma	-	+	+
G3 Pma	+	-	-
G4 Pma	+	-	-
G5 Pma	-	-	-
G6 Pma	+	+	+
634	-	+	-

(1) AS-633: antissoro obtido da estirpe SMS-633
Bradyrhizobium sp.

AS-634: antissoro obtido da estirpe SMS-634
Bradyrhizobium sp.

AS-731: antissoro obtido da estirpe SMS-731
Rhizobium tropici

com 14 dos 24 isolados, os quais ocorreram em todos os solos onde a leguminosa nodulou.

Houve elevado índice de reações homólogas, isto é, positivas, entre os isolados do guandu e as três estirpes de referência. Dos 30 isolados, 12 reagiram com a SMS-633 (crotalária), 6 com a SMS-731 (feijão) e 15 com a SMS-634 (guandu). É interessante observar que o guandu foi a única leguminosa que nodulou em todos os solos e a que apresentou a menor especificidade hospedeira.

Pelo dendrograma da figura 22 observa-se que houve a formação de dois grupos de identidade sorológica, entre os isolados da crotalária sendo que no maior inclue-se a SMS-633 e isolados do PVD de Anhembi, do LVA de Campinas e do LR de Morro Agudo. Em outro grupo apenas 3 isolados foram sorologicamente iguais. Os graus de similaridade foram baixos e inexistentes para 5 dos isolados.

Para o feijão formou-se apenas um grupo de igualdade sorológica com isolados procedentes dos 4 solos e a SMS-731 como pode ser observado na figura 23. Os demais diferiram entre si e do grupo de identidade formado.

Houve cinco pequenos sorogrupos entre os isolados do guandu (figura 24), os quais apresentaram graus de semelhança variados. Apenas 10 dos isolados foram diferentes entre si e dos demais isolados. No caso da caracterização sorológica, para os isolados de qualquer

Figura 22 Dendrograma ilustrando o relacionamento sorológico entre isolados de crotalaria.

Figura 23 Dendrograma ilustrando o relacionamento sorológico entre isolados de feijão.

Figura 24 Dendrograma ilustrando o relacionamento sorológico entre isolados de guandu.

leguminosa, os sorogrupos formados continham isolados de todos os solos. Não houve uma tendência de formação de sorogrupos contendo isolados somente de um solo.

Quando todos os isolados foram agrupados num só dendrograma (figura 25), observa-se que os grupos de identidade formados continham isolados de pelo menos duas leguminosas, onde incluíram-se isolados de crotalária, guandu, SMS-633 e SMS-634, unidos por graus de semelhança variados, formando 3 diferentes grupamentos. Outro grupamento continha 12 isolados de feijão, a SMS-731 e 2 isolados de guandu. Os demais isolados não formaram grupamentos e não se assemelharam a qualquer dos outros isolados.

4.8. Discussão geral

Observa-se, diante do exposto, que as características químicas dos solos utilizados exerceram influência na ocorrência dos rizóbios e dessas características, a presença do alumínio em concentrações elevadas parece ter sido um fator que condicionou a presença desses microrganismos nos solos. O LR de Morro Agudo, que apresentou boas condições de fertilidade, foi o que abrigou maior número de rizóbios para as três leguminosas. Nos

Figura 25 Dendrograma ilustrando o relacionamento sorológico entre os isolados de crotalária, feijão e guandu.

demaís solos, embora apresentassem baixos índices de pH, as concentrações de alumínio não foram suficientemente elevadas para permitir a ausência de rizóbios. A acidez dos solos apenas reduziu o número de células.

Em toda a literatura sobre os efeitos da acidez e dos fatores a ela associados, constata-se que esse parâmetro pode tornar inexistente ou reduzir a população de rizóbios, principalmente se estiver aliada a altas concentrações de alumínio (RICE et al., 1977 e COVENTRY et al., 1985).

A tolerância dos rizóbios à acidez e ao alumínio não dependeu da presença desses fatores no solo de origem dos microrganismos, contrariando a hipótese deste trabalho de que solos com índices mais altos de pH e sem concentrações altas de alumínio trocável poderiam abrigar comunidades mais sensíveis. Em todos os solos ocorreram rizóbios sensíveis e tolerantes tanto à acidez como ao alumínio. Esses dados concordam com os trabalhos da literatura e também mostram que a tolerância à acidez e ao alumínio não está obrigatoriamente ligada à ocorrência desse fatores no solo de origem.

Nota-se que no LR de Morro Agudo, que apresentou boas condições de fertilidade, ocorreu o menor número de isolados sensíveis à acidez. No entanto nesse solo, o número de rizóbios que toleraram concentrações de alumínio

de até 100 μM , foi maior que o do PVd de Anhembi e em alguns casos, o de Campinas, apesar de serem mais ácidos.

Ao se analisar a tabela 13 nota-se que os isolados da crotalária foram os mais sensíveis à acidez e ao alumínio, em relação aos isolados do feijão e do guandu. A classificação de JORDAN (1984) aponta os representantes do gênero *Bradyrhizobium* como frequentemente tolerantes a acidez, mas existindo células que fogem a essa condição. Então os isolados da crotalária estão dentro das exceções, confirmando que a generalização de determinadas características é perigosa, principalmente quando está envolvido o manejo do sistema simbiótico rizóbio/leguminosa.

A variação na tolerância a acidez e ao alumínio entre isolados de feijão é fato constatado e essa tolerância é uma das características de *Rhizobium tropici*. Isolados de guandu mostraram a mesma tendência dos isolados do feijão.

Muitos autores citam a importância de se considerar a tolerância à acidez e ao alumínio em testes de seleção, pois essa característica propicia vantagens em termos de sobrevivência (RAMOS et al., 1987, e HARTEL & BOUTON, 1991).

Considerando que as condições de acidez e presença de alumínio, natural ou provocada é frequente em solos do Estado de São Paulo, essa característica deveria ser

considerada em testes de seleção, iniciando-se por um levantamento "in vitro" seguido de experimentos de inoculação em plantas cultivadas em condições de baixos índices de pH e presença de alumínio. Se atualmente a tolerância de leguminosas a condições de estresse é considerada em melhoramento, a seleção do rizóbio quanto a essas características é altamente viável.

Quanto à tolerância a antibióticos observou-se que a maioria deles tolerou a maior concentração de qualquer dos antibióticos testados. Também neste caso os isolados da crotalária mostraram-se como sendo os mais sensíveis, contrariando a classificação de JORDAN (1984) que considera a maior tolerância a esses compostos como uma característica comum a *Bradyrhizobium* spp. Não houve tendência de isolados mais tolerantes serem procedentes de solos com maior valor de pH. Em qualquer dos solos observaram-se isolados sensíveis ou tolerantes aos antibióticos. O que foi observado é que determinados isolados mostraram maior sensibilidade a um antibiótico.

Quanto à diversidade, observa-se pelos dados obtidos que houve diferença entre as comunidades estudadas .

A presença do hospedeiro específico é outro fator importante na determinação da ocorrência dos rizóbios homólogos. Em qualquer dos locais estudados a vegetação natural era de mata, cerrado e cerradão e a ocorrência

específica de crotalária, guandu ou feijão não foi detectada. Mesmo no solo de pastagem não foram observadas quaisquer das leguminosas estudadas. No entanto como a família *Leguminosae* é a que tem um dos maiores números de espécies em nossa flora, foram observados rizóbios capazes de nodular qualquer uma das leguminosas, embora no geral em número baixo. Autores como RUPELA et al., (1987), THURMAN & BROMFIELD (1988) e SANGINGA et al., (1994) ressaltam o fato de que a presença do hospedeiro como integrante da vegetação natural ou o cultivo frequente da leguminosa, seleciona e aumenta a comunidade do rizóbio a ela homólogo.

Quando os isolados foram testados quanto à especificidade hospedeira, o feijão foi a leguminosa mais específica, seguida pelo amendoim, crotalária e por último o guandu que se mostrou como a mais promíscua.

Os isolados que nodularam o amendoim foram de crescimento lento. Essa leguminosa nodulou com isolados de crotalária e guandu. Embora o amendoim já tenha sido considerado como altamente promíscuo quanto à nodulação, vários autores tem mostrado certo grau de especificidade nessa leguminosa conforme comentado na revisão de literatura.

Embora todos os isolados da crotalária tenham apresentado crescimento lento, essa foi capaz de nodular com isolados de guandu, mesmo as que apresentaram

crescimento rápido. O guandu nodulou com isolados de crotalária e alguns de feijão, mostrando baixo grau de especificidade hospedeira.

Na literatura cita-se o guandu como capaz de nodular tanto com rizóbios de crescimento lento como com rizóbios de crescimento rápido.

BROMFIELD & KUMAR RAO (1983) determinando algumas características de rizóbios isolados de guandu, observaram representantes de crescimento lento e de crescimento rápido que ocorreram mesmo num único nódulo. No entanto todos os isolados de crescimento rápido produziram reação ácida no meio de cultura, enquanto que os de crescimento lento produziram reação de neutra a alcalina. No presente trabalho também obtiveram-se isolados de crescimento lento e rápido. No entanto estes últimos produziram reação de neutra a levemente alcalina. Dentre 38 isolados de guandu, 32 eram de crescimento lento conforme evidenciaram ANAND & DOGRA (1991) num estudo sobre caracterização fisiológica e bioquímica desses rizóbios. Segundo esses pesquisadores, as diferenças deram-se também quanto à tolerância a diversos antibióticos, sendo que os de crescimento rápido foram tolerantes à estreptomicina e eritomicina, enquanto que os de crescimento lento resistiram melhor à neomicina, canamicina e tetraciclina. Os isolados do guandu obtidos neste trabalho apresentaram no geral alto nível de

resistência aos 7 antibióticos testados. Baixa tolerância foi observada nos isolados do LVa de Campinas quanto à espectinomicina e nos isolados do LAa de Pariquera-Açu quanto à eritromicina. Os resultados obtidos com os isolados do LAa de Pariquera-Açu foram todos de crescimento rápido e sensíveis à eritromicina, discordando nesse aspecto com os resultados de ANAND & DOGRA (1991).

Houve diversidade sorológica, mas em todos os solos ocorreram isolados com o mesmo padrão sorológico das estirpes de referência, para as três leguminosas.

As diferenças obtidas com os perfis enzimáticos dos isolados mostraram maior diversidade entre as três comunidades caracterizadas tanto dentro de um mesmo solo como entre os solos.

Há necessidade de um comentário sobre os testes realizados. KINGSLEY & BOHLOOL (1983) já alertavam para o cuidado na utilização de um só teste para se identificar isolados, recomendando que pelo menos os dois testes fossem utilizados quando optavam-se pela sorologia e tolerância a antibióticos. Os resultados do presente trabalho estão de acordo com esses autores e mesmo a escolha desses dois métodos deve ser cuidadosa na determinação da diversidade, pois nas doses dos antibióticos testados seria difícil separar isolados e pelos testes sorológicos, em todos os solos observaram-se reações homólogas.

A determinação dos perfis enzimáticos de alfa e beta-esterases foram os mais sensíveis para detectar diferenças entre isolados. O teste é simples e rápido e fornece resultados mais confiáveis que a tolerância a antibióticos e a sorologia. A formação de uma ou poucas bandas pode ter sido atribuída à produção de goma, comum em rizóbios. Há necessidade de se adaptar melhor a metodologia para verificar qual componente limita a formação de bandas. A padronização das condições das culturas como idade ou a utilização de indutores enzimáticos deve ser avaliada, pois ENGVILD & NIELSEN (1985) apontam esses fatores como influentes nos resultados. Mas mesmo assim consideram o método como bastante útil para identificação de estirpes.

Quando todas as características foram juntadas para separar os isolados, observa-se que mesmo existindo certo grau de semelhança entre os isolados, foram raros os casos de grupamentos idênticos como mostram os dendrogramas das figuras 26, 27, 28 e 29. Esse fato já não acontece quando uma só característica é estudada, pois observam-se diversos grupamentos com características iguais.

Nota-se que isolados de feijão e guandu foram semelhantes quanto à tolerância a acidez, alumínio e antibióticos, no entanto dispersaram quando os outros testes foram utilizados na elaboração do dendrograma.

Figura 26 Dendrograma ilustrando o relacionamento entre os isolados da crotalária, quanto às cinco características estudadas.

Figura 27 Dendrograma ilustrando o relacionamento entre os isolados do feijão, quanto às cinco características estudadas.

Figura 28 Dendrograma ilustrando o relacionamento entre os isolados do guandu, quanto às cinco características estudadas.

Figura 29 Dendrograma ilustrando o relacionamento entre os isolados da crotalária, do feijão e do guandu, quanto às cinco características estudadas.

O fato de que isolados de guandu se assemelharam aos de feijão em alguns testes e aos de crotalária em outros, surge que parece haver um grupo intermediário entre os *Rhizobium* spp. e *Bradyrhizobium* spp. tropicais.

De acordo com a teoria sobre a evolução das leguminosas proposta por NORRIS (1965), os rizóbios de crescimento lento produtores de álcali representam uma forma ancestral dos rizóbios de crescimento rápido.

Em recente artigo de revisão MARTÍNEZ-ROMERO (1994) discute várias hipóteses sobre a evolução dos rizóbios. Por meio de técnicas mais refinadas de genética molecular tem sido sugerido que linhagens de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* diferem antes da origem das leguminosas e que subsequentemente as informações requeridas para a formação dos nódulos foram transferidas de um gênero para outro. Esse fluxo de informações teria se dado de *Bradyrhizobium* para *Rhizobium*.

Na revisão de MARTÍNEZ-ROMERO (1994), evidencia-se que no solo pode haver transferência de material genético. Essa afirmação baseia-se no fato de que embora plasmídeos não sejam comuns em *Bradyrhizobium*, pode ser encontrado em algumas estirpes desse gênero e alguns pesquisadores citados por MARTÍNEZ-ROMERO (1994) afirmam que a transferência de material genético ocorreria com frequência maior no solo do que "in vitro" .

Essa seria uma das hipóteses para explicar os grupos intermediários que contém isolados com características de *Bradyrhizobium* e *Rhizobium*.

Neste trabalho os isolados da crotalária apresentaram característica típica de *Bradyrhizobium* como crescimento lento, morfologia da colônia e produção de álcali no meio ELMA e não nodularam o feijão. Já a maioria dos isolados do guandu apresentaram crescimento rápido e morfologia da colônia típicas do gênero *Rhizobium*, mas foram produtores de álcali no meio ELMA, característica típica de *Bradyrhizobium*.

O presente trabalho foi uma pequena contribuição para o conhecimento de alguns rizóbios nativos e os resultados aqui obtidos são muito escassos para definir novas espécies. No entanto, esses isolados devem ser caracterizados por técnicas mais refinadas de genética molecular.

Alguns dos solos apresentaram número baixo de rizóbios, o que poderia favorecer a introdução de estirpes selecionadas. Muitas vezes o manejo adequado do sistema propicia condições para que os rizóbios nativos já adaptados formem uma simbiose eficiente com a cultura em questão, como comprovou VIEIRA (1994) ao observar que a adição do molibdênio por via foliar aumentou a atividade da

nitrogenase no feijoeiro, independentemente da estirpe se inoculada ou não.

Portanto o conhecimento das comunidades nativas por meio das mais diversas técnicas é de enorme importância para se conhecer a diversidade das espécies. A diversidade é o principal recurso para a biotecnologia (BULL et al., 1992).

5. CONCLUSÕES

- 1 - Houve diversidade dos rizóbios isolados sendo observadas maiores diferenças entre os isolados das diferentes leguminosas.
- 2 - A acidez do solo associada à presença do alumínio trocável influenciou a presença e o número dos rizóbios nos solos.
- 3 - As características químicas dos solos amostrados não exerceram influência marcante nas características dos rizóbios, como tolerância à acidez, ao alumínio e a antibióticos.
- 4 - O feijão mostrou-se como a leguminosa mais específica, seguido pelo amendoim, crotalária e por último o guandu que foi o mais promíscuo.
- 5 - Testes utilizados com frequência na identificação de rizóbios, como sorologia e tolerância a antibióticos, não são eficientes para separar os diferentes isolados.
- 6 - A determinação dos perfis de alfa e beta esterases foram os mais sensíveis para detectar diferenças entre isolados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARONS, S.R. & GRAHAM, P.H. Response of *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* to acidity. In: WRIGHT, R.J.; BALIGAR, V.C. & MURRMAN, R.P. (ed.) Plant-soil interactions at low pH. Dordrecht. Kluwer Academic Publishers, 1991, Section 4, 581-587.
- ABAIDOO, R.V.; GEORGE, T.; BOHLOOL, B.B. & SINGLETON P.W. Influence of elevation and applied Nitrogen on rhizosphere colonization and competition for nodule ocupance by different rhizobial strains on field grown soybean and common bean. Can. J. Microbiol., Ottawa, 36: 92-96, 1990.
- AMARGER, N. & LOBREAU, J.P. Quantitative study of nodulation competitiveness in *Rhizobium* strains. Appl. Environ. Microbiol. Baltimore, 44: 583-588, 1982.
- ANAND, R.C. & DOGRA, R.C. Physiological and biochemical characteristics of fast and slow-growing *Rhizobium* sp. of pigeon pea (*Cajanus cajan*). The Journal of Applied Bacteriology, London 70 (3): 197-201, 1991.
- ANDREANI, D.I.K. Isolamento e caracterização de populações heterogêneas e mutantes espontâneos de duas estirpes de *Bradyrhizobium* spp. Jaboticabal, 1992. 132p. (Mestrado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP).

- ARAUJO, R.S.; ROBLETO, E.A. & HANDELSMAN, J. A hydrophobic mutant of *Rhizobium etlii* altered in nodulation competitiveness and growth in the rhizosphere. Appl. Environ. Microbiol., Baltimore, 60: 1430-1436, 1994.
- AYANABA, A.; ASANUMA, S. & MUNNS, D.N. An agar plate method for rapid screening of *Rhizobium* for tolerance to acid-aluminium stress. Soil Sci. Soc. Am. J., Madison, 47: 256-258, 1983.
- BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.; XAVIER, D.F.; BODEY, R.M. & DOBEREINER, J. Efeito da calagem no número de actinomicetos e na porcentagem de bactérias resistentes à estreptomicina na rizosfera de milho, trigo e feijão. Rev. Microbiol., São Paulo, 13: 250-263, 1982.
- BEATTIE, G.A.; CLAYTON, M.K. & HANDELSMAN, J. Quantitative comparison of the laboratory and field competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. Appl. Environ. Microbiol., Baltimore, 55: 2755-2761, 1989.
- BECK, D.P. & MUNNS, D.N. Phosphate nutrition of *Rhizobium* sp. Appl. Environ. Microbiol., Baltimore, 47: 278-282, 1984.
- BHUVANESVARI, T.V. & SOLHEIN, B. Root hair deformation in white-clover *Rhizobium trifolii* symbiosis. Physiol. Plant., Copenhagen, 63: 25-34, 1985.
- BROCKMAN, F.J. & BEZDICEK, D.F. Diversity within serogroups of *R. leguminosarum* bv. *viciae* in The Palouse region of eastern Washington, USA as indicated by plasmid profiles, intrinsic antibiotic resistance and

topography. Appl. Environ. Microbiology, Baltimore 55: 109-115, 1989.

BROMFIELD, E.S.P. & JONES, D.G. The competitive ability and symbiotic effectiveness of doubly labeled antibiotic resistant mutants of *Rhizobium trifolii*. Annals of Appl. Biol., London, 91: 211-219, 1979.

BROMFIELD, E.S.P. & KUMAR RAO, J.V.D.K. Studies on fast and slow growing *Rhizobium* spp. nodulating *Cajanus cajan* and *Cicer arietinum*. Ann. appl. Biol., Oxford, 102: 485-493, 1983.

BRYAN, O.C. Effect of soils on nodule forming bacteria. Soil Sci., Baltimore, 15: 37-40, 1923.

BULL, A.T.; GOODFELLOW, M. & SLATER, J.H. Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. Ann. Rev. Microbiol., Palo Alto, 46:219-252, 1992.

BUSSAB, W.O.; MIAZAK, E.S. & ANDRADE, D.F. Introdução à análise de agrupamentos . Associação Brasileira de Estatística - 9^o. Simpósio Nacional de Probabilidades Estatísticas. SP, Julho de 1990.

BUSHBY, H.V.A. Quantitative estimation of rhizobia in non-sterile soil using antibiotics and fungicides. Soil Biol. Biochem., Oxford, 13: 237-239, 1981.

CASSMAN, K.G.; MUNNS, D.N. & BECK D.P. Growth of *Rhizobium* strains at low concentration of phosphate. Soil Sci. Soc. Am. J., Mdison, 45: 520-523, 1981.

- CHADA, S.S. & DE-POLLI, H. Nodulação de leguminosas tropicais promissoras para adubação verde em solo deficiente em fósforo. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 23(11): 1197-1202, 1988.
- CHAMBER, M.A. & IRUTHAYATHAS, E.E. Nodulation and nitrogen fixation by fast and slow-growing rhizobia strains of soybean on several temperate and tropical legumes. *Plant and soil*, The Hague, 112:239-245, 1988.
- CHAN, C.L.; LUMPKIN, T.A. & ROOT, C.S. Characterization of *Bradyrhizobium* sp. (*Astragalus sinicus* L.) using serological agglutination, intrinsic antibiotic resistance, plasmid visualization and field performance. *Plant and Soil*, The Hague, 109: 85-91, 1988.
- CHATEL, D.L. & PARKER, C.A. Inibition of rhizobia by toxic soil-water extracts. *Soil. Biol. Biochem.*, Oxford, 4: 289-294, 1968.
- CHEN, W.X.; YAN, G.H. & LI, J.L. Numerical Toxonomy study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *Int. J. Syst. Bact.*, Baltimore, 38: 392-397, 1988.
- CHEN, W.X.; LI, G.H. & QI, Y.L. *Rhizobium huakuii* from the root nodules of *Astragalus sinicus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, Baltimore, 41: 275-280, 1991.
- COVENTRY, D.R.; HIRTH, J.R.; REEVES, T.J. & JONES, H.R. Development of *Rhizobium trifolii* and nodulation of subterranean clover following the cropping phase in

crop-pasture rotations in south-eastern Australia. Soil Biol. Biochem., Oxford, 17: 17-22, 1985.

DAMIRGI, S.M. & JOHNSON, H.W. Effect of soil actinomycetes on strains of *Rhizobium japonicum*. Agron. J., Madison, 58: 223-224, 1966.

DANSO, S.K.A. & OWIREDU, J.D. Competitiveness of introduced and indigenous cowpea *Bradyrhizobium* strains for nodule formation on cowpeas (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) in tree soils. Soil. Biol. Biochem., Oxford, 20(3): 305-310, 1988.

DATE, R.A. & HALLIDAY, J. Selecting *Rhizobium* for acid infertile soils of the tropics. Nature, London, 277: 62-64, 1979.

DAZZO, F.B.; TRUCHET, G.L.; SHERWOOD, J.E.; HRABAK, E.M.; ABE, M. & PANKRATZ, S.H. Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifolii* - clover symbiosis. Appl. Environ Microbiol., Baltimore, 48: 1140-1150, 1984.

DEMEZAS, D.H. & BOTTOMLEY, P.J. Identification of two dominant serotypes of *Rhizobium trifolii* in root nodules of uninoculated field-grown subclover. Soil. Sci. Soc. Am. J., Madison, 48: 1067-1071, 1984.

DREYFUS, B.L. & DOMMERGUES, Y.R. Nodulation of *Acacia* species by fast and slow growing tropical strains of *Rhizobium*. Appl. Environ. Microbiol., Baltimore, 41: 97-99, 1981.

- DREYFUS, B.; GARCIA, J.L. & GILLIS, M. Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov., sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. Int. J. Syst. Bact., Baltimore, 38: 89-98, 1988.
- EAGLESHAM, A.R.J. The use of intrinsic antibiotic resistance for *Rhizobium* study. In: ELKAN, G.H. (ed.) Symbiotic Nitrogen Fixation Technology, New York, Marcel Dekker Inc., 1987, p. 185-204.
- EAGLESHAM, A.R.J.; STOWERS, M.D.; SINCLAIR, M.J.; AYANABA, A. & GOLDMAN, B.J. Patterns of diversity of cowpea-miscellany rhizobia from tree west African locations. IN: Ghai, b.s.(ED.) Symbiotic Nitrogen Fixation I, Ludhiana, VSG Publishers & Distributors, 1984, p.119-125.
- ELKAN, G.H. Taxonomy of the rhizobia. Can. J. Microbiol., Ottawa, 38: 446-450, 1992.
- ENGVILD, K.C. & NIELSEN, G. Strain identification in *Rhizobium* by starch gel electrophoresis of isoenzymes. Plant and Soil, The Hague, 87: 251-256, 1985.
- FRANCO, .A. & SOUTO, S.M. Contribuição da fixação biológica do N_2 na adubação verde. In: FUNDAÇÃO CARGILL (ed.) Adubação verde no Brasil. Campinas, Fundação Cragill, 1984, p. 199-215.
- FRED, E.B.; BALDWIN, I.L. & Mc COY, E. Root Nodule Bacteria. Unibversity of Wisconsin Studies. Madison, 1932, 343p.

- FONSECA, S.M.; SAITO, S.M.T. & VIDOR, C. A vantagem dos mutantes resistentes à streptomicona. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 20: 609-614, 1985.
- FUQUAY, J.I.; BOTTOMLEY, P.J. & JENKINS, M.B. Complementary methods for differentiation of *Rhizobium meliloti* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, Baltimore, 47: 663-669, 1984.
- GEMELL, L.C. & ROUGHLEY, R.I. Field evaluation in acid soils of strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* selected for their tolerance or sensitivity to acid soil factors in agar medium. *Soil Biol. Biochem.*, Oxford 25 (10): 1447-1452., 1993.
- GIARDINI, A.R.; LOPES, E.S. & NEPTUNE, A.M.L. Pré-seleção de estirpes de *Rhizobium* sp. para amendoim. *Bragantia*, Campinas, 43: 389-396, 1984.
- GIARDINI, A.R.; LOPES, E.S.; SAVY F⁰., A. & NEPTUNE, A.L.M. Inoculação com *Rhizobium* e aplicação de nitrogênio em amendoim. *Bragantia*, Campinas, 44: 27-39, 1985.
- GILLMAN, G.P. The chemical properties of acid soils with emphasis on soils of the humid tropics. In: WRIGHT, R.J.; BALIGAR, V.C. & MURRMAN, R.P. (ed.) *Plant-soil interactions at low pH*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1991, Section 4, 603-609.
- GLENN, A.R. & DILWORTH. Soil acidity and the microbial population: survival and growth of bacteria in low pH. In: WRIGHT, R.J.; BALIGAR, V.C. & MURRMAN, R.P. (ed.)

Plant-soil interactions at low pH. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1991, Section 4, 567-579.

GRAHAM, P.H.; VITERI, S.E.; MACKIE, F.; VARGAS, A.A.T. & PALACIOS, A. Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. Field Crop Research, Amsterdam, 5: 121-128, 1982.

GUPTA, R.P.; KALRA, M.S. & SCHOO, M.S. Intrinsic multiple antibiotic resistance markers for clover cultivar and *Rhizobium* strain interaction. Trop. Agric., Trinidad, 66: 313-316, 1989.

GURGEL, J.T.A. & AZEVEDO, J.L. Resistência de microrganismos aos antibióticos. In: LACAZ, P.S. *Antibióticos*, 2^a ed., São Paulo, SARVIER-Editora da USP, 1969. p.322-347.

HAGEDORN, C. Relationship of antibiotic resistance to effectiveness in *Rhizobium trifolii* populations. Soil Sci. Soc. Am. J., Madison, 43: 921-925, 1979.

HARTEL, P.G. & BOUTON, J.H. *Rhizobium meliloti* inoculation of alfafa selected for tolerance to acid aluminium-rich soils. In: WRIGHT, R.J.; BALIGAR, V.C. & MURRMAN, R.P. ed. Plant-soil interactions at low pH. Dordrecht Kluwer Academic Publishers, 1991, Section 4, 597-601.

HERNANDEZ, B.S. & FOCHT, D.D. Invalidity of the concept of slow growing and alkali production in cowpea rhizobia. Appl. Environ. Microbiol., Baltimore, 48: 206-210, 1984.

- HODGE, T.J.V. The effect of lime, nitrogen and *Rhizobium* inoculation on dry top production, nutrient concentration and nodulation of subterranean clover grown on an acid siliceous sand. In: WRIGHT, R.J.; BALIGAR, V.C. & MURRMAN, R.P. ed., Plant-soil interactions at low pH. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1991, Section 4: 633-640.
- HOWIESON, J.G.; ROBSON, A.D. & ABBOT, L.K. Calcium modifies pH effects on the growth of acid tolerant and acid sensitive *Rhizobium meliloti* Austr. J. of Agric. Res., Melbourne, 43: 765-772, 1992.
- HUNGRIA, M.; FRANCO, A.A. & SPRENT, J. New sources of high-temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris* Plant and Soil., The Hague, 149: 103-109, 1993.
- IPAGRO-MIRCEN *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* culture collection catalogue, 6th. ed., Porto Alegre, 1991, 41p.
- JENKINS, M.B. & BOTTOMLEY, Evidence for a strain of *Rhizobium meliloti* dominating the nodules of alfalfa. Soil Sci. Soc. Am. J., Madison, 49: 326-328, 1985.
- JOHNSON, A.C. & WOOD, M. DNA, a possible site of action of aluminum in *Rhizobium* spp. Appl. Environ Microbiol., Baltimore, 56: 3629-3633, 1990.
- JORDAN, C.D. Family III. *Rhizobia* Conn 1938. In: KRIEG, N.R. & HOLT, J.G. (ed.) Bergey's manual of Systematic Bacteriology, vol.1. Baltimore, The Williams & Wilkins Co., 1984, 234-254.

KAMICKER, B.J. & BRILL, W.J. Identification of *Bradyrhizobium japonicum* nodule isolates from Wisconsin Soybeans farms. Appl. Environ. Microbiol., Baltimore, 51: 487-492, 1986.

KEYSER, H.H. & MUNNS, D.N. Effects of calcium, manganese and aluminum on growth of *Rhizobia* in acid media. Soil Sci. Soc. Am. J., Madison, 43: 500-503, 1979a.

KEYSER, H.H. & MUNNS, D.N. Tolerance of *Rhizobia* to acidity, aluminum and phosphate. Soil Sci. Soc. Am. J., Madison, 43: 519-523, 1979b.

KINGSLEY, M.T. & BOHLOOL, B.B. Characterization of *Rhizobium* sp. (*Cicer arietinum*) by immunofluorescence, immunodifusion and intrinsic antibiotic resistance. Can. J. Microbiol., Ottawa, 29: 518-526, 1983.

KREMER, R.J. & PETERSON, H.L. Nodulation efficiency of legume inoculation as determined by intrinsic antibiotic resistance. Appl. Environ. Microbiol., Baltimore, 636-642, 1982.

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. Can. J. Microbiol., Ottawa, 38:501-505, 1992

LABANDERA, C.A. & VINCENT, J.M. Competition between an introduced strain and native uruguayan strains of *Rhizobium trifolii*. Plant and Soil, The Hague, 42: 327-347, 1975.

- LACAZ, P.S. Aspectos bioquímicos e mecanismos de ação. In: LACAZ, *Antibióticos*, 2^a ed., São Paulo, SARVIER-Editora da USP, 1969, p.107-135.
- LAGUERRE, G.; FERNANDEZ, M.P.; EDEL, V.; NORMAND, P. & AMARGER, N. Genomic heterogeneity among French *Rhizobium* strains isolated from *Phaseolus vulgaris* L. Int. J. Syst. Bacteriol., Baltimore, 43: 761-767, 1993.
- LAWRIE, A.C. Relationship among rhizobia from native Australian legumes. Appl. and Environ. Microbiol., Baltimore, 45(6): 1822-1828, 1983.
- LEUNG, K.; YAP, K.; DASHTI, N. & BOTTOMLEY. Serological and ecological characteristics of a nodule dominant serotype from an indigenous soil population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Appl. Environ. Microbiol., Baltimore, 60: 408-415, 1994.
- LEPSCH, I.F. & VALADARES, J.M.A.S. Levantamento pedológico detalhado da Estação Experimental de Pindorama (SP). Bragantia, Campinas, 35(2):13-40, 1976.
- LI, D.M. & ALEXANDER, M. Co-inoculation with antibiotic-producing bacteria to increase colonization and nodulation by rhizobia. Plant and Soil, The Hague, 108: 211-219, 1988.
- LI, D.M. & ALEXANDER, M. Factors affecting co-inoculation with antibiotic-producing bacteria to rhizobia colonization and nodulation. Plant and Soil, The Hague, 129: 195-201, 1990.

LINDSTROM, K. *Rhizobium galegae*, a new species of legume root nodule bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol., Baltimore, 39: 365-367, 1989.

LINDSTROM, K. & MYLLYNIEMI, H. Sensitivity of red clover rhizobia to soil acidity factors in pure culture and in symbiosis. Plant and Soil, The Hague, 98: 353-362, 1987.

LOMBARDI, M.L.C.O.; LOPES, E.S.; FREITAS, S.S.; NOVO, M.C.S.S.; LASCA, D.H.C.; STIVARI, A. & CERÁVULO, L.C. Resposta do amendoim à inoculação com estirpes de *Bradyrhizobium* spp. em duas regiões paulistas. R. bras. Ci. Solo, Campinas, 177-181, 1992.

LOMBARDI, M.L.C.O. & OLIVEIRA, P.A. Eficiência de estirpes de *Bradyrhizobium* sp. na fixação do nitrogênio em amendoim (*Arachis hypogea* L.). Rev. Microbiol., São Paulo, 22: 253-256, 1990.

LOPES, E.S. & GIARDINI, A.R. Presença e eficiência de *R. japonicum* em solos cultivados ou não com soja no Estado de São Paulo. Bragantia, Campinas, 35: 389-396, 1976,

LOPES, E.S.; LOVADINI, L.A.C.; GARGANTINI, H. & IGUE, T. Número mais provável e eficiência de *Rhizobium* autóctone para soja perene e siratro em quatro grandes grupos de solos do Estado de São Paulo. Bragantia, Campinas, 31: 236-247, 1972 .

LOVATO, P.E.; PEREIRA, J.C. & VIDOR, C. Flutuação populacional de *Rhizobium phaseoli* em solos com e sem calagem. R. bras. Ci. Solo, Campinas, 9: 9-12, 1985.

- LOWENDORF, H.S.; BAYA, A.M. & ALEXANDER, M. Survival of *Rhizobium* in acid soils. Appl. Environ. Microbiol., Baltimore, 43: 951-957, 1981.
- Mc LOUGHLIN, T.G.; BORDELEAU, L.M & DUNICAN, L.K. Competition studies with *Rhizobium trifolii* in a field experiment. J. Appl. Bacteriol., London, 56: 131-135, 1984.
- MANTOVANI, W. Composição e similaridade florística, fenologia e espectro biológico do cerrado da reserva biológica de Mogi-Guaçu, Estado de São Paulo, Campinas, 1983. 147p. (Mestrado, Instituto de Biologia/ UNICAMP).
- Mc LOUGHLIN, T.G.; BORDELEAU, L.M & DUNICAN, L.K. Competition studies with *Rhizobium trifolii* in a field experiment. J. Appl. Bacteriol., London, 56: 131-135, 1984.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E. Recent development in *Rhizobium* taxonomy. Plant and Soil, The Hague, 161: 11-20, 1994.
- MARTÍNEZ-ROMERO, E.; SEGÓVIA, L.; MERCANTE, F.M.; FRANCO, species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. Int. J. Syst. Bacteriol, Baltimore 41: 417-426, 1991.
- MATTHES, L.A.F.; LEITÃO, F⁰. H.F. & MARTINS, F.R.M. Bosque dos Jequitibás (Campinas, SP): composição florística e estrutura fitossociológica do estrato arbóreo. In: Congresso da Sociedade de Botânica de São Paulo, 5. São Paulo, 1988. Anais, São Paulo, SBSP, 1988. p.55-76.

- MIYASAKA, S.; CAMARGO, A.P.; INFORZATO, R. & IGUE, T. Efeitos da cobertura e da incorporação ao solo imediatamente antes do plantio, de diferentes formas de matéria orgânica não decomposta na cultura do feijoeiro. *Bragantia*, Campinas, 25: 349-363, 1966.
- MOAWAD, H. & BOHLOOL, B.B. Competition among *Rhizobium* spp. for nodulation of *Leucena leucocephala* in two tropical soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, Baltimore, 48: 5-9, 1984.
- MOUSTAFA, E. & GREENWOOD, R.M. Esterase and phosphatase isoenzymes in rhizobia and rhizobial bacteroid in relation to strain effectiveness and proportion of nodule tissue in *Lotus*. *New Zealand J. Sci.*, Wellington, 10: 548-555, 1967.
- MUZILLI, O.; OLIVEIRA, E.L. GERADE, A.C. & TORNERO, M.T. Adubação nitrogenada em milho no Paraná: III. Influência da recuperação do solo com adubação verde de inverno nas respostas à adubação nitrogenada. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 18: 23-27, 1983.
- MUNNS, D.N. & KEYSER, H.H. Response of *Rhizobium* strains to acid aluminium stress. *Soil Biol. Biochem.*, Oxford, 13: 115-118, 1981.
- MYTTON, L.R.; Mc ADAN, N.J. & PORTLOCK, P. Enzyme polymorphism as an aid to identification of *Rhizobium* strains. *Soil Biol. Biochem.*, Oxford, 10: 78-80, 1978.
- NOEL, K.D. & BRILL, J. Diversity and dynamics of indigenous *Rhizobium japonicum* populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, Baltimore, 40: 931-938, 1980.

NORRIS, D.O. Acid production by *Rhizobium*, a unifying concept. Plant and Soil, The Hague, 22: 143-166, 1965.

NORRIS, D.O. & DATE, R.A. Legume bacteriology. In: SHAW, N.H. & BRYAN, W.W. ed.: Tropical pastures research principles and methods. Commonwealth Bureau of Pastures and Field Crops, Bull. 51 Hurley, England, p. 134-174, 1976.

O'HARA, G.W.; BOONKERD, N. & DILWORTH, M.J. Mineral constraints to nitrogen fixation. Plant and Soil, The Hague, 108:93-110. 1988.

O'HARA, G.W.; GOOS, T.J.; DILWORTH, M.J. & GLENN, A.R. Maintenance of intracellular pH and acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. Appl. Environ. Microbiol., Baltimore, 55: 1870-1876, 1989.

OLIVEIRA, J.B.; MENK, J.R. & ROTTA, C.L. Levantamento pedológico semidetalhado dos solos do Estado de São Paulo: quadrícula de Campinas. Rio de Janeiro, IBGE, 1979, 169p.

PANKHURST, C.E. Symbiotic effectiveness of antibiotic resistant mutants of fast and slow-growing strains of *Rhizobium* nodulating *Lotus* species. Can. J. Microbiol., Ottawa, 23: 1026-1033, 1977.

PATEL, J.J. Antagonism of actinomycetes against rhizobia. Plant and Soil, The Hague, 41: 395-402, 1974.

PERES, J.R.R.; MENDES, I.C.; SUHET, A.R. & VARGAS, M.A.T. Eficiência e competitividade de estirpes de rizóbios

para soja em solos de cerrado. R. bras. Ci. Solo, Campinas, 17: 357-363, 1993.

PIÑERO, D.; MARTINEZ, E. & SELANDER, R.K. Genetic diversity and relationships among isolates of *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli. Appl. Environ. Microbiol., Baltimore 54(11): 2825-2832. 1988.

PRADO, H. Levantamento fotopedológico semidetalhado de uma área da Região Nordeste do Estado de São Paulo. Piracicaba, 1993, 159p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

PRAMER, D. & STARKEY, R.L. Determination of streptomycin in soil and the effect of soil colloidal material on its activity. Soil Sci. , Baltimore, 94: 48-54, 1962.

RAI, R. Effects of soil acidity factors on interaction of chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes and *Rhizobium* strains: symbiotic N-fixation, grain quality and grain yield in acid soils. In: WRIGHT, R.J.; BALIGAR, V.C. & MURRMAN, R.P. (ed.) Plant-soil interactions at low pH. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1991, Section 4, 619-631.

RAMOS, M.L.G.; MAGALHÃES, N.F.M.; BODDEY, R.M. Native and inoculated *Rhizobia* isolated from field grown *Phaseolus vulgaris*: effects of liming and acid soil on antibiotic resistance. Soil Biol. Biochem., Oxford, 19 (2): 179-185, 1987.

- REEVE, W.G.; TIWARI, R.P.; DILWORTH, M.J. & GLENN, A.R. Calcium effects the growth and survival of *R. meliloti*. Soil Biol. Biochem., Oxford, 25: 581-586, 1993.
- RESCK, D.V.S.; SHARMA, R.D. & PEREIRA, J. Efeito de quinze espécies de adubos-verdes na capacidade de retenção de água e no controle de nematóides em Latossolo Vermelho-Escuro sob cerrado. Pesq. agropec. bras., Brasília, 17: 459-467, 1982.
- RICE, W.A.; PENNEY, D.C. & NYBORG M. Effect of soil acidity on rhizobia numbers, nodulation and nitrogen fixation by alfafa and red clover. Canadian J. of Soil Sci., Ottawa, 57: 197-203, 1977.
- RICHARDSON, A.E. & SIMPSON, R.J. Acid tolerance and symbiotic effectiveness of *Rhizobium trifolii* associated with a *Trifolium subterraneum* based pasture growing in acid soil, Soil Biol. Biochem., Oxford, 21: 87-95, 1989.
- RODRIGUES, E.F.G.; DE-POLLI, H. & EIRA, P.A. Inoculação, calagem e adubação para mucuna preta e feijão de porco num solo podzólico vermelho-amarelo. Pesq. agropec. bras. 29(5): 807-814, 1994.
- ROUGHLEY, R.J.; WAHAB, F.A. & SUNDRAM, J. Intrinsic resistance to streptomycin and espectinomycin among root-nodule bacteria from Malaysian soils. Soil Biol. & Biochem. , Oxford, 24(7): 715-719, 1992.
- RUPELA, O.P.; TOOMSAM, B.; MITTAL, S.; DART, P. J. & THOMPSON, J.A. Chickpea *Rhizobium* population: survey of

influence of season, soil depth and cropping pattern. Soil Biol. Biochem., Oxford 19: 247-252, 1982.

RYNNE, F.G.; DILWORTH, M.J. & GLENN, A.R. The effect of chloramphenicol resistance mutations on the nodulation and competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Soil Biol. Biochem., Oxford, 23: 903-905, 1991.

SAKAI, E. & LEPSCH, I.F. Levantamento pedológico detalhado da Estação Experimental de Pariquera-Açu. Campinas, Instituto Agronômico, 1984, 56p. (IAC-Boletim Técnico, 83).

SANGINGA, N.; DANSO, S.K.A.; MULONGOY, K. & OJEIFO, A.A. Persistence and recovery of introduced *Rhizobium* ten years after inoculation on *Leucaena leucocephala* grown on an Alfisol in Southwestern Nigéria. Plant and Soil, The Hague, 159: 199-204. 1994

SCHMIDT, E.L. BANKOLE, R.O. & BOHLOOL, B.B. Fluorescent antibody approach to the study of rhizobia in soil. J. Bacteriol., 95: 1987-1992, 1968.

SCHMIDT, E.L. Initiation of plant-root microbe interactions. Ann. Rev, Microbiol., Palo Alto, 33: 355-376, 1979.

SCHOLLA, M.H. & ELKAN, G.H. *Rhizobium fredii* sp. nov., a fast-growing species that effectively nodulates soybeans. Int. J. Syst. Bact., Baltimore, 34: 484-486, 1984.

- SCHWINGHAMER, E.A. Association between antibiotic resistance and infectiveness in mutant strains of *Rhizobium* spp. Can. J. Microbiol., Ottawa, 10: 221-233, 1964.
- SCHWINGHAMER, E.A. & DUDMAN, W.F. Association between antibiotic resistance and infectiveness in mutant strains of *Rhizobium* spp. J.Appl. Bacteriol., London, 36: 263-272, 1973.
- SCOTTI, M.R..M.M.L.; SÁ, N.M.H.; VARGAS, M.A.T. & DOBEREINER, J. Susceptibilit of *Rhizobium* strains to antibiotics a possible reason for legume inoculation failure in cerrado soils. In: GRAHAM, P.H. & HARRIS, S.C. ed. Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture, CIAT, Cali, 1982, p. 195-200.
- SEGOVIA, L. ; YOUNG, J.P.W. & MARTÍNEZ-ROMERO, E. Reclassification of american *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli type I strain as *Rhizobium etli* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., Baltimore, 43: 373-377, 1993.
- SELANDER, R.K. CAUGANT, D.A.; OCHMAN, H.; MUSSER, J.; GILMOUR, M.N. & WHITTAM, T.S. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. Appl. Environ. Microbiol., Baltimore, 51: 873-884, 1986.
- SHISHIDO, M. & PEPER, I.L. Indentification of dominant indigenous *Rhizobium meliloti* by plasmid profiles and intrinsic antibiotic resistance. Soil Biol. Biochem., Oxford, 22: 11-16, 1990.

- SINCLAIR, M.J. & EAGLESHAM, A.R.J. Intrinsic antibiotic resistance in relation to colony morphology in three populations of West African cowpea rhizobia. *Soil Biol. Biochem.*, Oxford, 16: 247-251, 1984.
- SINGLETON, P.W. & TAVARES, J.W. Inoculation response of legumes in relation to the number and effectiveness of indigenous *Rhizobium* populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, Baltimore, 51: 1013-1018, 1986.
- SIQUEIRA, J.O. & FRANCO, A.A. *Biotechnologia do solo: fundamentos e perspectivas*. MEC-ESAL-FAEPE-ABEAS, Brasília, 1988. p.235.
- SOMASEGARAN, P. & HOBEN, H.J. Methods in legume - *Rhizobium* technology. NIFTAL project. University of Hawaii, Hawaii, 1985, 367p.
- SOUZA, V.; EGUIARTE, L.; AVILA, G.; CAPPELLO, R.; GALLARDO, C.; MONTOYA, J. & PIÑERO, D. Genetic structure of *Rhizobium etli* biovar *phaseoli*, associated with wild and cultivated bean plants (*Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus*) in Morelos, México. *Appl. Environ. Microbiol.*, Baltimore, 60: 1260-1268, 1994.
- SOULIDES, D.A. Antibiotics in soils. VII-Production of streptomycin and tetracycline in soil. *Soil Sci.*, Baltimore, 100: 200-206, 1965.
- SOULIDES, D.A. Antibiotic tolerance of the soil microflora in relation to type of clay minerals. *Soil Scie.*, Baltimore, 107: 105-107, 1969.

- SOULIDES, D.A., PINCK, L.A. & ALLISON F.E. Antibiotics in soil. III Further studies on release of antibiotics from clays. Soil Sci., Baltimore, 92: 90-93, 1961.
- SOULIDES, D.A.; PINCK, L.A. & ALLISON, F.E. Antibiotics in soils. V Stability and release of soil adsorbed antibiotics. Soil Sci., Baltimore, 94: 239-244, 1962.
- SPRENT, J.I. Evolution and diversity in the legume-rhizobium symbiosis: chaos theory ? Plant and Soil, The Hague, 161: 1-10, 1994.
- TAYLOR, R.W.; WILLIAMS, M.L. & SISTRANI, K.R. N₂ fixation by soybean-*Bradyrhizobium* combination under acidity, low P and high Al stresses. Plant and Soil, The Hague, 131: 293-300, 1991.
- 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. Can. J. Microbiol., Ottawa 38: 493-500, 1992.
- THIES, J.E.; SINGLETON, P.W. & BOHLOOL, B.B. Influence of the size of indigenous rhizobial population on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. Appl. Environ. Microbiol., Baltimore 57(1): 19-28, 1991.
- THORNTON, F.C. & DAVEY, C.B. Response of the clover-*Rhizobium* symbiosis to soil acidity and *Rhizobium* strain. Agron. J., Madison 75: 557-560, 1983.

- THURMAN, N.P. & BROMFIELD, E.S.P. Effect of variation within and between *Medicago* e *Melilotus* species on the composition and dynamics of indigenous populations of *R. meliloti*. Soil. Biol. Biochem., Oxford, 20(1): 31-38, 1988.
- TRINICK, M.J. Relationships amongst the fast growing rhizobia of *Lab-lab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other rizobial groups. Journal of Applied Bacteriology, London, 49: 39-53, 1980.
- TRINICK, M.J. & HADOBAS, P.A. Nodulation of *Trifolium repens* with modified *Bradyrhizobium* and nodulation of *Parasponia* with *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Plant and Soil, The Hague, 125: 49-61, 1990.
- TROTMAN, A.A. & WEAVER, R.W. Number and effectiveness of cowpea rhizobia in soil of Guyana. Tropical Agric., Trinidad, 63: 129-132, 1986.
- TSAI, S.M.; DA SILVA, P.M.; CABEZAS, W.L. & BONETTI, R. Variability in nitrogen fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) intercropped with maize. Plant and Soil, The Hague, 152: 93-101, 1993.
- TURCO, R.F.; MOORMAN, T.B. & BEZDICEK, D.F. Effectiveness of spontaneous antibiotic-resistant mutants of *Rhizobium leguminosarum* and *R. japonicum*. Soil Biol. Biochem., Oxford, 18: 259-262, 1986.
- TURK, D.; KEYSER, H.H. & SINGLETON P.W. Response of tree legumes to rhizobial inoculation in relation to the

population density of indigenous rhizobia. Soil. Biol. Biochem., Oxford 25(1): 75-81, 1993.

VAN SCHREVEN, D.A. The effect of some actinomycetes on rhizobia and *Agrobacterium radiobacter*. Plant and Soil, The Hague, 21: 283-302, 1964.

VARGAS, A.A.T.; DENARDIN, N.D. & VAN BERKUM, P. Tolerância de rizóbios nativos do feijoeiro a antibióticos e sua relação com fatores de acidez do solo. R. bras. Ci. Solo, Campinas, 16: 331-336, 1992.

VARGAS, A.A.T.; SILVEIRA, J.S.M.; ATHAYDE, J.T.; ATHAYDE, A. & PACOVA, B.E.V. Comparação entre genótipos de feijão quanto à capacidade nodulante e à produtividade com inoculação com rizóbios e/ou adubação de N-mineral. R. bras. Ci. Solo, Campinas, 267-272, 1991.

VARGAS, M.A.T. & SUHET, A.R. Eficiência de inoculantes comerciais de estirpes nativas de *Rhizobium* para seis leguminosas forrageiras em um solo de cerrado. Pesq. agropec. bras., Brasília, 16: 357-362, 1981.

VIEIRA, R.F. Aplicação foliar de molibdênio e seu efeito nas atividades da nitrogenase e redutase de nitrato no feijoeiro em campo. Piracicaba, 1994, 168p. (Doutorado Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

VINCENT, J.M. A manual for the practical study of the root nodule bacteria. IBP Handbook n^o 15, Blackwell Scientific Publications Ltda., Oxford, U.K., 1970. 159p.

- WHELAN, A.M. & ALEXANDER, M. Effects of low pH and high Al., Mn and Fe levels on the survival of *Rhizobium trifolii* and the nodulation of subterranean clover. Plant and Soil, The Hague, 92: 363-371, 1986.
- WHYTE, R.O.; NILSSON-LEISSNER, G. & TRUMBLE, H.C. Las Leguminosas en la agricultura. FAO Estudios Agropecuários, Roma, 1955, 405p.
- WOOD, M. & COOPER, J.E. Aluminium toxicity and multiplication of *Rhizobium trifolii* in a defined growth medium. Soil Biol. Biochem., Oxford 16 (6): 571-576, 1984.
- WOOD, M. & COOPER, J.E. Acidity, aluminium and multiplication of *R. trifolii* effects of initial inoculum density and growth phase. Soil Biol. Biochem., Oxford, 20: 83-87, 1988a.
- WOOD, M. & COOPER, J.E. Acidity, aluminium and multiplication of *Rhizobium trifolii*: possible mechanisms of aluminium toxicity. Soil Biol. Biochem., Oxford, 20: 95-99, 1988b.
- 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, The Hague, 107: 227-231, 1988.
- WOOD, M. & SHEPHERD, G. Characterization of *Rhizobium trifolii* isolated from soils of different pH. Soil Biol. Biochem., Oxford, 19: 317-321, 1987.

- WOOMER, P.; SINGLETON, P.W. & BOHLOOL, B.B. Ecological indicators of native *Rhizobia* in tropical soils. Appl. Environ. Microbiol., Baltimore 54: 1112-1116, 1988.
- WRIGHT, S.F. & ZETO, S.K. Effects of pH and Al^{3+} activity on survival of *R. leguminosarum* bv. trifolii in a simple solution and nodulation of red clover in acid soils. In: WRIGHT, R.J.; BALIGAR, V.C. & MURRMAN, R.P. ed. Plant soil interactions at low pH. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1991, Section 4, 603-609.
- WUTKE, E.B. Adubação verde: manejo da fitomassa e espécies utilizadas no Estado de São Paulo. In: I Curso sobre Adubação verde no Instituto Agronômico, Campinas, 1993, Instituto Agronômico, 1993, p. 17-30.
- YOUSEF A.N.; AL-NASSIRI, A.S.; AL-AZAWI, S.K. & ABDUL-HUSSEIN, N. Abundance of peanut rhizobia as affected by environmental conditions in Iraq. Soil Biol. Biochem., 19: 319-326, 1987.
- ZABLOTOWICZ, R.M. & FOCHT, D.D. Physiological characteristics of cowpea rhizobia: evaluation of symbiotic efficiency in *Vigna unguiculata*. Appl. Environ. Microbiol., Baltimore, 41: 679-685, 1981.
- ZIMMERMANN, M.J.O. & TEIXEIRA, M.J. Origem e Evolução: In: ZIMMERMANN, M.J.O.; ROCHA, M. & YAMADA, T. ed. Cultura do feijoeiro. Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fósforo. Piracicaba, 1988.p.79-85.

Apêndice 1. Análise dos dados de eficiência relativa de isolados de feijão e guandu que nodularam o feijão. Médias de 3 repetições comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV= 5,14%.

Tratamento	Médias*	
Nitrogênio Feijão	100,00	a
Nitrogênio Guandu	100,00	a
F ₃ C	100,00	a
F ₄ C	87,78	b
F ₅ C	73,51	c
F ₂ NA	72,17	c
F ₆ C	72,04	c
F ₁ NA	56,67	d
F ₁ A	50,94	de
F ₂ A	46,35	def
F ₃ NA	45,92	def
F ₆ Pma	44,59	defg
F ₃ Pma	44,36	defg
G ₁ P	43,90	defg
F ₅ Pma	42,96	efg
F ₂ Pma	42,03	efg
F ₃ A	40,80	efg
F ₄ Pma	40,01	efg
F ₅ NA	37,99	efg
F ₂ C	37,40	fg
F ₄ NA	36,51	fg
G ₆ NA	35,56	fg
F ₄ A	35,20	fg
F ₁ Pma	35,00	fg
F ₁ C	34,99	fg
F ₆ NA	34,02	fg
F ₆ A	33,53	fg
F ₅ A	32,12	g
G ₁ NA	31,66	g

*Médias seguidas por letras distintas diferem entre si.

DMS = 7,83

Apêndice 2. Análise dos dados de eficiência relativa de isolados de feijão que nodularam a leucena. Médias de 3 repetições, comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV= 7,56%.

Tratamento	Médias*	
F ₆ C	100,00	a
Nitrogênio Leucena	100,00	a
F ₂ A	98,22	ab
F ₅ C	92,26	abc
F ₆ MA	82,32	bc
F ₅ A	76,40	cd
F ₂ C	71,92	cde
F ₁ C	70,33	cde
F ₄ A	68,30	cde
F ₂ MA	65,35	de
F ₄ C	63,83	def
F ₅ MA	63,74	def
F ₃ C	62,86	def
F ₃ MA	62,81	def
F ₄ MA	58,71	def
F ₁ A	57,96	def
F ₃ A	43,43	ef
F ₆ A	33,20	f

* Médias seguidas por letras distintas diferem entre si.
DMA = 18,14

Apêndice 3. Análise dos dados de eficiência relativa de isolados de crotalária e guandu que nodularam o amendoim. Médias de 3 repetições comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV= 15,6.

Tratamentos	Médias*
Nitrogênio crotalária	100,00 a
Nitrogênio guandu	100,00 a
C ₆ C	79,57 b
G ₅ C	74,32 b
C ₅ A	74,48 b
C ₃ MA	67,91 b
C ₁ A	65,19 b
C ₄ C	64,56 b
C ₁ MA	64,14 b
G ₄ A	63,06 b
G ₁ C	60,48 b
C ₅ C	56,89 b
G ₂ A	55,06 b
C ₂ C	53,63 b
C ₄ A	53,56 b
C ₃ A	52,72 b
G ₃ A	52,27 b
C ₃ C	52,05 b
C ₅ MA	51,87 b
C ₆ MA	51,40 b
C ₆ A	49,86 b
G ₁ A	44,66 b
G ₂ C	39,93 b
C ₁ C	37,11 b

* Médias seguidas por letras distintas diferem entre si.
DMS= 21,19.

Apêndice 4. Análise dos dados de eficiência relativa de isolados de crotalária e guandu que nodularam a crotalária. Médias de 3 repetições comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV= 15,6.

Tratamentos	Médias*
Nitrogênio crotalária	100,00 a
Nitrogênio guandu	100,00 a
G ₁ Pma	97,11 a
G ₅ A	97,00 a
G ₄ NA	93,81 a
G ₃ C	64,31 b
G ₆ A	48,39 bc
G ₅ Pma	45,25 bed
G ₃ Pma	44,99 bed
G ₆ NA	43,99 bed
G ₄ Pma	40,93 bed
G ₂ Pma	37,61 bed
G ₆ Pma	35,52 bed
C ₅ NA	33,98 bed
C ₄ NA	33,57 bed
G ₂ C	33,49 bed
C ₄ C	32,38 bed
G ₃ NA	31,42 cde
G ₃ C	30,45 cde
C ₅ C	28,34 cde
C ₁ C	27,55 cde
C ₂ NA	27,35 cde
C ₅ A	26,67 cde
C ₆ C	26,58 cde
G ₁ A	25,44 cde
G ₄ A	24,99 cde
C ₁ NA	24,52 cde
G ₂ A	22,46 cde
G ₆ C	22,35 cde

Continua...

Continuação do Apêndice 4

Tratamentos		Médias*	
C ₆	A	22,16	cde
C ₄	A	22,01	cde
C ₆	MA	21,45	cde
G ₅	P	20,67	cde
G ₂	C	20,52	cde
G ₅	C	19,97	cde
G ₂	P	19,60	cde
C ₃	MA	18,78	cde
C ₃	A	18,60	cde
G ₄	P	18,09	cde
G ₃	P	17,64	de
C ₁	A	17,29	de
G ₅	MA	16,60	de
G ₄	C	15,94	de
G ₃	A	15,90	de
G ₆	P	14,30	e
G ₁	P	13,92	e
C ₂	A	13,10	e

* Médias seguidas por letras distintas diferem entre si.
DMS 5% = 19,14.

Apêndice 5. Análise dos dados de eficiência relativa dos isolados de crotalária, feijão e guandu que nodularam o guandu. Médias de 3 repetições comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. CV= 4,98%.

Tratamento	Médias
NG	100,00 a
NC	100,00 a
NF	100,00 a
G ₄ Pma	68,72, b
G ₃ Pma	56,70 c
G ₆ Pma	50,97 cd
G ₅ Pma	45,29 de
G ₆ C	41,99 def
G ₄ C	38,18 efg
G ₁ C	36,71 efgh
G ₂ Pma	36,23 efghi
G ₅ A	34,26 efghij
G ₄ P	34,83 efghij
G ₅ P	34,80 efghijk
G ₃ A	34,75 efghijk
G ₁ P	34,73 fghijk
G ₂ A	33,91 fghijkl
G ₄ MA	33,89 fghijkl
G ₁ MA	33,83 fghijkl
G ₆ A	33,80 fghijkl
G ₁ Pma	33,39 fghijkl
G ₅ C	33,33 fghijkl
G ₂ MA	32,96 fghijklm
G ₃ C	32,83 fghijklm
G ₁ A	32,40 fghijklmn
G ₆ MA	32,39 fghijklmn
G ₄ MA	31,69 ghijklmn
G ₆ A	31,42 ghijklmn
G ₂ MA	31,02 ghijklmn
G ₄ A	30,96 ghijklmn
G ₅ MA	30,57 ghijklmno
G ₆ C	30,44 ghijklmno
G ₄ A	30,36 ghijklmno
G ₂ A	29,74 ghijklmno

Continua...

Continuação do Apêndice 5

Tratamento		Médias	
F ₁	Pma	27,26	ijklmno
G ₃	C	27,25	ijklmnop
G ₃	HA	26,11	ijklmnop
F ₃	A	26,00	ijklmnop
G ₂	P	25,80	ijklmnop
F ₂	Pma	25,49	ijklmnop
F ₂	C	25,09	klmnop
F ₅	C	24,63	lmnop
G ₁	HA	23,20	mnoqp
G ₁	A	22,65	nopq
F ₄	Pma	21,20	pq
F ₃	HA	17,73	q
F ₄	HA	15,13	