

CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE *Rhizobium phaseoli* PARA A PRODUÇÃO DE INOCULANTES COMERCIAIS

AMALIA DEL ROSARIO BARAIBAR LUCAS

Orientadora: Profa. Dra. SIU MUI TSAI SAITO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Outubro - 1986

Aos meus pais,
José Enrique e Martha,
pela educação e exemplo
que me deram,

OFEREÇO

A José e aos meus filhos
Maria, José e Andrés,
com amor,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

- À Dra. Siu Mui Tsai Saito, pela orientação, sugestões e apoio constante no desenvolvimento da pesquisa, e por estes dois anos de amizade e compreensão.
- Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura e sua equipe técnica por ter me introduzido no conhecimento das técnicas nucleares.
- À Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) pela bolsa concedida durante 18 meses.
- Ao Banco Mundial pelo apoio financeiro durante a minha permanência no Brasil.
- À Iraci, Francisco, Mario, Luzia e Ezequiel, da Seção de Microbiologia do Solo, pelo auxílio nos experimentos e pela sua amizade.
- Aos colegas e demais funcionários da Seção de Microbiologia do Solo.
- À Seção de Radioentomologia pela irradiação das turfas.
- Ao CIAGRI-CENA pelas análises estatísticas.
- A todos os funcionários do PLANAGROPECUÁRIO, M.A.P., Uruguay, na pessoa de seu Diretor Técnico Eng. Agr. Luiz A. Carrau.

- Aos colegas e funcionários do Laboratório de Microbiologia e Inoculantes do Uruguai, pela amizade e companheirismo.
- À SONAR - Serviços de Datilografia S/C Ltda., pela qualidade do trabalho datilográfico, desenho e composição da dissertação.

ÍNDICE

	<u>página</u>
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1. Inoculantes. Definição. Etapas de produção.	
2.2. Critérios para a seleção de estirpes de <i>Rhizobium</i>	7
2.2.1. Especificidade hospedeira e eficiência	8
2.2.2. Sobrevivência e competição saprofítica	9
2.2.3. Competição pelos sítios de infecção nodular	24
2.2.4. Sobrevivência na turfa	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1. Bactérias	38
3.1.1. Estirpes de <i>Rhizobium phaseoli</i>	38
3.1.2. Isolados de <i>Streptomyces</i>	38
3.2. Meios de cultura e soluções utilizadas	40
3.2.1. Meio Y.M.A. (FRED et alii 1932 modificado)	40
3.2.2. Meio Amido-Caseína-Agar (KÜSTER e WILLIAM, 1964)	41
3.2.3. Meio basal para pH (AYANABA e GRAHAM, 1983)	42
3.2.4. Solução de vermelho congo	43
3.2.5. Solução salina	43

	<u>página</u>
3.2.6. Solução nutritiva para plantas (Mc KNIGHT, 1949 modificado)	44
3.2.7. Solução de hipoclorito de sódio	45
3.3. Antibióticos e fungicidas	45
3.4. Preparo das soluções estoque	45
3.5. Turfa	47
3.6. Planta	47
3.7. Solo-inóculo	48
3.8. Estudos de antagonismo microbiano	49
3.8.1. Obtenção de isolados	50
3.9. Testes para competição saprófita	50
3.9.1. Determinação dos níveis de resistência a antibióticos	50
3.9.2. Determinação dos níveis de resistência a fungicidas	51
3.9.3. Atividade bacteriocinogênica	52
3.9.4. Tolerância à acidez e níveis altos de alumínio e manganês	53
3.10. Eficiência das estirpes de <i>R. phaseoli</i> e dos isolados	53
3.10.1. Padrão de nodulação das estirpes e iso lados	56
3.10.2. Evolução do padrão de nodulação no iso lado C05 II	59

3.11. Avaliação da capacidade competitiva por sítios de infecção nodular	60
3.12. Sobrevivência na turfa	63
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1. Estudos de antagonismo	64
4.1.1. Obtenção de isolados	71
4.2. Testes para competição saprofítica	72
4.2.1. Limites de resistência a antibióticos	72
4.2.2. Limites de resistência a fungicidas.. ..	76
4.2.3. Produção de bacteriocinas	81
4.2.4. Tolerância a acidez e níveis tóxicos de alumínio e manganês	82
4.3. Eficiência simbiótica das estirpes e isolados de <i>R. phaseoli</i>	85
4.3.1. Padrão de nodulação: atividade e tamanho	93
4.3.2. Evolução do padrão de nodulação do isolado COS II	105
4.4. Competição pelos sítios de infecção nodular. ..	117
4.5. Sobrevivência na turfa	127
5. CONCLUSÕES	141
6. LITERATURA CITADA	145

CARACTERIZAÇÃO E SELEÇÃO DE *Rhizobium phaseoli* PARA
A PRODUÇÃO DE INOCULANTES COMERCIAIS

Autora: AMALIA DEL ROSARIO BARAIBAR LUCAS

Orientadora: SIU MUI TSAI SAITO

RESUMO

Foram conduzidos estudos de antagonismo entre *Streptomyces* isolados de turfas e estirpes de *R. phaseoli* a partir dos quais obtiveram-se variantes das estirpes C05, SEMIA 487 e CIAT 255 que cresciam nos halos de inibição formados. Com estas variantes, as culturas matrizes e outras estirpes de *R. phaseoli*, foi proposta uma sequência de testes que inclui: resistência a antibióticos e fungicidas, produção de bacteriocinas, tolerância à acidez, eficiência simbiótica, competição nodular e sobrevivência na turfa.

Os isolados C05 I, C05 II e C05 III, SEMIA 487-2 e a estirpe 1899 apresentaram altos níveis de resistência à estreptomicina, cloranfenicol, eritromicina e tetraciclina assim como benomyl, thiram e captan e cresceram em meio ácido (pH = 4,3). Nenhuma das estirpes testadas apresentou atividade bacteriocinogênica.

As estirpes C05 e SEMIA 487 foram ineficientes; o isolado C05 II demonstrou superioridade nos parâmetros simbióticos estudados apresentando a maior eficiência nodular, foi altamente competitivo para a formação de nódulos na presença de estirpes de *Rhizobium* nativas e frente à C05 matriz, e igualmente competitivo em relação à estirpe 1899. As estirpes matrizes C05 e SEMIA 487 nodularam tardiamente com nódulos pequenos e escassos, 1899 e SEMIA 487-2 foram de nodulação precoce e ciclo curto (até floração) enquanto que, C05 II destacou-se pelo ciclo de nodulação mais prolongado. Discute-se a validade da persistência nodular como critério de seleção de estirpes para *Phaseolus vulgaris*.

A estirpe C05 não sobreviveu satisfatoriamente nas turfas não irradiadas, sendo superada pelos isolados C05 I, C05 II e C05 III e pela estirpe 1899. A irradiação da turfa com radiações gama (2,5 Mrad) controlou o crescimento dos contaminantes remanescentes e permitiu boa sobrevivência do *R. phaseoli* durante os 60 dias de armazenamento dos inoculantes a 28°C.

Recomenda-se o isolado C05 II para a produção de inoculantes para feijoeiro. Para certos casos, a estirpe 1899 poderá ser incluída junto à C05 II em inoculantes polivalentes porque a primeira apresenta um ciclo de nodulação precoce.

Discute-se a possibilidade de irradiação da turfa com doses acima de 2,5 Mrad e uso de estirpes com resistência a antibióticos e fungicidas como alternativa para a produção de inoculantes de maior qualidade no Brasil.

CHARACTERIZATION AND SELECTION OF *Rhizobium phaseoli*
FOR COMMERCIAL INOCULANT PRODUCTION

Author: AMALIA DEL ROSARIO BARAIBAR LUCAS

Adviser: SIU MUI TSAI SAITO

SUMMARY

Antagonism interaction studies between *Streptomyces* from peat and *Rhizobium phaseoli* strains were conducted in agar medium. Colonies from strains C05, SEMIA 487 and CIAT 255, growing in the zone of inhibition formed in presence of actinomycetes (*Streptomyces*) isolates, were picked up and cultured. A sequence of tests was proposed with those isolates with the aim to select better strains. Intrinsic antibiotic and fungicide resistance, bacteriocin production, acid tolerance, effectiveness, competitiveness for nodule formation and survival in the peat were considered as the main properties for the screening.

Isolates C05 I, C05 II, C05 III, SEMIA 487-2 and the strain 1899 presented high resistance level to streptomycin, chloranphenicol, eritromycin and tetracyclin as well as to benomy, thiram or captan, with normal growth in acid media (pH = 4.3). Mother strains C05 and SEMIA 487

were inefficient and isolate C05 II was superior for all the studied parameters, with the highest nodular efficiency. It was highly competitive for nodule formation in presence of the native strains from soil or the mother strain C05 and was a competitive as strain 1899.

The pattern of nodulation (nitrogenase activity and nodule size) was different among strains. Strains C05 and SEMIA 487 formed their nodules mostly in a later period and they were very small and sparse. Strain 1899 and the isolate SEMIA 487-2 nodulated earlier, with a short period of activity (until flowering); isolates C05 II presented a longer period of nodule activity. The importance of the nodule persistence as a strain selection parameter for *R. phaseoli* is discussed.

The mother culture C05 showed a low survival ability in the unsterilized carrier. Irradiation of the peat with gamma rays at rates of 2.5 Mrad controlled the growth of the remaining contaminants and allowed a good survival of *R. phaseoli* during the period of sixty days of storage at 28°C.

Due to those intrinsic characteristics, isolate C05 II is recommended for the inoculant production for *Phaseolus vulgaris* L. Mixtures in equal parts of 1899 and C05 II are recommended for some specific ecological

situations. The use of irradiated peat associated to the use of antibiotic and fungicide resistant strains is discussed as an alternative to improve the quality of Brazilian inoculants.

1. INTRODUÇÃO

A inoculação de leguminosas com culturas de bactérias do gênero *Rhizobium* começou há quase um século. Embora os conhecimentos tenham se desenvolvido vagarosamente, ninguém pode duvidar do impacto produzido por esta prática agrônômica na produção de alimentos do mundo (BURTON, 1980). Constitui aliás, um dos poucos exemplos de sucesso conseguido pelo homem na exploração de microrganismos com fins práticos (BROCKWELL et alii, 1982).

A decisão de inocular surge de um estudo prévio do solo, onde não sejam detectados rizóbios nativos específicos para a leguminosa que se deseja introduzir, ou no caso de existirem, que eles sejam ineficientes ou pobremente eficientes (DATE, 1976).

Um programa de inoculação de leguminosas visando obter as máximas respostas de fixação biológica de ni-

trogênio deverá atingir pelo menos três premissas básicas: 1º) produção de inoculantes de alta qualidade; 2º) uma tecnologia de utilização do inoculante adequada e 3º) um programa de extensão que permita uma rápida transferência da tecnologia gerada ao produtor (FAO, 1978; LABANDERA, 1986).

A tecnologia de produção de *Phaseolus vulgaris*, L. em toda América Latina é extremamente simples, já que raramente se aplica inoculação ou fertilização nitrogenada, o que resulta em rendimentos muito baixos (DUQUE et alii 1985).

Segundo IBGE (1983), a média de produtividade brasileira de feijão, por hectare para esse período foi de 329 kg, porém incrementos de produtividade de até 1.600 kg seriam possíveis de atingir sem fertilização nitrogenada adicional, mediante a utilização de sistemas simbióticos mais eficientes em condições de campo e o desenvolvimento de tecnologias de inoculação mais adequadas (DÖBEREINER e DUQUE, 1980).

No Brasil, apesar de existirem vários centros de pesquisa em fixação biológica de nitrogênio, poucos têm podido atender especificamente aspectos relacionados à produção e utilização de inoculantes de alta qualidade para uso no país. As respostas à inoculação do feijoeiro são muito variáveis, seja por fatores climáticos ou edáficos, seja de-

vido às diferenças existentes entre os componentes da simbiose (DUQUE et alii, 1985).

A maioria dos solos brasileiros apresentam uma população nativa de *Rhizobium phaseoli* principalmente em áreas onde a cultura se desenvolve há muito tempo. Esta população é medianamente eficiente e com grande adaptabilidade e sobrevivência nos solos (SAITO e RUSCHEL, 1980).

A obtenção de estirpes de *R. phaseoli* de elevada eficiência tem sido a meta principal dos programas de seleção, desenvolvidos principalmente em casa de vegetação e com resultados satisfatórios quanto a níveis de fixação atingidos (FREIRE e KÖLLING, 1986). Porém, a inoculação da semente em condições de campo não garantiu até agora o desenvolvimento de simbioses efetivas (SAITO et alii, 1982), indicadas pela baixa nodulação da estirpe introduzida.

Baixa qualidade dos inoculantes devido à escassa sobrevivência da bactéria no suporte e ao uso de estirpes não competitivas e não adaptadas às condições ecológicas do ambiente onde são introduzidas, têm sido sugeridas como algumas das causas das baixas respostas à inoculação no campo (VIDOR, 1981; BROCKWELL et alii, 1982).

Como hipótese de trabalho estabeleceu-se que é possível obter benefícios da inoculação no feijoeiro (*Pha-*

seolus vulgaris L.) através da produção de inoculantes quantitativa e qualitativamente superiores mediante a introdução de estirpes mais eficientes e competitivas que sobrevivam melhor na turfa e no solo.

As etapas sugeridas para incrementar essa qualidade seriam:

- a. a seleção de estirpes mais agressivas através da introdução de características tais como resistência a antibióticos, resistência a fungicidas, produção de bacteriocinas, tolerantes à acidez;
- b. a seleção de estirpes mais eficientes e persistentes;
- c. o uso de irradiação gama para esterilização da turfa que garanta uma maior sobrevivência e adequado estado fisiológico do *Rhizobium* durante o armazenamento e distribuição do inoculante.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. INOCULANTES. DEFINIÇÃO. ETAPAS DE PRODUÇÃO

O inoculante é um cultivo de rizóbios previamente selecionados e introduzidos num suporte que facilite sua manipulação e confira proteção (ROUGHLEY, 1970). Existem portanto, dois aspectos que determinam a qualidade do inoculante e o sucesso de sua aplicação: a bactéria, que define seu potencial qualitativo e o suporte, que define seu potencial quantitativo (LABANDERA, 1986). Dependendo das condições de uso, existem inoculantes de diversos tipos como cultivos puros em ágar, liofilizados, em óleo, em turfa, em turfa granulada, etc. (BURTON, 1980).

A produção de inoculantes de alta qualidade pode ser dividida em quatro fases principais (DATE e ROUGHLEY, 1977), que são: 1º) seleção das estirpes de *Rhizobium*,

2º) seleção e preparo do suporte; 3º) multiplicação da bactéria em meio líquido (caldo) e impregnação do suporte; e 4º) controle de qualidade do produto final (ROUGHLEY, 1975). Em função da cultura, de sua problemática e do nível tecnológico disponível, nem sempre todas estas etapas apresentam o mesmo nível de desenvolvimento. Pesquisas nesta área para soja no Brasil (FREIRE e KÖLLING, 1986) garantem o fornecimento à indústria de inoculantes de estirpes de *B. japonicum* eficientes e competitivas (OLIVERA e VIDOR, 1984a, 1984b, 1984c), com concentrações satisfatórias no inóculo conferidas por um controle oficial não regulamentado na saída do produto à venda (FREIRE e KÖLLING, 1986). Para o feijão, a etapa de seleção de estirpes continua sendo limitante e não permite ainda recomendar a substituição total do adubo nitrogenado (RUSCHEL et alii, 1979; SAITO, 1982).

A seguir serão abordados aspectos relacionados aos critérios de seleção de estirpes de *Rhizobium* com especial ênfase para critérios ecológicos em atenção à problemática da simbiose *R. phaseolii* - *Phaseolus vulgaris* no Brasil.

2.2. CRITÉRIOS PARA A SELEÇÃO DE ESTIRPES DE *Rhizobium*

VINCENT (1956) estabeleceu os critérios básicos para a seleção de estirpes destacando como prioritários a habilidade de formar nódulos eficientes na fixação de N_2 com todos os hospedeiros para os quais a cultura é recomendada e capacidade de funcionar numa larga variedade de condições de solo. BROCKWELL et alii (1968) acrescentaram critérios de velocidade na nodulação, competitividade com outras estirpes de *Rhizobium* e capacidade de persistir no solo. FREIRE e VIDOR (1978) complementam estabelecendo que a estirpe de *Rhizobium* a ser recomendada para a produção de inoculantes deverá apresentar comprovada eficiência em experimentação de campo, largo espectro de nodulação e eficiência ou seja baixa especificidade, boa capacidade de colonizar e sobreviver no solo, e alta capacidade de competição por sítios de infecção nodular. Satisfazendo estas características, seriam esperados aumentos do benefício da fixação, evitando riscos de invasão de estirpes menos eficientes, porém, com alta capacidade de colonizar a raiz e formar nódulos.

Características industriais tais como habilidade para se multiplicar em cultura líquida e adaptabilidade ao suporte (RUIZ ARGÜESO et alii, 1979), assim como estabilidade genética das estirpes (LABANDERA e VINCENT, 1975, BARAJBAR et alii, 1982), também são sugeridos.

2.2.1. ESPECIFICIDADE HOSPEDEIRA E EFICIÊNCIA

A elevada capacidade de fixar nitrogênio tem sido até há pouco tempo o único critério de seleção considerado para a estirpe de inoculante. Hoje, os termos eficiência ou ineficiência carecem de validade se não for levada em consideração a especificidade hospedeira (FREIRE e VIDOR, 1979; HUNGRIA, 1981; PACOVSKY et alii, 1984; FREIRE e KÖLLING, 1986). Seria desejável que a estirpe de *Rhizobium* usada no inoculante formasse uma simbiose eficiente com a maioria dos cultivares da espécie hospedeira para a qual foi selecionada (PERES e SUHET, 1986). Para a simbiose *Phaseolus vulgaris* - *R. phaseöli* há muitas evidências de variabilidade de respostas para estirpes num mesmo cultivar (SAITO e RUSCHEL, 1976; RUSCHEL e SAITO, 1977; SAITO e CARDOSO, 1977; SAITO et alii, 1978; SAITO, 1980; SAITO et alii, 1980; CASSINI, 1980; HUNGRIA, 1981; VOSS et alii, 1983; PEREIRA, 1983), tanto como entre cultivares de *P. vulgaris* inoculados com a mesma estirpe (FRANCO e DÖBEREINER, 1967; LOPES et alii, 1976; HUNGRIA, 1981; RUSCHEL et alii, 1982; SAITO e FREITAS, 1982; PEREIRA, 1983; GRAHAM, 1984; PACOVSKY et alii, 1984; DUQUE et alii, 1985; HUNGRIA et alii, 1986; HUNGRIA e NEVES, 1986), o que foi manifestado em diferenças significativas nos parâmetros de rendimento da parte aérea e nodulação.

Esta variabilidade supõe um trabalho inesgotável de seleção de novos materiais da planta e da bactéria para conseguir maximizar os benefícios da simbiose (FREIRE e KÖLLING, 1986). Avaliações do comportamento de isolados de *R. phaseoli* de zonas produtoras de feijão, permitiram obter estirpes mais eficientes, com nodulação precoce que aumentaram o período de fixação (VOSS et alii, 1983). A retenção e transporte do nitrogênio fixado, tem sido sugerida como uma característica intrínseca das estirpes de *Rhizobium* factível de seleção para uma maior eficiência no uso do N₂ fixado (HA VELKA e HARDY, 1976; HUNGRIA et alii, 1985a, b; HUNGRIA e NE VES, 1986).

É discutível a validade do peso da matéria seca dos nódulos e da atividade da nitrogenase como parâmetros de avaliação da eficiência das estirpes (HUNGRIA, 1981; SAITO, 1982 ; PEREIRA, 1983; HUNGRIA et alii, 1985; HUNGRIA e NEVES, 1986). Estirpes de *R. phaseoli* com massa nodular menor, acumularam mais nitrogênio na parte aérea e nas vagens. Embora a massa nodular seja atributo da estirpe (DÖBEREINER et alii, 1970) poderia estar associada a outras características como a remobilização do nitrogênio acumulado nos tecidos foliares e índice de colheita (NEVES, 1986). Estudos que relacionem eficiência nodular (mg N fixado/g de nódulo), taxas de translocação do nitrogênio fixado, nitrogênio total nas vagens entre outros, com produção e proteína nas sementes

são os mais recomendados quando se trata de culturas para produção de grãos. Existe variabilidade de comportamento das estirpes nos parâmetros produtivos (NEVES et alii, 1985; HUNGRIA, 1985). Experimentos conduzidos em casa de vegetação (HUNGRIA et alii, 1985b) reportaram contribuições da fixação de N_2 de 60 a 70% do nitrogênio da semente para as melhores combinações cultivar-estirpe, sendo os sistemas mais eficientes aqueles que remobilizaram mais rapidamente o nitrogênio à semente.

O método de redução de acetileno (ARA) para medir atividade da nitrogenase (SCHÖLLHORN e BURRIS, 1967; DILWORTH, 1966) é rápido, sensível, econômico, de valor semi quantitativo. Porém, apresenta limitações extremamente sérias como as de ser uma medida espontânea, que não considera a evolução de H_2 (SCHUBERT e EVANS, 1977), sendo recentemente demonstrado (MINCHIN et alii, 1983) que o acetileno poderia inibir a nitrogenase por mecanismos ainda pouco elucidados. Apesar destas limitações, a técnica de ARA continua sendo de grande validade, em estudos comparativos e quando se deseja de forma rápida, testar grande volume de material (MASTERSON e MURPHY, 1980). PERES et alii (1984) selecionaram estirpes mais eficientes dentro de uma população de nódulos da raiz de soja inoculadas com uma estirpe de *B. japonicum* e encontraram alta correlação entre a eficiência do isolado e o valor do ARA registrado no nódulo que deu origem.

Existem resultados contraditórios quanto à correlação entre valores do ARA e N_{total} na parte aérea. REN NIE e KEMP (1980), SAITO et alii (1980), HUNGRIA (1981) e SAITO (1982) não encontraram boa correlação em *Phaseolus vul*garis, provavelmente devido à evolução do H_2 que ocorre normalmente na redução do N_2 , que o C_2H_2 bloqueia. Porém, para outras situações altas correlações foram registradas entre ARA e N_{total} da parte aérea no florescimento (HUNGRIA e NEVES, 1986). Por este motivo, é sugerida a utilização do parâmetro ER (eficiência relativa) (SCHUBERT e EVANS, 1977) que representaria em forma real o custo de elétrons da redução de N_2 .

O sistema *Rhizobium phaseoli* - *Phaseolus vul*garis tem sido considerado inferior ao sistema *Bradyrhizobium japonicum* - *Glycine max* (Freire et alii, 1953, citados por SAITO e RUSCHEL, 1980) quanto à fixação de nitrogênio, porém através de estudos conduzidos principalmente em casa de vegetação e condições controladas, tem se conseguido contribuições de até 75% do nitrogênio total das sementes, provenientes dessa fonte o que indica resultados promissórios (HUNGRIA et alii, 1985b). Por outro lado, as diferenças observadas nas respostas à inoculação de cultivares em campo, indicam que a obtenção de genótipos para fixação de N_2 elevada é um caminho a seguir (DUQUE et alii, 1985).

A contribuição das estirpes de inoculante em

condições de campo significou incrementos de 43 a 48% nos rendimentos e 20 a 30% no teor de nitrogênio nos graos nas melhores situações, porém, as respostas não foram tão evidentes em solos que apresentavam altas populações de rizobios nativos (SAITO, 1982).

Os resultados pouco alentadores com feijoeiro inoculado no campo sugerem a necessidade de determinar quais fatores influem negativamente na expressão do potencial simbiótico das estirpes.

2.2.2. SOBREVIVÊNCIA E COMPETIÇÃO SAPROFÍTICA

A capacidade de persistir no solo na ausência ou na presença do hospedeiro é considerada uma propriedade essencial para uma estirpe de *Rhizobium* recomendada nos inoculantes (BROCKWELL *et alii*, 1968; van RENSBURG e STRIDJOM, 1982). No solo, a estirpe introduzida no inóculo é submetida aos efeitos de numerosos fatores bióticos e abióticos (FREIRE e VIDOR, 1978; HAM, 1980; VIDOR, 1981; TRINICK, 1982) muitos dos quais poderiam atuar induzindo mudanças quantitativas e qualitativas na população introduzida (SCOTTI *et alii*, 1981; PITARD *et alii*, 1982; van RESBURG e STRIDJOM, 1982).

O termo "competição saprofítica" foi sugerido por CHATEL *et alii* (1968), para definir a propriedade de uma

estirpe de incursionar, sobreviver no solo e colonizar a rizosfera como um saprófita até promover a infecção da raiz do hospedeiro. Estas características dependem exclusivamente da estirpe de *Rhizoíbum*; de sua agressividade e capacidade de adaptação às condições físico-químicas e biológicas do solo onde foi introduzida (IRELAND e VINCENT, 1968). Este critério de seleção, embora imprescindível para rizobios que nodulam leguminosas perenes ou de ciclo bianual, não deve ser subestimado para culturas anuais de forma a garantir que a maioria dos nódulos formados pertençam à estirpe do inoculante (VIDOR, 1981).

Vários autores têm correlacionado baixos números de rizóbios na rizosfera com falhas de nodulação (RICE et alii, 1977), sendo sugeridas as interações antagônicas exercidas pela microflora do solo como as responsáveis da baixa sobrevivência das estirpes de *Rhizobium* (PARKER e GROVE, 1970; CHATEL e PARKER, 1972; PATEL, 1974).

VIDOR e MILLER (1980) observaram relação direta entre o declínio populacional de estirpes de *B. japonicum* no solo e incrementos numéricos de um organismo lítico tipo bacteriófago. RAMIREZ e ALEXANDER (1980) não encontraram evidências do efeito de bactérias competidoras, microrganismos líticos ou produtores de antibióticos, bacteriófagos ou *Bdellovibrio* que explicassem a queda numérica brusca de *R. phaseoli* na espermosfera e rizosfera imediatamente após ger-

minação. Estes autores atribuíram os declínios à presença de protozoários tipo flagelados que aumentavam uma unidade logarítmica após introdução e germinação da semente inoculada. Similares resultados reportam LENNOX e ALEXANDER (1981), HOSSAIN e ALEXANDER (1984) e JONES e GIDDENS (1984). VIDOR e MILLER (1980), sugerem que as mudanças genéticas produzidas pelos fagos e organismos líticos seriam mais importantes que sua representação quantitativa.

A maioria dos fungos rizosféricos são inibidores do *Rhizobium* sendo, *Penicillium* e *Aspergillus* os gêneros que se destacam (CHOWDHURY, 1977; PARKER e CHATEL, 1981). Choukar e Subba Rao, citados por ANUSUYA e SULLIA (1984) destacam o gênero *Fusarium* como o mais antagonista e encontraram respostas diferentes entre espécies de *Rhizobium*. Entre as bactérias, citam-se *Pseudomonas* e *Bacillus* como os gêneros mais antagônicos (PARKER e GROVE, 1970).

Existem controvérsias quanto ao verdadeiro efeito antagônico dos actinomicetos principalmente do gênero *Streptomyces* frente ao *Rhizobium*. As respostas variam em função do solo e seu manejo (PATEL, 1974; MARTYNIUCK e WAGNER, 1978; COELHO e DROZDOWICZ, 1979; SCOTTI et alii, 1981; DÖBEREINER et alii, 1981), do tipo de actinomiceto (DAMIRGI e JOHNSON, 1966; PATEL, 1974; KOSSLACK e BOHLOOL, 1985; SAITO et alii, 1985) e das condições de estudo (TRINICK e PAR-

KER, 1982; KOSSLACK e BOHLOOL, 1985). Em solos de cerrado brasileiro submetido a práticas de calagem, foi reportado que a população de actinomicetos constituia de 75 a 94% da população microbiana total (COELHO e DROZDOWICZ, 1979). PATEL (1974) reportou valores de 20 até 30% nos cinco solos estudados. A calagem favoreceu incrementos na densidade dos actinomicetos de 10^5 para 10^6 cel/g de solo assim como a atividade da própria toxina.

A maioria dos estudos de antagonismo são desenvolvidos "in vitro" em meio de cultura agarizado o que poderia não representar as verdadeiras condições que existem no solo (TRINICK e PARKER, 1982). KOSSLACK e BOHLOOL (1985) não conseguiram reproduzir na nodulação da soja, efeitos antagônicos de quatro actinomicetos que inibiam duas estirpes de *B. japonicum* em meio de cultura. Similares resultados relatam Smith e Miller (1974) citados por HAM (1980) com isolados bacterianos. A turfa, contrariamente, por ser um solo orgânico, com valores de pH corrigidos, apresenta condições ideais para o desenvolvimento de actinomicetos e portanto, produção de antibióticos que podem reduzir sensivelmente a população de *Rhizobium* (FONSECA et alii, 1985). Sendo pobres competidores, os actinomicetos não predominam na rizosfera (ROVIRA, 1965; RAMIREZ e ALEXANDER, 1980) por tanto seus efeitos antibióticos na maioria dos solos são expressos a nível de microsítios (TRINICK, 1982). A presença de

argilas tipo caolinita ou montmorilonita foi sugerida como responsável pela inativação das toxinas excretadas exercendo desta forma proteção ao *Rhizobium* (HABTE e BARRION, 1984).

A resistência natural (80 µg/ml de sulfato de estreptomicina) que apresentaram as estirpes de *B. japonicum* (SCOTTI et alii, 1981) e as estirpes de *R. phaseoli* (PITARD et alii, 1982) seria uma manifestação do grau de antibiotismo presente nos solos e explicaria a razão das estirpes do inoculante, cuja resistência natural era de 5 a 10 µg/ml do antibiótico, apresentarem problemas de sobrevivência e competição.

A resistência a antibióticos (SCOTTI et alii, 1981; SA et alii, 1983; FONSECA et alii, 1985) e a resistência a fungicidas da semente (RAMIREZ e ALEXANDER, 1980; LENNOX e ALEXANDER, 1981; HOSSAIN e ALEXANDER, 1984; JOEL e GIDDENS, 1984) tem sido sugeridas como características que incrementariam as vantagens competitivas das estirpes de *Rhizobium* quando introduzidas em ambientes com forte antibiotismo, turfa ou solo, permitindo maior sobrevivência, rápida colonização da rizosfera e pronta nodulação.

A resistência a fungicidas foi indicada como atributo ecológico importante de incluir nas estirpes dos inoculantes (BROCKWELL, 1981). Indiretamente, permitiria aplicar produtos químicos na sementes em contato com o inócu-

lo que além de controlar patógenos e permitir plantas mais saudáveis, controlariam a microflora rizosférica antagonista ao *Rhizobium*, principalmente os protozoários, ativos predadores (HOSSAIN e ALEXANDER, 1984; JOEL e GIDDENS, 1984). ODEYEMI e ALEXANDER (1977) desenvolveram uma técnica para a obtenção de estirpes resistentes a fungicidas, utilizada amplamente em *R. phaseoli*, *B. japonicum* e outras espécies. Existe comportamento diferencial dentro de espécies como entre estirpes dentro de uma espécie (demonstrado para *R. phaseoli* por PEREIRA, 1983).

Existe um vasto número de publicações que referem o efeito de fungicidas no *Rhizobium*. Resumidamente, dependendo da estirpe de *Rhizobium* e da concentração do produto, captan é considerado em geral como o mais tóxico (GRAHAM et alii, 1980) seguido por thiram e PCNB. Benomyl seria o menos inibitório (FAIZAH et alii, 1980) com efeito intra-específico. *R. phaseoli* apresenta certa tolerância intrínseca ao benomyl, sendo sensível ao captan e totalmente inibido pelo thiram (HABTE, 1985).

LENNOX e ALEXANDER (1981) encontraram resultados positivos na colonização da rizosfera pela inoculação de feijão com estirpes resistentes a estreptomomicina e espectinomomicina a níveis de 500 µg/ml e thiram a nível de 100 µg/ml e com sementes tratadas. Similares resultados são sugeridos por BUSHBY (1981a, b).

As marcas de resistência a antibióticos e fungicidas têm sido utilizadas com relativo sucesso para a identificação de bactérias no solo (VIDOR, 1981; PEREIRA, 1983). Elas se constituem numa poderosa ferramenta sempre que seja garantida a integridade das propriedades simbióticas das estirpes. Porém, a proposta de vários autores (GIBSON, 1981; BROCKWELL, 1981) seria de usá-las para "armar" a estirpe do inoculante, tornando-a mais agressiva para que seja capaz de competir vantajosamente.

A resistência a fagos seria outra característica proposta (BROCKWELL, 1981). A respeito, VIDOR e MILLER (1980), isolaram indivíduos do mesmo serogrupo da estirpe 123 de *B. japonicum* sensível a *Bdellovibrio*, que eram capazes de sobreviver na presença de fagos, tendo sido sugerido que mudanças na superfície celular, configuração ou lisogenia seriam responsáveis pela aquisição de tal resistência.

Tem sido observado que as estirpes de *Rhizobium* introduzidas em solos de baixas populações de rizóbios nativos, normalmente se estabelecem sendo assumido que os mecanismos antagônicos exercidos pela população telúrica não limitam o estabelecimento da estirpe do inoculante (VIDOR, 1981). Ainda em solos onde a cultura se cultiva há vários anos, é provável que os fatores antagônicos sejam de importância secundária frente à competição existente entre estirpes nativas e introduzidas pelos sítios de infecção nodular.

(TRINICK, 1982).

A competição exercida pelos rizóbios nativos ou naturalizados poderia afetar a velocidade e nível de colonização do *Rhizobium* introduzido no solo pela ação de diversos fatores. A autoinibição ou produção de bacteriocinas foi sugerido como um mecanismo pelo qual toxinas produzidas por determinadas estirpes de *Rhizobium* (ROSCLYCKY, 1967) causariam antagonismo contra outras estreitamente correlacionadas. Já foi observada atividade bacteriocinogênica em estirpes de *R. trifolii* (BERGERSEN et alii, 1971), *R. lupini* e *R. sp* (ROSCLYCKY, 1967), *R. leguminosarum* (SCHWINGHAMER e REINHART, 1963; TICHY e LOTZ, 1981) e *R. phaseoli* (GROSS e VIDAVER, 1978). CASSINI (1980) detectou forte atividade bacteriocinogênica em 25% da população de *R. phaseoli* estudada sendo que em alguns casos era altamente específica de uma estirpe para outra.

BERGERSEN et alii (1971) verificaram atividade bacteriocinogênica em 24 até 65% das populações nativas de *R. trifolii* e sugeriram que esta poderia ser a causa da competição saprofítica que elas apresentavam, portanto, foi aventada como fator incrementador da competitividade das estirpes (SCHWINGHAMER, 1971, 1975). Os resultados são contraditórios e pouco convincentes (SCHWINGHAMER e BROCKWELL, 1978; GROSS e VIDAVER, 1978; CASSINI, 1980). SCHWINGHAMER e BELKENGREN (1968) sugeriram três alternativas para o uso de

estirpes produtoras de bacteriocinas como ferramenta ecológica: a) em mistura no inoculante com uma estirpe eficiente e resistente à bacteriocina, b) uma única estirpe que reúna todas as características e c) transferir os genes para produção de bacteriocinas a estirpes altamente eficientes. HODGSON *et alii* (1985) examinaram a primeira sugestão e conseguiram mudar o padrão de competição a favor da estirpe do inoculante (90%).

Outros exemplos de autoinibição são reportados tanto em condições de laboratório (TRINICK e PARKER, 1982) como no solo (JOSEPH *et alii*, 1985). Foram descritas estruturas tipo fagos, denominadas SAM (substância antimicrobiana) produzidas por *R. trifolii* contra *Rhizobium* sp do caupí, e sendo responsáveis pela queda populacional, diminuição na nodulação e atraso no crescimento das plantas.

Entre os fatores abióticos do solo que influem na sobrevivência e competição saprofítica do *Rhizobium* (LIE, 1974), a acidez, associada ou não à toxidez de alumínio e manganês, as altas temperaturas e a dessecação têm sido indicadas como de efeito mais drástico (CALDWELL e VEST, 1970; HAM, 1980; DART, 1981). As propriedades do solo podem marcar grandes diferenças na nodulação (BUSHBY, 1984), através de um efeito direto na estirpe de *Rhizobium* ou na simbiose além da formação dos nódulos, sendo difícil abordar os efeitos em forma separada. Existem evidências de que a aci-

dez afeta a sobrevivência e colonização da rizosfera (VÍDOR *et alii*, 1981; LOVATO *et alii*, 1985) tanto como as etapas de infecção do tecido do hospedeiro e desenvolvimento dos nódulos (BUSHBY, 1981a, b) e funcionamento da simbiose.

Por estas razões é sugerida a seleção de estirpes pela capacidade de crescer em condições de baixos valores de pH (4 a 4,5). Os testes prévios de laboratório fornecem informação primária de grande utilidade (DATE, 1981). THORNTON e DAVEY (1984) encontraram relação direta entre habilidade de crescer em meio ácido e persistência no solo sob condições similares.

Os efeitos da acidez do solo na fixação de nitrogênio estão associados as vezes aos efeitos das concentrações tóxicas de alumínio e/ou manganês (THORNTON e DAVEY, 1984), tanto como da inadequada suplementação de fósforo, cálcio ou molibdênio (BUSHBY, 1981b; DATE, 1981; LOVATO *et alii* 1985). O excesso de alumínio e manganês reduz a nodulação pela deformação dos pêlos radiculares e/ou redução no número de sítios de infecção (DATE, 1981). Porém, existe concordância em afirmar que seria um problema mais ligado à planta, já que níveis considerados tóxicos para o hospedeiro estariam dentro da faixa de tolerância para o gênero *Rhizobium*.

Níveis mínimos de tolerância a pH para *Rhizobium sp* variam entre 4,5 e 5,7 (VALARINI, 1981). Para *R. pha*

seoli são citados valores de 5,5, existindo grande variabilidade que não permite estabelecer uma regra geral. (VALARINI, 1981). Para níveis de resistência a Al^{+3} e Mn^{+2} no meio, esta mesma autora cita valores de 1,7 ppm e 300 ppm respectivamente para as dez estirpes de *R. phaseoli* testadas, com escassas variações entre estirpes.

Existem dificuldades para distinguir os efeitos das altas temperaturas e da dessecação na sobrevivência e competição saprofítica das estirpes de *Rhizobium* no solo. A data de plantio associada a altas temperaturas determinou falhas na nodulação de *B. japonicum* (CALDWELL e VEST, 1970). O tipo de solo e seu teor de argilas teria influência na viabilidade pela proteção exercida em contraposição ao que ocorre em solos arenosos (DANSO e ALEXANDER, 1974; OSA-AFIANA e ALEXANDER, 1982). O início da infecção e formação dos nódulos são consideradas as etapas mais sensíveis às altas temperaturas do solo (BARRIOS et alii, 1963). MUNÉVAR e WOLLUM (1981), relataram redução na atividade da nitrogenase e nos parâmetros de rendimento. Estirpes de *B. japonicum* diferiram quanto a tolerância a temperatura quando era incrementada de 27°C para 54,1°C no meio líquido de crescimento.

Baixa sobrevivência de rizobios nos inoculantes (LABANDERA et alii, 1982), na superfície da semente (SALLEMA et alii, 1982) e no solo (DANSO e ALEXANDER, 1974) é causada por condições de perdas de umidade ou dessecação. A

tolerância das estirpes a tais condições poder-se-ia constituir num critério de seleção para aumentar sua persistência (MARY *et alii*, 1985). BUSHBY e MARSHALL (1977) demonstraram que os rizóbios de crescimento rápido são mais suscetíveis à dessecação que os de crescimento lento. As diferenças qualitativas entre estirpes parecem ser suficientemente grandes para sugerir seleção por este atributo (MAHLER e WOLLUM, 1980; ALRASHIDI *et alii*, 1982). BUSHBY e MARSHALL (1977) sugeriram que o menor conteúdo de água nas células das estirpes de crescimento lento protegeria da dessecação extrema porque há redução na atividade das enzimas que funcionam normalmente com baixas disponibilidades de água. Porém, existem relatos de que o inverso aconteceria em condições de perdas de umidade sem atingir completa dessecação (van RENSBURG e STRIDJOM, 1980) onde as estirpes de crescimento rápido, por apresentarem maior capacidade de reter água internamente, asseguraram o funcionamento de enzimas vitais.

Com referência à dessecação que ocorre na superfície da semente inoculada, uma série de publicações (NORRIS, 1971; HALE *et alii*, 1979; MANGUIAT *et alii*, 1981; AHMED e QUILT, 1981; SALEMA *et alii*, 1982; VINCENT e SCOTT, 1982; ELEGBA e RENNIE, 1984) sugerem a seleção de estirpes que sobrevivam melhor nessas condições junto com o uso de métodos de inoculação que protejam a bactéria. A utilização de aderentes e açúcares conseguiram diminuir a mortalidade bacte-

teriana significativamente e favoreceram o estado fisiológico da população remanescente com referência aos métodos simples de inoculação em seco (SALEMA *et alii*, 1982).

Finalmente, são sugeridas outras características adicionais que auxiliaram as estirpes na sua sobrevivência como saprófita: menores necessidades nutricionais ou capacidade de armazenar e reutilizar fósforo (CASSMAN *et alii*, 1981), motilidade quimiostática (ALEXANDER, 1977), produção de polissacarídeos extracelulares (EPS) que poderia conferir maior tolerância à acidez, quelação de Al^{+3} e/ou Mn^{+2} do meio, proteção frente a predadores e/ou virus, atuando como reservatório de nutrientes em situações limitantes (CUNNINGHAM e MUNNS, 1984 a, b).

2.2.3. COMPETIÇÃO PELOS SÍTIOS DE INFEÇÃO NODULAR

O inóculo introduzido no solo ou na semente deverá competir pelos sítios de infecção nodular com os rizóbios já estabelecidos e conseguir predominar nos nódulos formados (MOAWAD e BOHLOOL, 1984), somente assim serão de esperar benefícios da inoculação e incrementos na produção da cultura (VIDOR *et alii*, 1979).

Fatores próprios da estirpe (LABANDERA e VINCENT, 1975; VIDOR *et alii*, 1979; SAITO e RUSCHEL, 1980; VOSS

et alii, 1983), do hospedeiro (MARQUES PINTO et alii, 1974; VIDOR, 1977; PEREIRA, 1983; OLIVERA e VIDOR, 1984a, b, c), do solo (ROUGHLEY et alii, 1976; GHAI et alii, 1982; van RENSBURG e STRIDJOM, 1985) e suas interações, têm sido sugeridas como influenciando no comportamento competitivo das estirpes de *Rhizobium*.

Vários autores conseguiram demonstrar que, mesmo em condições de inferioridade numérica no inóculo, na superfície da semente ou da raiz, estirpes consideradas competitivas formavam a maioria dos nódulos (SKRLEDTA e KARIMOVA, 1969; FRANCO e VINCENT, 1974; REYES e SCHMIDT, 1981; JOSEPHSON e PEPPER, 1984; OLIVERA e VIDOR, 1984b). Foi proposto, que a competitividade pela formação dos nódulos seria uma característica intrínseca da associação simbiótica, enquanto que a competição saprofítica seria atributo da estirpe de *Rhizobium*.

O hospedeiro expressa sua preferência independentemente do número de rizóbios (ROBINSON, 1969). Espécies, cultivares e linhagens podem influenciar a habilidade competitiva das estirpes para nodular (PANKHURST, 1981; MATERON e HAGEDORN, 1982; OLIVERA e VIDOR, 1984a, b; KOSSLACK e BOHLOOL, 1985; Mc LOUGHLIN e DUNICAN, 1985). Os mecanismos envolvidos nessa seletividade permanecem ainda sem esclarecimento. Os exudados radiculares têm sido sugeridos como importantes fatores preinvasivos, responsáveis pela quimiota-

xia, porém, em variedades de *Cicer arietinum* não explicaram as diferenças marcantes na nodulação.

A capacidade de adesão dos rizóbios à superfície radicular poderia explicar diferenças na especificidade hospedeira e na capacidade competitiva (VIDOR, 1977; AMARGER e LOBREAU, 1982). CAETANO et alii (1986) estabeleceram para a simbiose alfafa - *R. meliloti*, que a adesão a sítios específicos estaria geneticamente determinada nas espécies do gênero *Rhizobium*. Os polisacarídeos extracelulares participariam no reconhecimento inicial de ambos os simbioses.

A seletividade hospedeira se manifesta já em etapas iniciais da associação e até a penetração na raiz e formação do cordão de infecção (LI e HUBBEL, 1969; DAZZO et alii, 1976; STACEY et alii, 1980; CAETANO et alii, 1986). Alguns pesquisadores atribuíram às lectinas presentes na semente ou raiz (PUEPPKE et alii, 1978) a função de reconhecimento entre os simbioses através de ligações com polisacarídeos bacterianos (DAZZO et alii, 1976; CAETANO et alii, 1986). WINARNO e LIE (1979) determinaram que as primeiras 24 horas após inoculação seria o período crítico de competição quando duas estirpes são inoculadas conjuntamente sejam homólogas ou heterólogas. Outras evidências apresentadas por BHUVANESWARI et alii (1980) e KOSSLACK e BOHLOOL (1984) demonstraram que o controle do hospedeiro é exercido nas primeiras horas após inoculação da radícula, que a infectividade constitui

uma propriedade transitória, ressaltando com isto a importância das chances que permite uma localização oportuna do inóculo no momento crítico da infecção. Dificuldades metodológicas para esses tipos de estudo, têm atrasado os avanços nesta área (BUSHBY, 1984) principalmente porque as uniões bactéria-raiz têm sido estudadas em tempos de pós-inoculação muito tardios (CAETANO *et alii*, 1986).

A competição demonstrada pelas estirpes não homólogas, representa uma grande significância ecológica por que embora exista certo nível de reação específica com o hospedeiro estas não nodulam, mas reduzem as chances da estirpe nodulante, o que ficou demonstrado tanto na diminuição do número de nódulos como da atividade da nitrogenase (WINARNO e LIE, 1979).

Parâmetros como velocidade de nodulação e identificação do primeiro nódulo formado seriam indicadores do relativo sucesso de uma estirpe na competição (LABANDERA e VINCENT, 1975). O chamado "índice competitivo" (MARQUES PINTO *et alii*, 1974; AMARGER e LOBREAU, 1982) expressaria a proporção de nódulos formados pelos respectivos componentes do par competidor em condições de igual representação na superfície radicular, sendo útil para quantificar o sucesso da estirpe e a especificidade hospedeira. Até certos limites de inferioridade numérica no inóculo ou na superfície radicular, que poderia se situar segundo os autores entre 10:1 até

100:1 a estirpe introduzida assegurou a nodulação quando era competitiva (LABANDERA e VINCENT, 1975; REYES e SCHMIDT, 1981, ROBERT e SCHMIDT, 1983; JOSEPHSON e PEPPER, 1984; MOAWAD e BOHLOOL, 1984).

Existe controvérsia quanto à natureza competitiva das estirpes eficientes (TRINICK, 1982). Para alguns autores (ROBINSON, 1969; MARQUES PINTO et alii, 1974; LABANDERA e VINCENT, 1975; FRANCO e VINCENT, 1976) os simbiossiontes efetivos são também os mais competitivos. PERES e VIDOR (1980a) não encontraram relação para *B. japonicum*, assim como VIDOR et alii (1979) e AMARGER (1981a, b). FRANCO e VINCENT (1976) relataram nodulação pobre de estirpes eficientes na presença de bactérias ineficientes do solo. Isto indicaria que as estirpes de *Rhizobium* selecionados pela eficiência apresentam variabilidade no parâmetro de competitividade pelos sítios de nodulação e não podem ser feitas previsões a respeito (TRINICK, 1982).

Como já foi dito, a colonização da rizosfera expressa como número de rizóbios na superfície radicular ou efeito rizosférico R/S (LOVATO et alii, 1985) não estaria associada à competição pela nodulação. O efeito rizosférico foi irrelevante nas primeiras semanas após germinação, não superando valores de 5 a 15 para *B. japonicum* (REYES e SCHMIDT, 1981; MOAWAD et alii, 1984), *R. phaseoli* (ROBERT e SCHMIDT, 1984; LOVATO et alii, 1985), *R. leguminosarum* (MEADE

et alii, 1985) e *Rhizobium sp* (BUSHBY, 1984). O crescimento radicular foi explosivo para soja entre 9 e 30 dias do ciclo, porém não foram observados estímulos para a população de *B. japonicum* (REYES e SCHMIDT, 1981).

Poucos estudos têm sido conduzidos sobre a ecologia do *Rhizobium* na rizosfera. Porém, alguns que tentaram conhecer a dinâmica populacional desde semeadura até nodulação (RAMIREZ e ALEXANDER, 1980; HOSSAIN e ALEXANDER, 1984) têm evidenciado que o efeito rizosférico seria exercido pelo hospedeiro muito mais cedo. Na simbiose *B. japonicum* - soja tanto como *R. phaseoli* - feijão esse período seria nos primeiros quatro dias que incluem germinação das sementes. Posteriormente ocorria uma queda drástica, somente em parte justificada por efeitos antagônicos de outros microrganismos (LENNOX e ALEXANDER, 1981). A maioria dos estudos que tentaram relacionar a colonização da rizosfera com a nodulação foram realizados fora do período antes indicado (LABANDERA e VINCENT, 1975; FRANCO e VINCENT, 1976; LOVATO *et alii*, 1985), quando o efeito rizosférico já teria ocorrido. Isto explicaria as altas correlações encontradas entre nível de inoculação na semente e porcentagem de nódulos formados pela estirpe introduzida (GAUR e LOWTHER, 1982; AMARGER e LOBREAU, 1982; BUSHBY, 1984; BROCKWELL *et alii*, 1985). Uma dose de inoculação maior seria capaz de solucionar em parte, a queda populacional registrada nas primeiras semanas

do ciclo da cultura (BUSHBY, 1981a, b).

Incrementos na dose de inoculação têm sido sugeridos e recomendados para maximizar os resultados da inoculação com estirpes eficientes e competitivas (KÖLLING e FREIRE, 1986), com influências diretas na produção de matéria seca, de sementes e conteúdo de nitrogênio (BROCKWELL et alii, 1985) e prolongando o ciclo da fixação (PERES e VIDOR, 1980a). Quando o solo esta densamente populado com rizóbios nativos de eficiência inferior, incrementos nas doses de inoculação de 10 (MEADE et alii, 1985), 100 (BOONKERD, 1978) até 1000 (WEAVER e FREDERICK, 1974) vezes foram recomendados para garantir a nodulação pela estirpe do inoculante. IRELAND e VINCENT (1968) estabeleceram que pelo menos 10^5 a 10^6 células viáveis por semente seriam necessárias em condições pouco favoráveis. Entretanto, ELEGBA e RENNIE (1984) relatam que resultados satisfatórios foram obtidos somente quando se aumentava de 10^5 para 10^6 o número de *Rhizobium* em sementes de soja. A dose de inoculação não exercerá efeito significativo se a estirpe não for previamente selecionada por eficiência, e. competitividade (MC LOUGHLIN e DUNICAN, 1985).

Os estudos de dinâmica populacional revelaram também um incremento rizosférico significativo desde floração, enchimento de grãos e às vezes até o final do ciclo em soja (MOAWAD et alii, 1984), feijão (LOVATO et alii, 1985) e caupi (BUSHBY, 1981a, b). Se desconhecem os fatores envolvi

dos que poderiam estar associados à excreção de produtos resultantes de estágios muito ativos de desenvolvimento da planta. HUNGRIA et alii (1985b) em *Phaseolus vulgaris* determinaram entre floração e formação das vagens, um período de máxima atividade da nitrogenase, crescimento significativo da cultura com máxima translocação e metabolização do nitrogênio a nível das vagens. LOVATO et alii (1985) para esta mesma cultura atribuem as altas relações R/S à senescência nodular e à liberação e multiplicação de rizobios na rizosfera.

Poucas referências da literatura avaliam os efeitos da senescência nodular (MOAWAD et alii, 1984). BUSHBY (1981a,b) relata que a população de *Rhizobium* na rizosfera incrementaria pelo menos dez vezes a partir dessa liberação. Embora se tratando de culturas anuais, como feijão e soja, as flutuações populacionais que provocam mudanças na composição dos nódulos, exigem que as estirpes do inoculante apresentem boa sobrevivência no rizoplano durante o ciclo da cultura, colonizando o tempo que seja necessário para controlar o avanço das nativas (PERES e VIDOR, 1980). KOSSLACK e BOHLOOL (1985) relataram diferenças entre estirpes na capacidade de continuar produzindo nódulos durante o ciclo da cultura. NUTMAN (1981) cita que em estudos fisiológicos ficou demonstrado que nodulações esparsas, com poucos e grandes nódulos controlam melhor novas infecções, mediante bloqueio, o que não aconteceria com nodulações mais abundantes.

O pronunciado efeito rizosférico do hospedeiro nas etapas posteriores à floração poderia significar um mecanismo pelo qual as estirpes de *Rhizobium* nativas mantêm uma população basal na rizosfera embora não fossem capazes no início de superar as vantagens numéricas e estratégicas do inóculo (MOAWAD et alii, 1984). Estas observações contribuem para se compreender a razão das estirpes nativas predominarem nos nódulos em período avançado do ciclo da cultura (SAITO e RUSCHEL, 1980) quando ocorre senescência nodular das estirpes inoculadas e ressaltam a importância de se considerar a persistência nodular tanto como a velocidade de nodulação como atributos da competitividade para formação de nódulos.

Os estudos clássicos de competição analisam a composição nodular entre 4 a 7 semanas após inoculação, revelando assim só parcialmente os fenômenos competitivos, já que ocorrem mudanças na proporção de nódulos formados pelas estirpes do inóculo tanto quanto com as estirpes do solo. Não necessariamente a porcentagem de nódulos de uma determinada estirpe na primeira amostragem será a mesma nas seguintes (MOAWAD et alii, 1984), ocorrendo as vezes completa inversão nas posições relativas das duas estirpes combinadas no inóculo (TRUJILLO e FREIRE, 1986) ou avanço das estirpes nativas que deslocam as estirpes introduzidas (SAITO e RUSCHEL, 1980). Isto reveste grande importância ecológica e agrônômica quan-

do tais reversões implicam mudanças na efetividade simbiótica afetando o rendimento final da cultura.

2.2.4. SOBREVIVÊNCIA NA TURFA

Qualquer suporte de inoculante deverá possuir as seguintes propriedades: a. ser atóxico para o *Rhizobium*; b. fornecer nutrientes e proteção física; c. granulação que permita máxima aderência às sementes inoculadas; d. possuir uma boa retenção de água e capacidade tampão; e. ser econômico e de fácil manipulação (RANDRUP, 1981). Uma avaliação da literatura leva a considerar a turfa como principal e mais completo suporte para a produção de inoculantes (ROUGHLEY, 1975). Porém, rigorosos testes devem ser conduzidos para selecionar previamente as turfas mais adequadas (ROUGHLEY, 1970; RUIZ ARGÜESO et alii, 1979). Análises físico-químicas para determinação da porcentagem de matéria orgânica, relação C/N dos componentes nitrogenados, alcatrão, densidade aparente, pH tanto como análises biológicas que determinam o nível de contaminantes aeróbicos, microaerofílicos, protozoários e actinomicetos (RANDRUP, 1981).

Existem diferenças marcantes na sobrevivência de estirpes de *Rhizobium* em várias turfas (ROUGHLEY e VINCENT, 1967; DATE e ROUGHLEY, 1977). Portanto, são imprescindíveis e definitivos os estudos de viabilidade durante o ar-

mazenamento e distribuição dos inoculantes (SICARDI *et alii*, 1969).

Baixa sobrevivência de *Rhizobium* nas turfas comerciais não esterilizadas poderia ser atribuída: as próprias estirpes (VAN SHREVEN, 1970; LOPES e GIARDINI, 1977; MORETTI e SAITO, 1978; RUIZ ARGÜESO *et alii*, 1979; ASTRODJOM e van RENSBURG, 1981) que não possuem capacidade competitiva frente aos microrganismos habitantes da turfa, no uso dos nutrientes disponíveis ou pela sensibilidade aos antimetabólicos produzidos, ao tipo de turfa, origem e propriedades (ROUGHLEY, 1970; RUIZ ARGÜESO *et alii*, 1979; SAITO *et alii*, 1985), assim como a fatores relacionados ao manuseio do inoculante durante o armazenamento e a distribuição como ser alta temperatura e perda de umidade (DATE e ROUGHLEY, 1977; LABANDERA *et alii*, 1982; SOMASEGARAN *et alii*, 1984).

No Brasil, o material usado como veículo no preparo de inoculantes é um solo turfoso, com valores de pH corrigidos para 7, níveis consideráveis de matéria orgânica e possuindo uma intensa atividade microbiológica. Tem sido determinados valores de 8×10^4 até 5×10^8 actinomicetos por grama de turfa, do gênero *Streptomyces* provavelmente da série cinza, assim como protozoários do tipo das amebas (5×10^4 /g), flagelados (1×10^3 /g) e cistos (10^5 /g de turfa) (FONSECA *et alii*, 1985). Estes microrganismos pelos seus efeitos antagônicos e predadores têm sido sugeridos como os res-

ponsáveis pela redução das concentrações de *R. phaseoli* e *B. japonicum* nos inoculantes (MORETTI e SAITO, 1978; FONSECA **et alii**, 1985).

A população de actinomicetos da turfa tanto como do solo seria heterogênia no nível de antibiotismo expressado frente ao *Rhizobium* (SCOTTI **et alii**, 1981; SAITO **et alii**, 1985). Em solos de cerrado, a resistência natural a estreptomicina e outros antibióticos foi responsável da maior sobrevivência apresentada por estirpes de *B. japonicum* (SCOTTI **et alii**, 1981; SÁ **et alii**, 1983) e por estirpes de *R. phaseoli* (PITARD **et alii**, 1982), sendo esta uma característica desejável a introduzir nas estirpes dos inoculantes. FONSECA e SAITO (1982) estudaram a sobrevivência de estirpes de *R. phaseoli* resistentes a estreptomicina, espectinomicina e novobiocina. Citam vantagens competitivas para os mutantes resistentes a 150 µg/ml de sulfato de estreptomicina em turfa não esterilizada, provavelmente por apresentarem menor sensibilidade aos antimetabólitos presentes.

Resultados de diversas pesquisas indicam que a irradiação da turfa é o procedimento mais recomendável para a redução dos contaminantes antagônicos ao *Rhizobium* prolongando sua sobrevivência tanto quantitativamente como favorecendo a viabilidade das células (van SCHREVAN, 1970, DATE e ROUCHLEY, 1977; SOMASEGARAN, 1985). A esterilização da turfa com radiações gama não elimina completamente os con

taminantes (PARKER e VINCENT, 1981; STRIDJOM e van RENSBURG, 1981), porém assegura um nível de contaminação que não interfere com o inóculo de *Rhizobium* impregnado. A esterilização por autoclavagem 4 horas a 121°C poderia ser prejudicial para o crescimento posterior da bactéria (ROUGHLEY e VINCENT, 1967) e muitas vezes apresenta efeitos tóxicos (LOPES e GIARDINI, 1977).

Foram registradas diferenças entre as turfas quanto à população de actinomicetos (SAITO et alii, 1985) e este, entre outros, são fatores determinantes da dose de irradiação a ser recomendada (PARKER e VINCENT, 1981). Doses de 2,5 Mrad não foram suficientes para algumas turfas que apresentavam níveis de 2×10^7 actinomicetos por grama de turfa (SAITO et alii, 1985). Outros autores relatam excelentes resultados na sobrevivência de espécies e estirpes de *Rhizobium* em turfas irradiadas com 2,5 até 5,0 Mrad (ROUGHLEY e VINCENT, 1967; MORETTI e SAITO, 1978; LOPES e GIARDINI, 1977). FONSECA et alii (1985), em turfas irradiadas com 5,0 Mrad e usando mutantes resistentes a antibióticos conseguiram crescimento e sobrevivência de *Rhizobium phaseoli* além dos 180 dias de incubação a 4°C.

A respeito da temperatura de armazenamento, a viabilidade das estirpes varia sob condições de 4°C ou 28°C: THOMPSON (1980) estabelece que temperaturas de 4°C seriam

mais favoráveis para *Rhizobium* de crescimento rápido enquanto que 26°C o seria para os de crescimento lento. SOMASEGARAN *et alii* (1984) relataram comportamento diferencial a nível de estirpe; porém, a maioria dos *R. phaseoli* testados so breviveram melhor a 28°C (SOMASEGARAN, 1985). Considerando períodos de armazenamento prolongados, as baixas temperaturas (4°C) foram em geral mais favoráveis para a sobrevivência do *Rhizobium* que as temperaturas de crescimento ambiente (28°C).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. BACTÉRIAS

3.1.1. ESTIRPES DE *Rhizobium phaseoli*

Foram utilizadas 17 estirpes de *R. phaseoli*, cujo código e algumas propriedades são apresentadas na Tabela 1. As estirpes são provenientes da Coleção de Estirpes da Seção de Microbiologia do Solo, do CENA, Piracicaba, SP, mantidas em meio de cultura de ágar-levedura-manitol (item 3.2.1) com óleo mineral e na geladeira (4°C).

3.1.2. ISOLADOS DE *Streptomyces*

Um total de 13 isolados do gênero *Streptomyces* foram utilizados para os testes de antagonismo frente ao

TABELA 1. Código, origem e algumas características das estirpes de *R. phaseoli* utilizadas.

Nº CENA	Número original	Origem	Efi- ciên- cia	pH (4,5)	Outras
C05	C05	Piracicaba/SP	+	-	
C18	1020	CIAT-Colombia	+	-	
C40	CIAT-255	CIAT-Colombia	+	+	hup ⁺ bac ⁺
C88	SEMIA 487	IPAGRO-RS	+	+	
C89	CIAT-57	Australia	-	-	hup ⁻ nif ⁻
C100	1640 (CIAT 640)	CIAT-Colombia	+	-	spc ⁺
C102	1632 (CIAT 632)	CIAT-Colombia	+	-	
C138	1166 (CIAT 166)	CIAT-Colombia	+	+	
C179	1049	CIAT-Colombia	+	+	
C183	1026	CIAT-Colombia	+	+	
C184	SMS 149	Campinas/SP	+	+	
C353	1899 (CIAT 899)	CIAT-Colombia	+	+	str ⁺ clo ⁺
C354	1090 (UMR 492)	CIAT-Colombia	+	+	
C355	1144 (DFH 102)	CIAT-Colombia	+	+	
C356	1135 (UFRGS 196)	Porto Al./RS	+	+	
C357	1024 (CIAT 2526)	CIAT-Colombia	+	+	
C358	V23	CPAC-Goiás	+	+	

Rhizobium. Todos eles foram obtidos em trabalhos prévios desenvolvidos na Seção de Microbiologia do Solo, do CENA, Piracicaba (SP). Os isolados denominados At1, At2, At3, At4, At5, At6 e At7 procedem de uma turfa acondicionada para uso industrial (seca, moída e neutralizada) e os isolados At8, At9, At10, At11, At12 e At13, de inoculantes comerciais com data vencida. Para sua conservação na geladeira foi utilizada o meio de amido-caseína-agar (KÜSTER e WILLIAM, 1964) cuja composição é apresentada no ítem 3.2.2.

3.2. MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS

3.2.1. MEIO Y.M.A. (YEAST MANITOL AGAR) (FRED ET ALII, 1932 MODIFICADO)

Manitol	2,5 g
Glutamato de sódio	0,5 g
K_2HPO_4	0,08 g/ml
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,10 g
$CaCl_2$	0,04 g
$FeCl_3$	4 mg
Extrato de levedura	0,25 g
Agar	12,0 g
pH	6,8

Completar com água destilada até 1000 ml. Esterilizar por autoclavagem (1,0 atmosfera por 20 minutos). O meio Y.M.B. (Yeast Manitol Broth) foi preparado tal como Y.M.A., exceto o ágar.

3.2.2. MEIO AMIDO-CASEINA-ÁGAR (KÜSTER E WILLIAM, 1964)

Amido	10,0 g
Caseina (livre de vitaminas)	0,3 g
KNO ₃	2,0 g
NaCl	2,0 g
K ₂ HPO ₄	2,0 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	50,0 mg
CaCO ₃	20,0 mg
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	10,0 mg
Ágar	20,0 g
pH	7,0 a 7,2

Completar com água destilada até 1000 ml e esterilizar por autoclavagem por 20 minutos a 1,0 atmosfera.

3.2.3. MEIO BASAL PARA PH (AYANABA E GRAHAM, 1983)

MgSO ₄ . 7 H ₂ O	36 mg
CaCl ₂	32 mg
KCl	0,75 mg
MnCl ₂	0,63 mg
ZnSO ₄	0,64 mg
CuCl ₂	0,013 mg
Na ₂ MoO ₄	0,004 mg
Co(NO ₃) ₂	0,0002 mg
Fe EDTA	0,68 mg
K ₂ HPO ₄	0,68 mg
Extrato de levedura	1,0 g
Galactose	5,0 g
Arabinose	5,0 g
Biotina	0,001 mg
Pantotenato de Ca	0,4 mg
Tiamina HCl	0,4 mg
Glutamato de Na	1,8 g
Verde Bromo Cresol	125 ml
Ágar	20,0 g
Água destilada até 1000 ml	

O pH é acertado para 4,3. Esteriliza-se por autoclavagem a 1,0 atmosfera por 20 minutos.

A adição de alumínio como AlCl₃ à razão de

13,33 g por litro deve ser feita após autoclavagem. Toma-se uma alíquota do meio pronto, agrega-se o sal de alumínio em forma proporcional, ajustando o pH com NaOH ou HCl. Em função dos dados da alíquota se calcula a adição ao volume total. A solução de $AlCl_3$ é agregada ao meio de cultura utilizando-se filtro bacteriológico (0,45 microns). Desta forma consegue-se uma concentração final de 2,7 ppm de Al^{+3} .

A adição de Mn^{2+} é feita usando-se $MnSO_4 \cdot H_2O$ adicionado ao meio não esterilizado, sendo que antes da autoclavagem deve se acertar o pH a 4,3. Agregam-se 921,8 mg do sal para se obter uma concentração final de 300 ppm.

3.2.4. SOLUÇÃO DE VERMELHO CONGO

Solução aquosa 0,25%, utilizada na quantidade de 10 ml/litro de meio YMA.

3.2.5. SOLUÇÃO SALINA

Solução aquosa de cloreto de sódio 0,89% e autoclavada por 20 minutos a 1,0 atmosfera após a sua distribuição em tubos ou Erlenmeyer.

3.2.6. SOLUÇÃO NUTRITIVA PARA PLANTAS (MODIFICADA DE Mc KNIGHT, 1949).

CaSO ₄ . 2 . H ₂ O	150 g
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	20 g
KH ₂ PO ₄	20 g
KCl	30 g
Sol. A-Z	100 ml
Sol. D	100 ml
H ₂ O destilada	4700 ml
NaOH (1 M)	70 ml
pH final = 6,4	
Diluição em água destilada na proporção 1:10.	

- Solução A-Z de micronutrientes

H ₃ BO ₃	2,86 g
MnSO ₄ . 4 H ₂ O	2,03 g
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,22 g
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,08 g
H ₂ MoO ₄ . H ₂ O	0,09 g
Diluição em 1000 ml de água destilada	

- Solução D

FeCl ₃ . sol	16,8 ml
EDTA Na . 2 H ₂ O	2,0 g
Diluição em 1000 ml de água destilada	

3.2.7. SOLUÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO

Solução aquosa de hipoclorito de sódio 1% esterilizado por autoclavagem por 20 minutos a 1,0 atmosfera de pressão. Para esterilização de nódulos o tempo requerido foi de 1 a 3 minutos enquanto que para sementes 5 minutos, seguido de 6 lavagens com água esterilizada para retirar todo excesso (SOMASEGARAN e HOBEN, 1985).

3.3. ANTIBIÓTICOS E FUNGICIDAS

A Tabela 2 apresenta as drogas antimicrobianas utilizadas, sua composição química, modo de ação e fabricante.

3.4. PREPARO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE

Foi seguido o procedimento descrito por VALARINI (1980). As soluções de estreptomicina (sulfato) e kanamicina foram preparadas pesando 100 mg da droga e agregando 10 ml de água. Cloranfenicol, tetraciclina e eritromicina foram solubilizados primeiramente em 1 ml de metanol e completados com 9 ml de água destilada estéril.

Da mesma forma foram preparadas as soluções estoque de fungicidas levando em consideração a concentração de produto ativo presente na formulação comercial. Foram pe

TABELA 2. Formulação química, modos de ação e fabricantes dos antibióticos e fungicidas utilizados.

Nome	Formulação química	Modo de ação	Laboratório
Cloranfenicol (Clo)	2-amino 1,3 propanodiol	Interferente da síntese proteica	Carlo Erba
Eritromicina (Eri)	heterosídeo macrolídico	Interferente da síntese proteica	Lederle
Estreptomicina (Str) (sulfato)	aminoglicosídeo aminociclitol	Interferente da síntese proteica	Inlab
Ganamomicina (Kan)	aminoglicosídeo aminociclitol	Interferente da síntese proteica	Bristol
Tetraciclina (Tcl)	hidrocarboneto aromático	Interferente da síntese proteica	Pfizer
Thiram	disulfeto dimetil tiocarbonil	-	Rhodia
Benomyl	carbamato de benzimidazol	-	Dupont
Captan	dicarboximida triclorometil- -tiol ciclohexano.	-	Hokko

sados 143 mg, 200 mg e 200 mg de thiram, captan e benomyl respectivamente, dissolvidos em 1 ml de metanol e completado o volume com 9 ml de água destilada estéril.

3.5. TURFA

A turfa procedente da TURFAL, Indústria e Comércio de Curitiba, PR, seca, moída e neutralizada a pH = 7 foi acondicionada em sacos plásticos e submetida a três tratamentos de radiações gama: 0, 1 e 2,5 Mrad, usando a fonte de cobalto 60 modelo Gammabeam 650 (Atomic Energy of Canada Ltd) do CENA. Análises microbiológicas efetuadas nas amostras de turfa mediante contagem pelo método de diluição em placa no meio amido-caseína-ágar indicavam uma população de 8×10^5 cel/g de actinomicetos tipo *Streptomyces* na turfa que não recebeu irradiação, 2×10^3 cel/g na turfa irradiada com dose de 1 Mrad e sem contaminante nas placas correspondentes a concentrações de 10^3 nos tratamentos com 2,5 Mrad.

3.6. PLANTAS

Foram utilizadas plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) do cultivar Carioca-80 nos estudos de eficiência e competitividade realizados.

3.7. OBTENÇÃO DE RIZOBIOS NATIVOS

Uma mistura de 5 solos de mediana acidez foi utilizada para inocular vasos Leonard em estudos de competição com estirpes do inoculante. Os solos eram procedentes de áreas tradicionalmente produtoras de feijão do Estado de São Paulo.

As análises químicas e microbiológicas são apresentadas na Tabela 3.

TABELA 3. Análise do solo-inóculo utilizado nos estudos de competição.

Propriedades químicas								
pH(H ₂ O)	M.O. (%)	N(%)	P(μg/cm ³)	K	Ca	Mg	H+Al	V%
				----- meq/100 cm ³ -----				
5,47	4,44	0,14	46,8	0,38	3,74	1,31	4,95	51,5
População microbiana/g solo								
Bactérias totais	Fungos	Actinomicetos	Protozoários	<i>R. phaseoli</i>				
17,5 x 10 ⁵	34 x 10 ³	11,3 x 10 ⁵	1.700	57 x 10 ⁷				

As contagens da população microbiana foram realizadas segundo metodologia e meios de cultura indicados por AARONSON (1970).

Para as contagens de *R. phaseoli* nativos foi empregado o método de diluição em plantas pelo número mais provável (NMP) (SOMASEGARAN e HOBEN, 1985).

Na ocasião da inoculação, 3 g do solo inóculo suspendidos em água destilada estéril para facilitar sua distribuição foram incorporados a cada vaso.

3.8. ESTUDOS DE ANTAGONISMO MICROBIANO

Para evidenciar a ação antagonista dos *Streptomyces* isolados da turfa, foi utilizado o teste bloco de gelose agar. Uma suspensão densa de cada isolado de *Streptomyces* foi espalhada em placas de Petri contendo meio de amido-caseína-agar (item 3.2.2), incubando por 7 a 8 dias a temperatura de 28 a 30°C. Quando o crescimento estava uniforme na superfície da placa, foi retirado com auxílio de um tubo de vidro de 8 mm de diâmetro, um bloco (disco) de gelose de cada cultura crescida de *Streptomyces*. Os discos (até 4) foram dispostos simetricamente em placas de Petri onde tinha sido espalhada previamente uma suspensão densa de 0,1 ml de células das estirpes 1135, 1899, C05, SEMIA 487, CIAT 255, 1144, 1024 de *R. phaseoli*. As placas assim preparadas foram incubadas durante três dias a 26-28°C sendo observada a ocorrência de halos em torno do bloco de agar. Foi medido o diâmetro do halo e segundo o critério de PATEL (1974) os *Strep-*

Trichomyces foram classificados como fortemente antagônicos (> 20 mm), moderadamente antagônicos (> 15 e < 20 mm), pouco antagônicos (< 15 mm) e não antagônicos quando não apresentaram halos de inibição.

3.8.1. OBTENÇÃO DE ISOLADOS

Foram isoladas colônias que cresciam nos halos de inibição dos estreptomicetos sendo incluídos em novos estudos de antagonismo, e caracterizados por resistência a antibióticos, resistência a fungicidas para tratamento de sementes, tolerância a acidez e níveis altos de Al^{+3} e Mn^{+2} no meio, atividade bacteriocinogênica, sobrevivência na turfa e propriedades simbióticas (eficiência e competitividade) (VINCENT, 1970; SOMASEGARAN e HOBEN, 1985).

3.9. TESTES PARA COMPETIÇÃO SAPROFÍTICA

3.9.1. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

Os níveis de resistência natural a antibióticos das estirpes 1899, C05, SEMIA 487, 1135, CIAT 255, 1024 e 1144 e dos isolados foram determinados segundo o método de diluição em placas, descrito por VALARINI (1981), con-

tendo concentrações crescentes de cada droga: 0 até 1000 µg/ml de meio de cultura YMA. A partir das soluções estoque fizeram-se as diluições adicionando a 20 ml de meio de cultura o volume desejado.

As estirpes de *Rhizobium* indicadas e os isolados obtidos foram crescidos em tubos de 5 ml de meio YMB por três dias. Com replicador múltipla (AZEVEDO et alii, 1980) as culturas foram transferidas às placas contendo as drogas. Aos 3 e 5 dias de incubação a 28°C foram feitas as leituras e considerou-se nível de resistência à concentração imediata inferior àquela que impediu o crescimento da cultura (VALARINI, 1981).

3.9.2. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS

Os níveis de resistência natural aos três fungicidas, das estirpes 1899, SEMIA 487, C05 e dos isolados foram obtidos em forma similar à descrita no ítem anterior. As concentrações finais dos fungicidas foram previstas usando escala logarítmica crescente: 0, 1, 1,5, 2, 2,5 e 3 e ajustando finalmente o nível de resistência a valores de concentração em µg/ml do produto.

Para a caracterização das estirpes e isolados

por múltipla resistência a antibióticos (estreptomicina ou cloranfenicol) e fungicidas (benomyl, captan ou thiram) foram preparadas placas contendo as seguintes combinações: Str (1000 µg/ml) + thiram (100 µg/ml); Str (1000 µg/ml) + benomyl (1000 µg/ml); Str (1000 µg/ml) + Clo (1000 µg/ml) + benomyl (1000 µg/ml); Clo (1000 µg/ml) + benomyl (1000 µg/ml) e Str (1000 µg/ml) + captan (100 µg/ml).

3.9.3. ATIVIDADE BACTERIOCINOGÊNICA

As estirpes apresentadas na Tabela 1 e os isolados obtidos dos halos de inibição foram testados pela sua capacidade de produzir bacteriocinas para o qual procedeu-se conforme a técnica descrita por COSTA (1973). As estirpes foram crescidas em tubos com 5 ml de meio YMB por três dias e inoculadas com multialça de 17 unidades em placas contendo YMA. As placas foram assim incubadas por 3 a 5 dias até se observar crescimento denso e uniforme. A seguir as placas foram invertidas e colocado 1 ml de cloroformio na tampa, sendo fechadas por 15 minutos. Posteriormente foram entre abertas em ambiente asséptico durante 30 minutos até completa eliminação do clorofórmio residual.

A cada placa inativada adicionou-se 5 ml de meio YMA semisólido fundido e esfriado a 30°C, inoculado com 0,1 ml de cada estirpe indicadora que crescia em meio YMB.

Foi formada uma fina película sobre as colônias a serem testadas. As placas foram incubadas por 5 dias a 28°C quando se realizou a leitura dos halos de inibição em torno das colônias inativadas.

3.9.4. TOLERÂNCIA A ACIDEZ E NÍVEIS ALTOS DE ALUMÍNIO E MANGANÊS

Foi determinada a tolerância a valores de pH de 4,3 e níveis de Al^{+3} e Mn^{+2} de 100 mM e 300 ppm respectivamente nas estirpes 1899, C05, SEMIA 487 e os isolados obtidos utilizando o meio de AYANABA e GRAHAM (1983) descrito no ítem 3.2.3.

3.10. EFICIÊNCIA DAS ESTIRPES DE *R. phaseoli* E DOS ISOLADOS

A avaliação da infectividade e capacidade fixadora de N_2 das estirpes matrizes e os isolados obtidos nos estudos de antagonismo foi realizada em casa de vegetação, utilizando vasos de Leonard modificado (VINCENT, 1970) com uma mistura de areia e vermiculita na proporção 1:2 (v/v) previamente lavadas em água corrente e secas ao ar por 48 horas. Os vasos receberam 800 ml de solução nutritiva de Mc KNIGHT (1949) (item 3.2.6) e finalmente foram esterilizados

em autoclave a 121°C por duas horas.

As sementes da variedade Carioca-80 foram esterilizadas com álcool e hipoclorito de sódio (SOMASEGARAN e HOBEN, 1985) e lavadas com água esterilizada. Foram colocadas em número de quatro por vaso a 5 cm de profundidade fechando os vasos com metade de placas de Petri esterilizadas para controle de contaminação. Ocorrida a germinação em todos os vasos, procedeu-se ao desbaste deixando duas plantas por vaso e à inoculação dos tratamentos.

As estirpes matrizes C05, SEMIA 487 e 1899 e os isolados foram crescidos em 50 ml de meio YMB por 3 dias em agitação a 28°C. A inoculação foi feita colocando em cada vaso, com pipeta estéril, 2 ml de cada cultura que representava aproximadamente 2×10^9 células por mililitro. Em seguida, os vasos receberam uma camada de 1 cm de areia grossa lavada e esterilizada que serviu para proteger da contaminação entre tratamentos assim como das perdas por evaporação.

Foram incluídos dois tratamentos controle: uma testemunha com nitrogênio que recebeu 70 ppm sob a forma de NH_4NO_3 ao início do experimento e 35 ppm aos 20 dias totalizando 105 ppm, e um controle absoluto sem nitrogênio de nenhuma fonte externa.

Semanalmente era completado o volume dos vasos com água destilada ou solução nutritiva diluída em forma

alternada.

A temperatura média na casa de vegetação durante os 42 dias experimentais foi de 30°C, com uma mínima de 22°C e uma máxima de 35°C.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com nove tratamentos correspondentes a três estirpes matrizes, quatro isolados e duas testemunhas. Foram empregadas quatro repetições para cada tratamento.

A colheita das plantas foi realizada aos 35 dias após emergência. Separou-se parte aérea de raízes na altura do colo. A parte aérea e as raízes sem nódulos foram colocadas em sacos de papel a secar em estufa a 65-70°C por 72 horas e determinou-se o peso da matéria seca. O N total foi avaliado pelo método semi-micro Kjeldahl conforme SARRUGE e HAAG (1974), determinando-se a %N na matéria seca da parte aérea.

Quarenta nódulos de cada tratamento inoculado (10 por vaso), foram destacados e utilizados para avaliações individuais de peso e atividade de nitrogenase (ARA). Os nódulos restantes foram contados e determinado o peso da massa nodular seca e o tamanho usando a relação entre o peso e número totais.

A eficiência relativa de cada tratamento foi

calculada segundo a fórmula:

$$Ef_r = \frac{\text{m\u00e9dia N-total planta inoculada}}{\text{m\u00e9dia N-total planta C/N}} \times 100$$

adaptada da fórmula de BERGERSEN et alii (1971).

A eficiência nodular foi avaliada segundo a relação:

$$Ef_{nod} = \frac{\text{mg N fixado} - \text{mg N testemunha}}{\text{mat\u00e9ria seca nodulos (g)}}$$

3.10.1. PADRÃO DE NODULAÇÃO DAS ESTIRPES E ISOLADOS

Na ocasião da colheita do experimento relatado no ítem 3.10, 40 n\u00f3dulos (10/vaso) foram escolhidos ao acaso e destacados do sistema radicular com uma por\u00e7\u00e3o de tecido suficiente para garantir o fornecimento de fotossintatos durante o per\u00edodo de avalia\u00e7\u00e3o (HUNGRIA, 1985). A colheita foi feita entre 8:30 h e 9:30 h da manh\u00e3.

Para a determina\u00e7\u00e3o da atividade da nitrog\u00e9nese pelo m\u00e9todo da redu\u00e7\u00e3o do acetileno (ARA), cada n\u00f3dulo foi colocado dentro de uma seringa pl\u00e1stica de 3 ml, previamente identificada, e incubado num volume de 2 ml de ar (90%) com acetileno (10%) por 30 minutos. O in\u00edcio do per\u00edodo de incuba\u00e7\u00e3o entre n\u00f3dulo e n\u00f3dulo foi de um minuto, tem-

po requerido para o registro do pico de etileno no cromatô -
 grafo. Após o tempo de incubação em temperatura ambiente,
 0,5 ml do volume contido na primeira seringa foram injetados
 no cromatôgrafo de gás seguido de minuto em minuto pelas cor
 respondentes amostras em forma sequencial.

Foi utilizado um cromatôgrafo marca Beckman mo
 delo GC-65 usando detector de chama de hidrogênio a 50°C e
 coluna de vidro de 1/8 polegada (3,2 mm de diâmetro externo)
 por 0,5 m, contendo Porapak N de 100-120 mesh a 110°C. O gás
 carregador foi o N₂ a um fluxo de 40 ml/min. O padrão de
 C₂H₄ foi preparado na concentração de 500 vpm.

Os nódulos identificados foram posteriormente
 pesados (peso da matéria verde) e determinada a atividade es
 pecífica da nitrogenase (nmoles de C₂H₄/mg nódulo.hora).

Os cálculos para a atividade específica da ni
 trogenase de cada nódulo foram realizados seguindo a fórmu
 la:

$$CE = L \times A \times K \times R$$

onde

CE = concentração de etileno, evoluído

L = leitura do pico (mm) da amostra

A = atenuação do pico

K = fator de correção das amostras

R = fundo de escala do aparelho

O fator K foi calculado da seguinte maneira:

$$K = K' \times \frac{1}{\text{tempo de incubação}} \times \frac{1}{\text{volume injetado}} \times \text{volume de incubação} \times \frac{1}{\text{mg de cada nódulo}}$$

sendo K' o fator de correção para o padrão de C₂H₄ que se calcula segundo:

$$K' = \frac{\text{concentração de etileno}}{L \times A \times R}$$

sendo

L e A : leitura e atenuação do pico do padrão

R : fundo de escala do aparelho

O volume de padrão injetado foi de $0,5 \times 10^{-3}$ ml.

A informação de peso e atividade individual de cada nódulo foi organizada em classes de frequência para determinar o padrão de comportamento de cada estirpe de *Rhizobium phaseoli*.

Para conhecer a estabilidade genética das características de resistência a antimetabolitos, os 40 nódulos de cada tratamento foram posteriormente esterilizados em álcool (1 minuto) e solução de hipoclorito de sódio (3 a 5 minutos) e finalmente lavados por 5 vezes em água estéril sen-

do mantida a individualidade em todas as etapas. Com ajuda de alfinete estéril, cada nódulo foi esmagado e colocado a crescer em placa de Petri com YMA e solução de vermelho congo onde previamente tinham sido incorporados os antimicrobianos. Foram preparadas placas com Str (1000 µg/ml), com thiram (100 µg/ml), com Str (1000 µg/ml) + thiram (100 µg/ml) e placas controle. As placas foram quadriculadas de forma a se obter 20 quadrantes por placa.

3.10.2. EVOLUÇÃO DO PADRÃO DE NODULAÇÃO NO ISOLADO C05 II

A mesma metodologia descrita no item anterior foi utilizada para estudar a evolução no ciclo da cultura dos padrões de tamanho e atividade nodular deste isolado. Para tal estudo foi montado um pequeno experimento com 18 vasos Leonard inoculados com 1 ml de uma cultura de C05 II que apresentava 3×10^9 cel/ml e 5 vasos testemunha sem inocular como controle interno, da mesma forma que o descrito no item 3.10.

Em cada data de amostragem correspondente a 20, 26, 35, 44, 55 e 65 dias após emergência foram destacados 150 nódulos ao acaso de 3 vasos (50 por vaso) analisando-os individualmente segundo tamanho, atividade específica da nitrificação e acompanhando com determinações de evolução da matê-

ria seca da parte aérea (g/planta).

Na 1ª, 2ª e 5ª colheita, 30 nódulos ao acaso foram esterilizados e colocados a crescer em placas de Petri com meio seletivo (Str 1000 µg/ml + thiram 100 µg/ml) para conferir a manutenção das características de resistência adquiridas.

3.11. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE COMPETITIVA POR SÍTIOS DE INFECÇÃO NODULAR

Um outro experimento foi montado em vasos Leonard utilizando a variedade de feijão Carioca-80 sendo que os procedimentos de preparo e instalação estão descritos no item 3.10.

Foram utilizadas as estirpes C05 e 1899 e o isolado C05 II crescidas por 5 dias em meio YMB sob agitação a 28°C. Para este experimento foi utilizada uma variante da estirpe C05 resistente a 300 µg/ml de estreptomicina, da coleção de culturas da Seção de Microbiologia do Solo do CENA que tinha sido testada por infectividade e eficiência em ensaios prévios.

As contagens das culturas atingiram concentrações de 2 a 4 x 10⁹ cel/ml. Num grupo de vasos foi adicionado 1 ml total de caldo segundo o seguinte esquema de trata-

mentos:

1. C05 (resistente a 300 $\mu\text{g/ml}$ Str)
2. 1899 (resistente a: Str (1000 $\mu\text{g/ml}$) + thiram (100 $\mu\text{g/ml}$) + benomyl (1000 $\mu\text{g/ml}$)
3. C05 II (resistente a: Str(1000 $\mu\text{g/ml}$) + thiram (100 $\mu\text{g/ml}$)
4. C05 + C05 II
5. C05 II + 1899

Nos tratamentos com misturas a inoculação do vaso foi feita com 0,5 ml de cada estirpe separadamente.

Foram incluídos tratamentos controle sem nitrogênio e com 70 ppm de N sob a forma de NH_4NO_3 colocado na ocasião do desbaste.

Com este mesmo esquema de tratamentos, foi incluído um segundo grupo de vasos Leonard nos quais foram agregados 3 gramas de uma mistura de solos cujas características foram apresentadas na Tabela 3. Da mesma forma foram preparadas as testemunhas e incorporado o solo-inóculo.

As temperaturas registradas na casa de vegetação durante o período do experimento foi de 13°C para a mínima e 24°C para a máxima.

A cinco semanas após emergência, período no qual iniciava-se a floração, as plantas foram colhidas sendo avaliados os parâmetros da parte aérea e nodulação segundo

descrição no item 3.10.

A atividade da nitrogenase pelo método da redução do acetileno (ARA) foi determinada colocando as raízes com nódulos em frascos de vidro de 500 ml fechados com tampas rosqueadas que tinham na sua parte superior rolhas do tipo "serum cap". Foram injetados 50 ml de C_2H_2 com prévia retirada de um volume igual da atmosfera do frasco. Incubou-se por 30 minutos a $28^{\circ}C$ e procedeu-se a injeção de 0,5 ml das amostras no cromatógrafo de gas (item 3.10.1).

Para os cálculos o procedimento geral foi similar ao descrito no item 3.10.1. Neste caso o volume da seringa é substituído pelo volume do frasco (500 ml) e o dado final referido a uma planta.

O percentual de ocorrência das estirpes nos nódulos foi estabelecido mediante o uso dos meios seletivos que as identificam, e isolando 20 nódulos por vaso. Foram usadas placas controle sem antimicrobianos e as estirpes nativas foram avaliadas por exclusão.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com 12 tratamentos de inoculação, dois controles sem inocular e quatro repetições.

3.12. SOBREVIVÊNCIA NA TURFA

Foram preparados inoculantes com as estirpes C05, 1899 e os isolados C05 I, C05 II e C05 III crescidos em meio YMB por 5 dias até completar concentrações no caldo de 2 a 4×10^9 cel/ml segundo contagens realizadas pelo método de diluição em placas (VINCENT, 1970). Trinta e cinco ml do caldo puro de cada cultura foram injetados em cada saquinho de turfa acondicionado segundo item 3.5, homogeneizando manualmente o material até completa impregnação. Um tratamento adicional foi considerado, injetando 5 ml de uma suspensão do isolado At5 em inoculantes preparados em turfas irradiados com doses de 2,5 Mrad e cada uma das culturas em estudo.

Os inoculantes foram mantidos durante todo o período em condições de 28°C sendo feitas avaliações de sobrevivência de rizobios aos 3, 15, 30 e 60 dias e do nível de contaminação, pelo método de diluição em placas com meio YMA com vermelho Congo. Foram feitas algumas determinações de porcentagem de umidade durante esse período.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com duas repetições e analisado como fatorial de $4 \times 5 \times 4$ sendo o primeiro fator o tratamento de irradiação da turfa (4 níveis), o segundo fator o número de estirpes e o terceiro fator as datas de contagens.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ESTUDOS DE ANTAGONISMO

As estirpes de *R. phaseoli* testadas revelaram diferentes graus de inibição quando confrontadas aos 13 isolados de *Streptomyces* da turfa (Tabela 4). As estirpes 1024 e 1899 não apresentaram em nenhuma ocasião halos de inibição nas placas de ágar. Como indica a Tabela 1, 1899 possui marcas de resistência a antibióticos (estreptomicina e cloranfenicol), que estão justificando esses resultados. Por ordem de tolerância seguem as estirpes 1135 e SEMIA 487 com 60 a 70% dos casos sem formação de halo e finalmente às estirpes CIAT 255, C05 e 1144 que apresentaram resistência a menos de 50% dos *Streptomyces* estudados (Figura 1).

Da mesma forma foi observada variabilidade do comportamento para os isolados de *Streptomyces* da turfa (Ta-

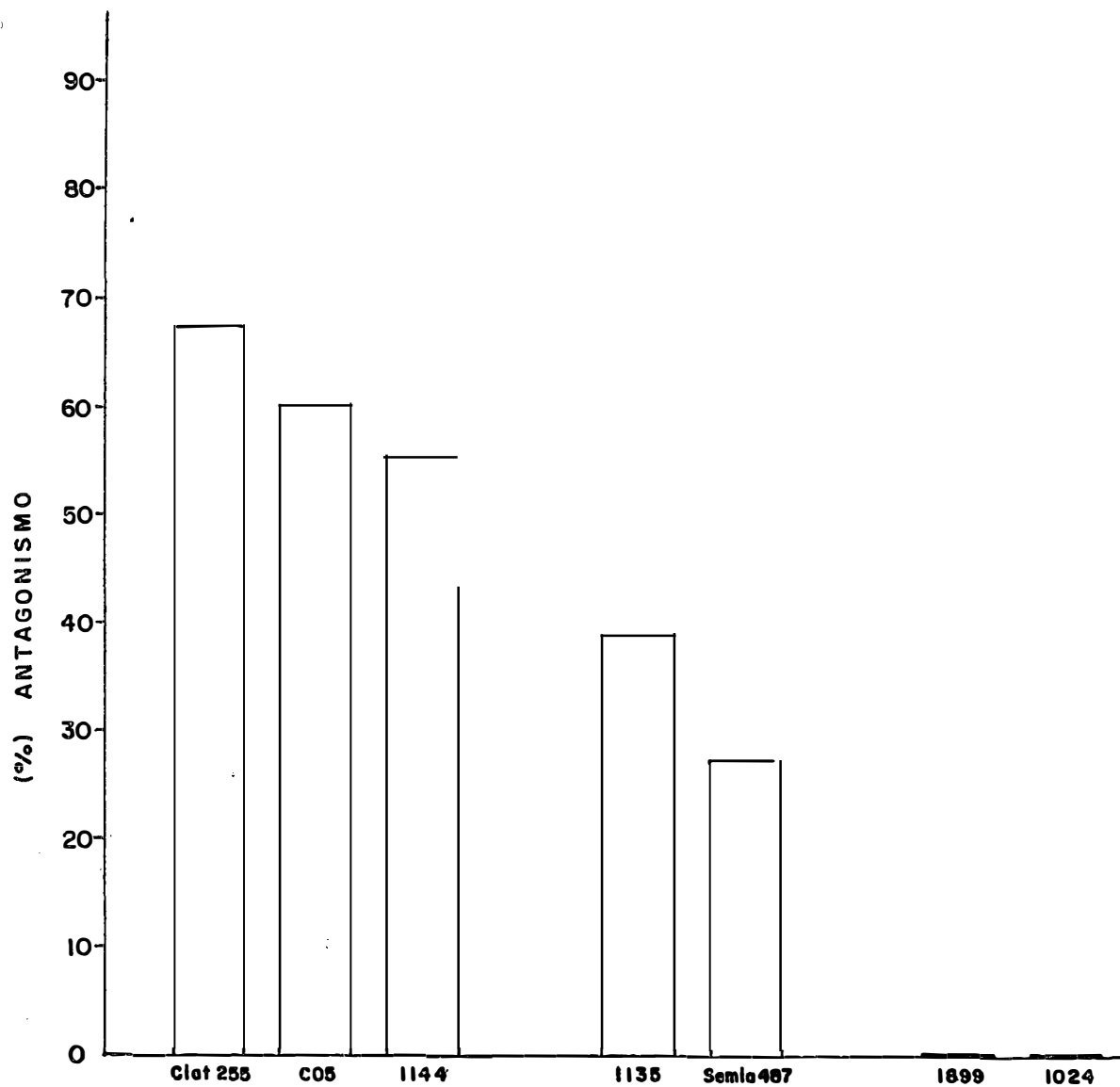


FIGURA 1. Padrão de sensibilidade de estirpes de *R. phaseoli* (%) a actinomicetos da turfa.

bela 4). Os identificados como At1, At4 e At12 não foram an tagônicos enquanto que At8, At10 e At11 somente formaram ha- lo inibitório com uma ou duas estirpes sendo considerados de antagonismo baixo (PATEL, 1974). Os isolados At3, At9 e At13 inibiram o crescimento de duas até quatro das estirpes, apre- sentando antagonismo moderado e finalmente At2, At5, At6 e At7, fortemente antagônicos, inibiram o crescimento de mais de 60% das estirpes (Figura 2).

Não foi estabelecida uma relação direta entre a origem do isolado de *Streptomyces* e seu grau de antagonis- mo, porém, os quatro classificados como fortemente antagôni- cos procedem coincidentemente de turfa seca, onde a competi- ção de outros grupos de microrganismos é quase nula e a pres- são de seleção poderia ter atuado em favor dos componentes mais agressivos capazes de sobreviver melhor em condições de estresse.

São encontradas citações na literatura a res- peito da variabilidade no comportamento da população de acti- nomicetos do solo e turfa frente ao *Rhizobium* (DAMIRGI E JOHNSON, 1966; PATEL, 1974; CHOWDHURY, 1977; KOSSLACK e BOH- LOOL, 1985; SAITO **et alii**, 1985) em meio agarizado, porém poucos têm conseguido reproduzir esses efeitos na sobrevivên- cia no solo, na turfa ou na nodulação do *Rhizobium* (KOSSLACK e BOHLOOL, 1985; FONSECA **et alii**, 1985).

TABELA 4. Efeito antagônico do *Streptomyces* da turfa no crescimento de *R. phaseoli*. Média de quatro repetições.

Isolados de actinomicetos	Zona de inibição (mm)						
	1135	1024	CIAT 255	C05	1144	1899	SEMIA 487
At1	-	-	-	-	-	-	-
At2	15	-	22	25	17	-	20
At3	-	-	11	14	23	-	-
At4	-	-	-	-	nt	-	-
At5	25	-	25	28	nt	-	19
At6	22	-	23	25	nt	-	18
At7	22	-	22	25	nt	-	18
At8	-	-	-	-	14	-	-
At9	12	-	15	13	14	-	-
At10	-	-	8	-	-	-	-
At11	-	-	12	18	-	-	-
At12	-	-	-	-	-	-	-
At13	-	-	-	18	15	-	-

nt = não testado.

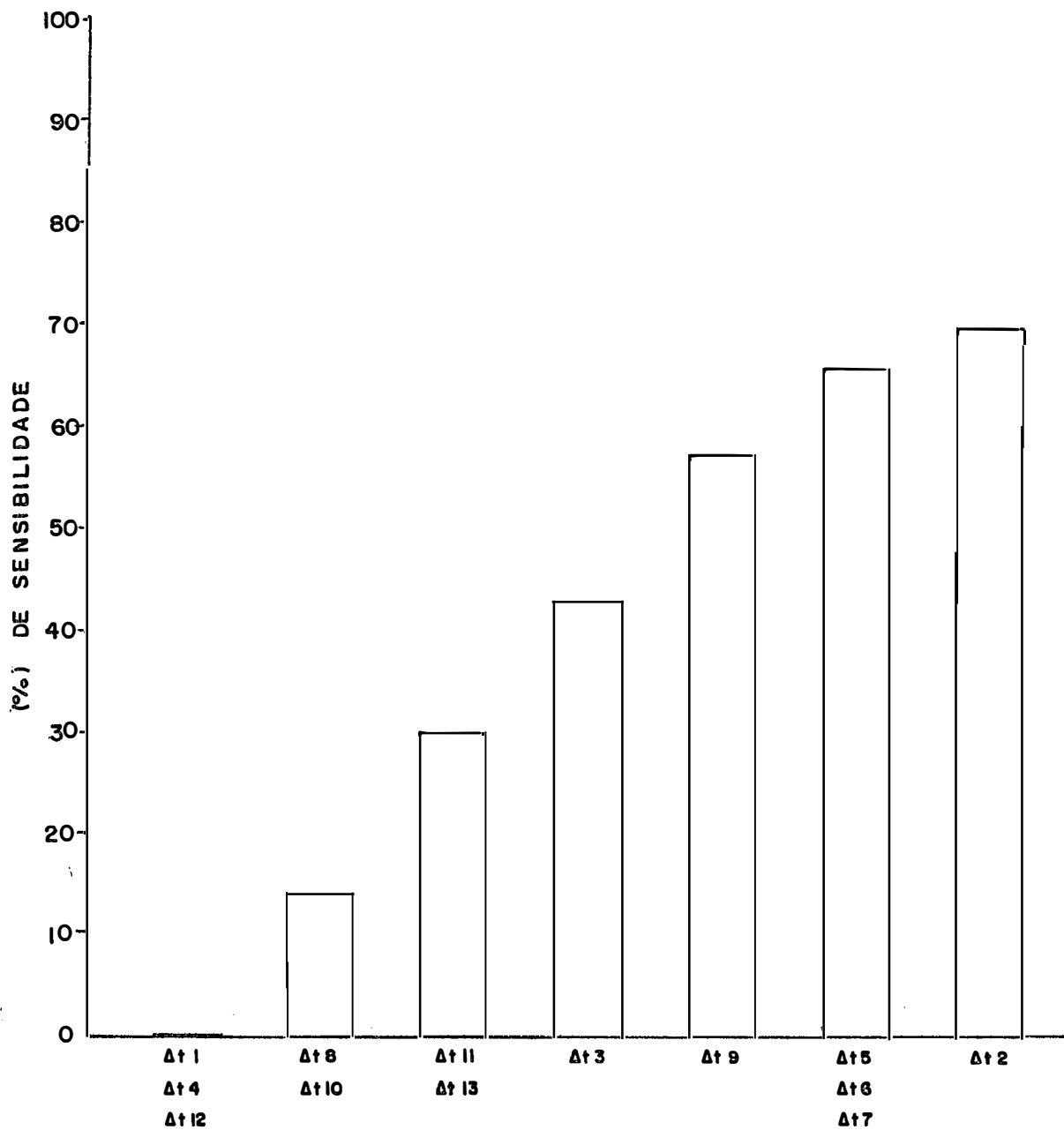


FIGURA 2. Potencia dos antibiõticos produzidos por *Streptomyces* da turfa.

Para os isolados não antagônicos, At1, At4 e At12 não se descarta a ocorrência de efeito favorável pela excreção de vitaminas ou fatores de crescimento que já têm sido aventada por outros autores (PATEL, 1974; ALEXANDER, 1977).

Quando testada a resistência natural das estirpes de *R. phaseoli* frente a concentrações crescentes de sulfato de estreptomicina no meio (item 3.9.1), as estirpes 1024 e 1899 cresceram até os máximos níveis considerados (1000 µg/ml) sendo que SEMIA 487 até 10 µg/ml, CIAT 255 cresceu até 4 µg/ml e finalmente C05, 1135 e 1144 somente cresceram a doses de até 2 µg/ml de estreptomicina.

A interpretação conjunta de todos estes resultados demonstrou concordância e permite concluir que existe variabilidade na resistência intrínseca a antibióticos apresentada pela população de *R. phaseoli* fato que confirma as observações de BEYNON e JOSEY (1980), CASSINI (1980) e VALARINI (1981). Foram citados níveis de resistência intrínseca a antibióticos (RIA), concretamente estreptomicina, variando de 1 até 10 µg/ml, com poucas estirpes apresentando resistência natural a mais de 20 µg/ml (CASSINI, 1980; VALARINI, 1981). Isto indicaria um padrão de comportamento "sensível" da espécie *R. phaseoli* frente a antibióticos.

Os resultados de resistência natural utilizam

do níveis crescentes de estreptomicina justificam as observações dos testes de antagonismo com *Streptomyces*, explicando porque as estirpes C05, CIAT 255 e 1144 apresentavam halos de inibição com a maioria dos isolados. A estirpe 1135 porém, embora sensível a níveis maiores de 2 µg/ml de estreptomicina somente formou halos em 38% dos casos. Falta informação complementar que explique este fato mas sabe-se que estreptomicina não seria o único antibiótico produzido pelos actinomicetos do gênero *Streptomyces* (DÖBEREINER et alii, 1981).

SCOTTI et alii (1981) reportaram para *B. japonicum* em solos de cerrado brasileiro, níveis de resistência natural a 20 µg/ml de estreptomicina na população nativa, sendo que a resistência aumentava para 150 µg/ml em função dos anos de cultivo e as práticas de calagem do solo (COELHO e DROZDOWICS, 1979). PITARD et alii (1982) analisando plantas de feijão em solo virgem, observaram resistência intrínseca a 80 µg/ml de estreptomicina (RIA) nas estirpes de *R. phaseolii* que formavam os nódulos, porém esta população representava apenas 6% da população nativa. Esta, tinha uma RIA de 5 µg/ml de estreptomicina.

Portanto, sob ponto de vista ecológico e para determinadas condições deve-se admitir que a resistência do *Rhizobium* ao antibiotismo presente no meio, seja solo, seja turfa, conferirá vantagens competitivas às estirpes que a

possuam (SCOTTI *et alii*, 1981; FONSECA e SAITO, 1982).

4.1.1. OBTENÇÃO DE ISOLADOS

Pequenas colônias com aparência de *Rhizobium* (VINCENT, 1970), foram observadas crescendo nos halos de inibição das estirpes C05, SEMIA 487 e CIAT 255 quando confrontadas aos *Streptomyces* fortemente antagônicos (At2, At5 e At6). Estas colonias eram circulares, brilhantes, incolores e quando transferidas para meio YMA cresceram abundantemente com produção de goma consistente. Ao microscópio apresentavam-se como bastonetes curtos, gram negativos.

Foram obtidos os seguintes isolados: C05 I e C05 II do halo que formou At6, e C05 III do halo de At5 respectivamente com a estirpe C05; SEMIA 487-1 e SEMIA 487-2 dos halos formados por At2 com a estirpe SEMIA 487; CIAT 255a, que cresceu na zona de inibição de At2, CIAT 255b no halo de At5 e CIAT 255c no halo formado entre At6 e a estirpe CIAT 255 respectivamente.

As chances de crescimento e recuperação posterior das colônias crescidas nos halos de inibição, foram muito baixas dentro de cada estirpe matriz o que poderia indicar a ocorrência de mudanças no genoma e portanto a necessidade de caracterizar as propriedades culturais e simbióticas

adquiridas ou perdidas pelos isolados que se recuperaram.

4.2. TESTES PARA COMPETIÇÃO SAPROFITICA

4.2.1. LIMITES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS

A Tabela 5 resume informação a respeito dos níveis de resistência apresentados por estirpes de *R. phaseo*li e isolados quando confrontados a cinco antibióticos: tetraciclina (Tcl), cloranfenicol (Clo), estreptomicina (Str), eritromicina (Eri) e canamicina (Kan). Os três isolados pertencentes à estirpe CIAT 255 não foram incluídos por apresentarem crescimento anômalo no meio YMB. Alguma mudança metabólica pode ter ocorrido já que não foram atingidos níveis de concentração celular considerados normais (10^9 cel/ml) aos 5 dias de crescimento em agitação a 28°C. Todas as demais culturas cresceram normalmente.

Foram observados níveis de resistência significativamente superiores para os isolados, com respeito às culturas matrizes, principalmente para cloranfenicol, estreptomicina e eritromicina, sendo menos evidente para tetraciclina. A resistência natural das estirpes matrizes à tetraciclina (20 a 50 µg/ml) superou valores medios relatados por CASSINI (1980) e VALARINI (1981), sendo concordantes para estreptomicina e eritromicina e inferiores para cloranfenicol.

TABELA 5. Níveis de resistência de estirpes e isolados de *R. phaseoli* frente a 5 antibióticos.

Estirpes	Antibióticos ($\mu\text{g/ml}$)				
	Tcl	Clo	Str	Eri	Kan
1899	50	1000	> 1000	50	2
C05	20	2	< 2	2	< 2
C05 I	50	500	> 1000	100	2
C05 II	50	1000	> 1000	100	5
C05 III	50	500	> 1000	100	2
SEMIA 487	20	10	10	2	10
SEMIA 487-2	50	100	> 1000	100	2

Tcl = tetraciclina; Clo = cloranfenicol; Str = estreptomicina; Eri = eritromicina; Kan = canamicina.

A estirpe SEMIA 487 considerada naturalmente resistente a cloranfenicol (100 µg/ml) por VALARINI (1981) e a canamicina (50 µg/ml) por PEREIRA (1983), não manifestou tal comportamento no presente trabalho. Este mesmo autor citou níveis superiores de resistência a estreptomicina para as estirpes C05 e SEMIA 487. As variações poderiam ser explicadas pela origem das estirpes, as formas de conservação e manutenção na coleção que poderiam promover mudanças nos caracteres culturais (ROUGHLEY, 1975; GIBSON *et alii*, 1976).

Elevados níveis de resistência a vários antibióticos foram observados nos isolados obtidos, principalmente no referente à estreptomicina, cloranfenicol e eritromicina (Tabela 5). DÖBEREINER *et alii* (1981) citam para isolados de *B. japonicum* e *R. sp* de solos da Amazônia, resistência adquirida à estreptomicina, tetraciclina, penicilina, cloranfenicol e gentamicina, porém com sensibilidade à canamicina. Isto estaria indicando a existência de uma população mista de actinomicetos no solo ou a produção de mais de um antibiótico por parte de um mesmo *Streptomyces*. No presente estudo, os isolados At2, At5 e At6 poderiam ter produzido mais de um antibiótico, como cloranfenicol, estreptomicina ou eritromicina, inibidores da síntese proteica. Da mesma forma que DÖBEREINER *et alii* (1981), não foi conseguida resistência à canamicina que pertence ao grupo dos inibidores de síntese da parede e membrana celular, modificando a permeabili-

dade.

Foi observada variabilidade nos níveis de resistência adquirida pelos diferentes isolados, SEMIA 487-2 apresentou resistência menor a cloranfenicol (300 µg/ml), sendo que o isolado C05 II e a estirpe mutante 1899 registraram em média, os níveis mais altos de resistência aos antibióticos testados.

Novos testes de antagonismo utilizando os isolados e as estirpes matrizes contra At2, At5, At6 e At7 confirmaram a resistência adquirida pelos isolados que cresceram na presença dos *Streptomyces* sem formar halos de inibição.

Observações realizadas da aparência cultural dos isolados crescendo nas placas permitiram apreciar mudanças na produção e consistência da goma tanto como na cor com respeito às estirpes matrizes. De um modo geral, os isolados e as estirpes 1899 apresentaram goma superconsistente e cor rosa pela absorção do vermelho Congo agregado ao meio. Nas culturas matrizes C05 e SEMIA 487, a produção de goma era intensa porém pouco consistente e se espalhava nas placas, sendo a cor das colônias branca. SINCLAIR e EAGLESHMAN (1984) em *Rhizobium sp* citaram correlação entre a resistência intrínseca a antibióticos (RIA) e tipo de colônias, destacando que colônias "umidas" com produção de exo e lipopolí

sacarídios conferem maior RIA porque não há absorção do antimetabólito. RODRIGUEZ (1984) contrariamente estabeleceu uma correlação entre colonias gomosas e grandes e insensibilidade aos antibióticos e que concordaria com as observações antes comentadas.

4.2.2. LIMITES DE RESISTÊNCIA A FUNGICIDAS

A resistência das estirpes e isolados frente a níveis crescentes de benomyl, thiram e captan no meio de cultura é apresentada na Tabela 6. Benomyl não provocou efeito inibitório em nenhuma das culturas, apresentando-se um nível de resistência intrínseca ao produto ativo maior a 300 µg/ml. A estirpe SEMIA 487 foi que apresentou o nível considerado mais baixo (300 µg/ml), sendo que todas as outras cresceram abundantemente com concentrações de 1000 µg/ml de benomyl no meio. PEREIRA (1983) para esta mesma espécie relatou níveis de resistência acima de 200 µg/ml, máxima dose testada. Similares resultados foram obtidos por HABTE (1985) e MALLICK e TESFAI (1985).

A resistência intrínseca a thiram esteve por volta de 10 a 30 µg/ml para as estirpes matrizes e o isolado SEMIA 487-2, similar aos obtidos por PEREIRA (1983). Os resultados de estudos com *R. phaseoli* para este fungicida são contraditórios. URBANA et alii (1982) citaram efeito favo-

rável à simbiose enquanto MALLICK e TESFAI (1985) e HABTE (1985), citam inibição total.

TABELA 6. Níveis de resistência de estirpes e isolados de *R. phaseoli* frente à três fungicidas.

Estirpes	Fungicidas ($\mu\text{g/ml}$)		
	Thiram	Captam	Benomyl
1899	200	200	> 1000
C05	30	10	1000
C05 I	200	200	> 1000
C05 II	200	200	> 1000
C05 III	200	200	> 1000
SEMIA 487	10	10	300
SEMIA 487-2	30	30	1000

Com referência ao captan, o comportamento foi similar ao thiram, com resistência intrínseca das estirpes matrizes entre 10 e 30 $\mu\text{g/ml}$, níveis que foram superiores aos relatados por PEREIRA (1983). Captan poderia ser bacteriostático ou bactericida em função das doses utilizadas na semente (MALLIK e TESFAI, 1985; HABTE, 1985).

Para os três fungicidas, a estirpe mutante 1899 e os isolados originados da estirpe C05 mostraram resistência a níveis significativamente superiores de thiram e captan no meio (200 µg/ml), não sendo observadas diferenças entre produtos.

Pouco se conhece sobre os mecanismos pelos quais tal resistência poderia ter sido adquirida porém é sugerido que o contato com antibióticos interferentes da síntese proteica (Str, Clo, Tc1) poderiam ter produzido mudanças que promoveram a incapacidade de absorver os fungicidas.

Quanto testada a aquisição de resistência cruzada a determinados antibióticos e fungicidas (Tabela 7) as estirpes matrizes, como era de se esperar, não cresceram em quaisquer das combinações estudadas. As elevadas concentrações utilizadas inibiram o crescimento do isolado SEMIA 487-2, o que poderia não ter acontecido com combinações a concentrações mais baixas dos produtos.

Os isolados C05 I, C05 II e C05 III e a estirpe mutante 1899 cresceram abundantemente em meios com estreptomicina (1000 µg/ml) e thiram (100 µg/ml) tanto como com estreptomicina (1000 µg/ml) e benomyl (1000 µg/ml). O isolado C05 II conseguiu crescer também em placas com 1000 µg/ml de cloranfenicol e 1000 µg/ml de benomyl e unicamente a estirpe 1899 mostrou crescimento nas placas com 1000 µg/ml de

estreptomicina, 1000 µg/ml de cloranfenicol e 1000 µg/ml de benomyl. Nenhum crescimento foi manifestado em placas com 1000 µg/ml de estreptomicina a 100 µg/ml de captan.

TABELA 7. Resistência cruzada a antibióticos e fungicidas de estirpes e isolados de *R. phaseoli*.

Estirpes	Antimicrobianos (µg/ml)				
	Str. 1000 + thiram 100	Str 1000 + benomyl 1000	Str 1000 + Clo 1000 + benomyl 1000	Clo 1000 + benomyl 1000	Str 1000 + captan 100
1899	+	+	+	+	-
C05	-	-	-	-	-
C05 I	+	+	-	-	-
C05 II	+	+	-	+	-
C05 III	+	+	-	-	-
SEMIA 487	-	-	-	-	-
SEMIA 487-2	-	-	-	-	-

Str: estreptomicina; Clo : cloranfenicol.

A resistência múltipla a antibióticos e fungicidas tem sido sugerida como importante característica a incluir nas estirpes dos inoculantes, que incrementaria sua competição saprofítica e sobrevivência (BROCKWELL, 1981). BUSHBY (1981a,b) observou baixa mortalidade no solo, de *Rhizobium sp* e *B. japonicum*, por mais de 50 dias e incrementos substanciais na rizosfera quando eram utilizadas estirpes resistentes a antibióticos e fungicidas. Similares resultados são reportados por RAMIREZ e ALEXANDER (1980), LENNOX e ALEXANDER (1981), HOSSAIN e ALEXANDER (1984) e JOEL e GIDDENS (1984) para *B. japonicum* e *R. phaseoli*. Estes autores atribuem efeitos diretos e indiretos através do controle exercido nos microrganismos antagonísticos principalmente protozoários, pelos produtos químicos agregados junto com o inóculo.

As marcas de resistência a antibióticos e fungicidas constituem aliás, uma poderosa ferramenta para estudos ecológicos no que se refere à identificação de estirpes (VIDOR, 1981). A partir dos resultados do presente trabalho se conclui que é possível utilizando os meios seletivos com diferentes combinações de antibióticos e fungicidas identificar estirpes e isolados entre si. Baseados nestes princípios vários estudos de competição e sobrevivência de estirpes de *Rhizobium* foram conduzidos (BUSHBY, 1981a, b; BROCKWELL, 1981; PEREIRA, 1983) devendo-se salientar a necessária condição implícita de que as marcas de resistência não impli

quem em mudanças nas propriedades simbióticas das culturas.

4.2.3. PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS

Nas condições deste experimento, não foi evidenciada atividade bacteriocinogênica natural ou induzida por raios U.V. nas 16 estirpes de *R. phaseoli* (Tabela 1) e os quatro isolados resistentes a antibióticos e fungicidas. Para esta mesma espécie existem poucas referências bibliográficas de autoinibição. CASSINI (1980) reportou uma baixa porcentagem de estirpes produtoras com largo espectro de atividade.

Alguns autores afirmam que a produção de bacteriocinas não ocorre sem a indução prévia com mitomicina C (HAWIRKO et alii, 1981) ou com ultravioleta (UV) (SCWINGHAMER, 1971; CASSINI, 1980; TICHY e LOTZ, 1981). Nas condições deste experimento a ação de 20, 40 e 80 segundos de luz ultravioleta não modificou as respostas.

TRINICK e PARKER (1982) fizeram referências à técnica desenvolvida por JOHNSON et alii (1959) de "streak method" como sendo mais eficiente para estudos de autoinibição que a técnica da macrocolônia. Ambas técnicas testadas no presente estudo, não apresentaram mudanças nas respostas.

Os resultados encontrados na literatura são

contraditórios na consideração do valor da atividade bacteriocinogênica como característica que aumenta a competição das estirpes (BERGERSEN *et alii*, 1971; SCHWINGHAMER e BROCKWELL, 1978; CASSINI, 1980; HODGSON *et alii*, 1985). e com referência a *R. phaseoli* esta área de estudo permanece ainda sem respostas promissoras.

Se destaca porém a inclusão deste tipo de teste quando se pretende preparar inoculantes polivalentes para evitar mudanças na proporção das estirpes no inóculo devidas à autoinibição.

4.2.4. TOLERÂNCIA A ACIDEZ E NÍVEIS TÓXICOS DE ALUMÍNIO E MANGANÊS

O crescimento das estirpes 1899, C05, Semia 487 e os isolados crescidos em meios com valores de pH de 4,3 tanto como com 2,7 ppm de alumínio ($AlCl_3$) ou 300 ppm de manganês ($MnSO_4 \cdot H_2O$) é referido na Tabela 8.

Os isolados C05 I, C05 II, C05 III e a estirpe 1899 apresentaram crescimento normal a valores de pH igual a 4,3, enquanto que para C05, SEMIA 487 e o isolado SEMIA 487-2 isto não foi observado.

Nenhuma das culturas estudadas conseguiu crescer nos meios com alumínio ou manganês.

TABELA 8. Crescimento das estirpes e isolados de *Rhizobium phaseoli* em meio ácido, com alumínio ou manganês.

Estirpes	pH = 4,3	Al ⁺³ 2,7 ppm	Mn ⁺² (300 ppm)
1899	+	-	-
C05	-	-	-
C05 I	+	-	-
C05 II	+	-	-
C05 III	+	-	-
SEMIA 487	-	-	-
SEMIA 487-2	-	-	-

+ : com crescimento

- : sem crescimento

Níveis mínimos de tolerância a acidez para *R. phaseoli* são referidos por VALARINI (1981) a valores de pH de 5,5 existindo variabilidade entre estirpes. CECCATTO (1985) reportou 84% de sensibilidade para as estirpes testadas em meio com valores de pH de 4,3.

VALARINI (1981) determinou os níveis de resistência das estirpes de *R. phaseoli* ao alumínio em 1,7 ppm e para manganês em 300 ppm existindo estirpes como a C05 que se mostrou sensível a níveis superiores a 150 ppm de

manganês. CECCATTO (1985) cita grande sensibilidade para 82% das estirpes testadas a estes níveis o que confirmaria resultados obtidos no presente estudo.

Este tipo de caracterização é recomendável de se fazer quando se deseja introduzir uma nova estirpe de *Rhizobium* em condições de solo ácido acompanhado ou não de níveis tóxicos de alumínio ou manganês (DATE, 1981). Sem pretender uma avaliação específica sugere-se a inclusão deste tipo de estudos nos testes de rotina de seleção de estirpes para a produção de inoculantes.

Existem evidências da relação entre características culturais das estirpes com seu comportamento frente a fatores de acidez do meio, existindo concordância em admitir que as colônias definidas como "secas" e pequenas, seriam mais sensíveis à acidez e alumínio que as gomosas. Alguns autores (CUNNINGHAM e MUNNS, 1984a, b; SINCLAIR e EAGLESHMAN, 1984), encontraram para *R. phaseoli* que as estirpes consideradas gomosas eram mais tolerantes à acidez sendo proposto que a cobertura gomosa seria uma estratégia para a sobrevivência. Além da quantidade de goma, interessaria sua composição que determinaria o grau de quelação do alumínio e manganês. Neste estudo não foram encontradas relações deste tipo. A estirpe C05, gomosa, foi sensível à acidez. Talvez seria importante a definição mais precisa dos termos "seca" e "gomosa". Observações similares foram feitas por SANTA BÁRBARA

(comunicação pessoal) e GEROSA (1985), que encontraram variantes da estirpe C05 de aspecto "seco" que foram capazes de crescer em meio a pH 4,3.

Não foram encontradas na literatura citada, referências de vantagens ecológicas da resistência a drogas na tolerância a condições de acidez. DANSO e ALEXANDER (1974), sugeriram pela primeira vez que os mutantes resistentes a estreptomicina adquiriram importantes atributos ecológicos de resistência a condições de estresse no solo com ênfase nos aspectos de tolerância à dessecação. A ocorrência destes fatos permanece ainda sem explicação.

4.3. EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DAS ESTIRPES E ISOLADOS DE *R. phaseoli*

O resultado da caracterização simbiótica das estirpes e isolados de *R. phaseoli* são apresentados nas Tabelas 9 e 10 para parâmetros da parte aérea e da nodulação, respectivamente.

Quanto à produção de matéria seca e N-total (Tabela 9) observou-se primeiramente que as estirpes matrizes C05 e SEMIA 487 apresentaram características de ineficiência e não diferiram significativamente do controle sem nitrogênio mineral. Uma possível explicação para estes fatos

TABELA 9. Eficiência simbiótica de estirpes e isolados de *R. phaseoli* inoculados em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) do cultivar Carioca-80 crescendo em vasos Leonard após 6 semanas. I Parâmetros de rendimento da planta (média de quatro repetições).

Estirpes	Parte aérea			Raiz	Eficiência relativa ^{1/}
	Matéria seca (g/planta)	N (%)	N-total (mg/planta)	Matéria seca (g/planta)	
1899	1,73b	3,78a	65,39b	0,21b	63,96
C05	0,47c	2,99a	14,05c	0,20b	13,74
C05 I	1,91b	3,42a	65,3 b	0,19b	63,90
C05 II	2,13ab	3,46a	73,69b	0,21b	72,10
C05 III	2,36ab	3,13a	73,87b	0,31ab	72,25
SEMIA 487	0,35c	2,94a	10,29c	0,22b	10,06
SEMIA 487-2	1,71b	3,41a	58,31b	0,19b	57,03
N (105 ppm)	2,84a	3,60a	102,24a	0,38a	100
T	0,29c	1,63b	4,73c	0,24ab	4,62
F (1%)	39,11**	10,73**	41,21**	5,42**	
DMS (Tukey 5%)	0,72	0,95	25,2	0,15	
CV (%)	19,8	12	20	23	

^{1/} Avaliada conforma a relação:

$$Ef_r = \frac{\text{Média N-total planta inoculada}}{\text{Média N-total planta C/N}} \times 100$$

TABELA 10. Eficiência simbiótica de estirpes e isolados de *R. phaseoli* inoculados em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) da variedade Carioca-80, crescendo em vasos Leonard após 6 semanas. II. Parâmetros de nodulação (média de quatro repetições).

Estirpes	Nodulação/planta ^{1/}			Atividade ^{2/} N ₂ ase (nmolesC ₂ H ₄ / mg nódulo. hora)	Eficiência ^{3/} nodular (mgN _{fix} /g nódulo)
	Número	Matéria seca (mg)	Tamanho (mg/nódu lo)		
1899	254a	120,3a	0,47	3,84	504,2
C05	70bc	23,2b	0,33	18,11	401,7
C05 I	228a	106,6a	0,47	6,33	568
C05 II	205a	93,9a	0,46	10,34	734,4
C05 III	344a	173,2a	0,50	6,48	399
SEMIA 487	46c	14,8b	0,32	4,69	375,7
SEMIA 487-2	189ab	99,5a	0,53	7,11	538,5
F (1%)	15,49**	17,08**			
DMS (Tukey 5%)	6,09	4,67			
CV (%)	16	18,4			

^{1/} Dados analisados segundo $\sqrt{x + 0,5}$

^{2/} Dados baseados na atividade média de 40 nódulos individuais.

^{3/} Avaliada conforme a relação:

$$E_{\text{nodular}} = \frac{\text{mg N fixado} - \text{mg N testemunha}}{\text{matéria seca nódulos (g)}}$$

seria a perda de eficiência simbiótica, produto da instabilidade genética destas culturas, já que em experimentos anteriores, estas estirpes (CASSINI, 1980; HUNGRIA, 1981; PEREIRA, 1983; HUNGRIA e NEVES, 1986) revelaram boa capacidade de fixação de nitrogênio. Similares fatos têm sido observados em *R. trifolii* (GIBSON et alii, 1976), *R. meliloti* (BARALBAR et alii, 1982). GEROSA (1985) e SANTA BARBARA (1985) (comunicação pessoal) detectaram a presença de variantes culturais nas estirpes C05 e SEMIA-487 de *R. phaseoli*, algumas acompanhadas de perdas de infectividade e eficiência simbiótica.

Contrariamente, foi observado um incremento significativo nos valores de matéria seca e de N total para todos os isolados. Particularmente C05 II e C05 III não diferiram significativamente da testemunha recebendo 105 ppm de nitrogênio (NH_4NO_3), na produção de matéria seca. A estirpe 1899 e os isolados SEMIA 487-2 e C05 I apresentaram comportamento intermediário. Isto fica melhor evidenciado através da eficiência relativa onde as plantas inoculadas com C05 II e C05 III representavam 72% das testemunhas sem limitações de nitrogênio, medida em termos de N total nas plantas.

PEREIRA (1983) obteve um isolado da estirpe SEMIA 487 resistente a estreptomicina (5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e thiram (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) que se destacava pelos altos rendimentos na matê-

ria seca e os teores mais altos de N-total no tecido, porém os isolados de C05 resistentes a 1000 µg/ml de estreptomicina, apresentaram rendimento médio, sem destaque.

É sugerido a partir de dados encontrados na literatura que a resistência a inibidores da síntese proteica como cloranfenicol, estreptomicina e eritromicina não estaria associada a perda de eficiência (LEVIN e MONTGOMERY, 1974; PANKHURST, 1977). Porém CASSINI (1980) e VALARINI (1981), citam redução na infectividade tanto como na eficiência nos mutantes de *R. phaseoli* resistentes a 250 µg/ml de estreptomicina e/ou espectinomicina. PEREIRA (1983) isolou mutantes resistentes a antibióticos e fungicidas que apresentaram comportamento diferencial nas propriedades simbióticas. BUSHBY (1981a,b) não encontrou diferenças na eficiência em mutantes resistentes a antibióticos e fungicidas com respeito às estirpes parentais.

Altas correlações foram encontradas para os parâmetros de N-total e produção de matéria seca da parte aérea aos 35 dias após inoculação ($r = 0,99$), confirmando resultados obtidos para feijão - *R. phaseoli* por outros pesquisadores (SAITO e RUSCHEL, 1980; HUNGRIA, 1981; SAITO, 1982; PEREIRA, 1983; HUNGRIA, 1985; HUNGRIA et alii, 1985 a,b; HUNGRIA e NEVES, 1986).

Quanto à nodulação (Tabela 10) as tendências

são similares às observadas para parâmetros de rendimento no sentido que confirmam a superioridade dos isolados e a estirpe 1899 frente às estirpes SEMIA 487 e C05 que não nodularam bem tanto em número como em peso.

O isolado SEMIA 487-2 apresentou uma tendência de produção de menor número de nódulos compensado por um tamanho unitário maior.

A eficiência nodular que indica o custo de produção de massa nodular permite sugerir a superioridade do isolado C05 II em mais de 30% sobre a estirpe 1899. Isto indicaria que para a mesma massa nodular foi mais eficiente na mobilização e translocação do N_2 fixado.

Tanto número como peso de nódulos apresentaram correlação significativa com o N total da parte aérea ($r = 0,95$). Estes resultados não concordam com os reportados por SAITO et alii (1978), HUNGRIA (1981), HUNGRIA e NEVES (1986). Vários autores (DÖBEREINER et alii, 1970; SAITO, 1982; PEREIRA, 1983) estabelecem que nem sempre o peso de nódulos é bom indicador da eficiência de uma estirpe e que muitas estirpes, embora exibindo nodulação exuberante não transportaram eficientemente o nitrogênio à parte aérea (NEVES, 1986). Relações estabelecidas entre as estirpes originais e seus isolados nos parâmetros simbióticos de interesse permitiram apreciar uma superioridade de 3 até 5 vezes do

isolado C05 II sobre a estirpe C05 e do isolado SEMIA 487-2 sobre SEMIA 487.

Os quarenta nódulos (10 por vaso) de cada tratamento isolados nos meios seletivos com antibióticos e fungicidas adequados a sua identificação cresceram nas condições estabelecidas indicando a permanência e estabilidade das características selecionadas.

Não foi avaliada a atividade da nitrogenase pela redução de acetileno do sistema radicular completo, porém foram extraídos 40 nódulos para a determinação de sua atividade individual (absoluta ou específica) e em função da informação obtida foi elaborada a Tabela 11 onde são apresentados os dados calculados para as estirpes e isolados. O valor desta informação é parcial porém permite extrair conclusões preliminares de valor comparativo. A estirpe C05 apresenta atividade nodular relativamente alta se comparada com as outras estirpes porém apresentou poucos nódulos (Tabela 10), portanto, no total sua contribuição foi baixa e tardia. WILLIAMS (1981) isolou mutantes de *Rhizobium sp* do caupi que apresentavam atividade de nitrogenase específica similar à cultura original, porém os mutantes produziram 58% mais nódulos e mais cedo o que apoiaria as sugestões aqui apresentadas.

TABELA 11. Atividade da nitrogenase absoluta e específica das estirpes e isolados de *R. phaseoli* aos 35 dias após inoculação.

Estirpes	Atividade da nitrogenase (ARA)	
	Absoluta (nmoles C_2H_4 /nódu 10.hora)	Relativa (nmoles C_2H_4 /mg de matéria fresca nódu 10.hora)
1899 ^{1/}	42,21	3,84
C05	54,75	18,11
C05 I	42,12	6,33
C05 II	119,60	10,34
C05 III	69,17	6,48
SEMIA 487	36,72	4,69
SEMIA 487-2	113,36	7,11

^{1/} Os dados foram calculados na base de 40 nódulos por tratamento.

Destacou-se o isolado C05 II pela sua maior atividade nodular tanto absoluta como relativa, seguida da SEMIA 487-2 o que indicaria que ainda em plena floração os nódulos permanecem ativos. A estirpe 1899 contrariamente mostrou baixa atividade da nitrogenase por unidade de nódulo ou de massa nodular. Os valores de rendimento da

parte aérea para esta estirpe indicam boa capacidade fixadora, porém a atividade nodular é baixa na floração momento a partir do qual as exigências da planta são incrementadas (HUNGRIA et alii, 1985b). Este aspecto deverá ser estudado para confirmar a contribuição das estirpes até o final do ciclo da cultura (NEVES, 1986).

Não houve correlação entre os parâmetros de rendimento (N total) e a atividade nodular (nmoles C_2H_4 nódulo.hora) confirmando resultados de WILLIAMS (1981).

PERES et alii (1984) analisando a contribuição individual de cada nódulo à economia de nitrogênio da planta mediram ARA específica por nódulo e concluíram que para determinadas estirpes, este não seria um bom parâmetro de eficiência. A evolução de H_2 pelos nódulos (SCHUBERT e EVANS, 1977) mascarada pelo acetileno, poderia ser responsável por uma seleção errada de nódulos que aparentemente muito ativos não expressaram fixação de nitrogênio em níveis superiores.

4.3.1. PADRÃO DE NODULAÇÃO: ATIVIDADE E TAMANHO

As Figuras 3, 4 e 5 apresentam as tendências de comportamento agrupadas em classes de frequência para os parâmetros de atividade específica da nitrogenase (nmoles

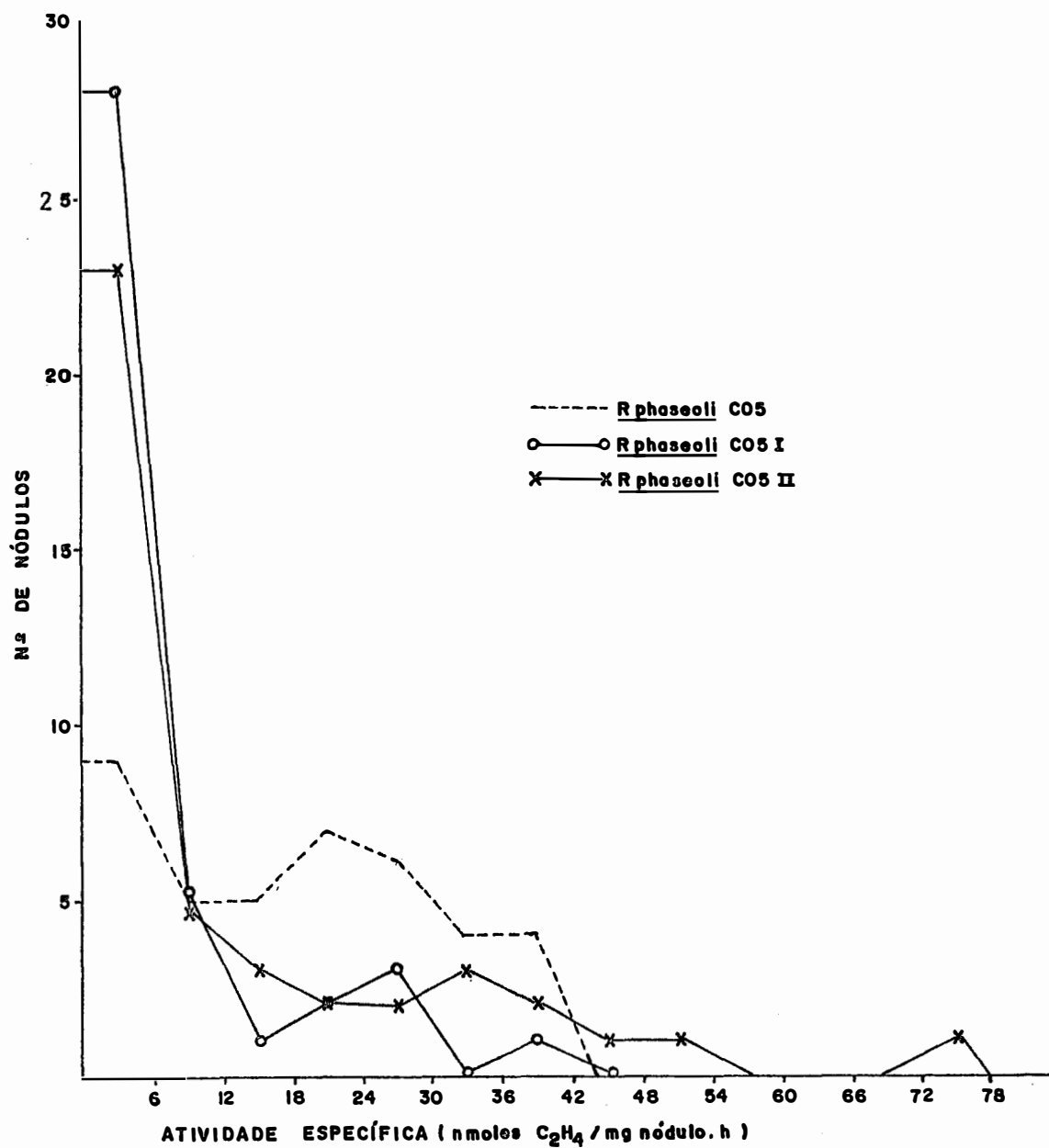


FIGURA 3. Padrão de atividade nodular (nmol C₂H₄/mg nodulos) da estirpe C05 e isolados C05 I e C05 II aos 35 dias após inoculação.

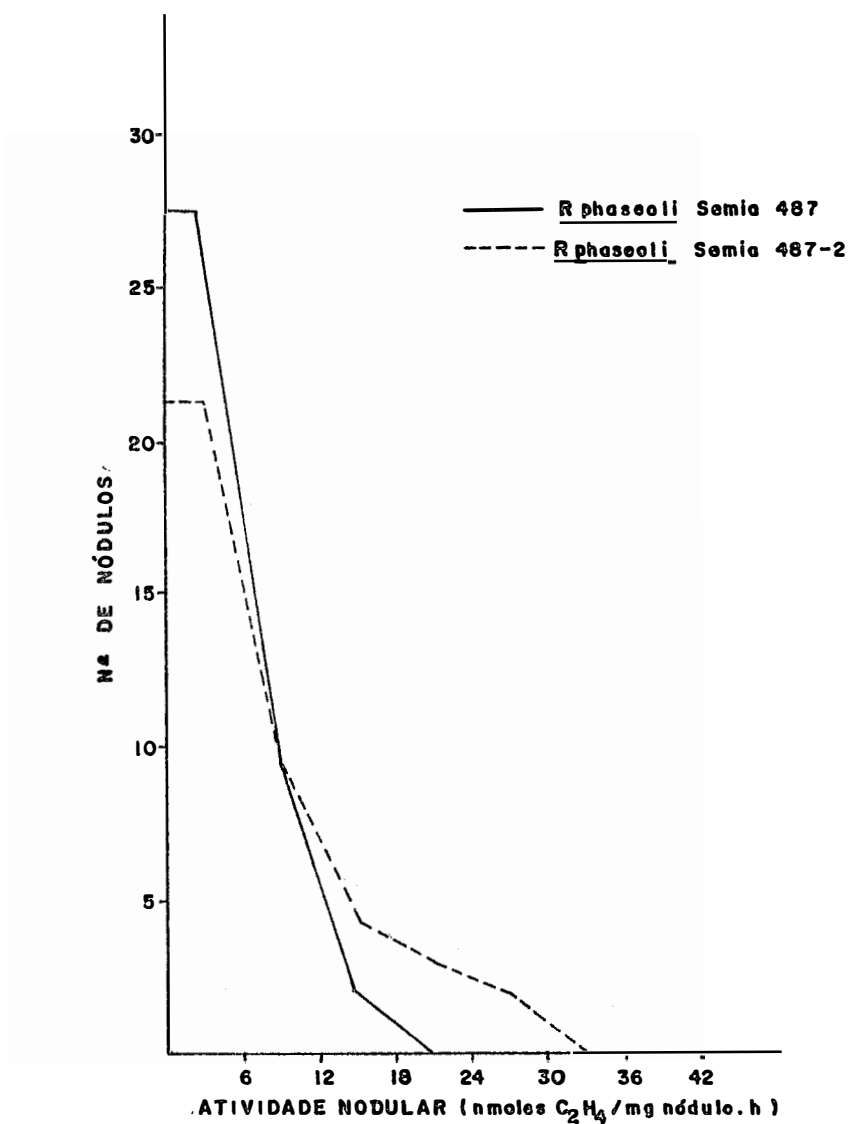


FIGURA 4. Padrão de atividade nodular da estirpe SEMIA 487 e do isolado SEMIA 487-2.

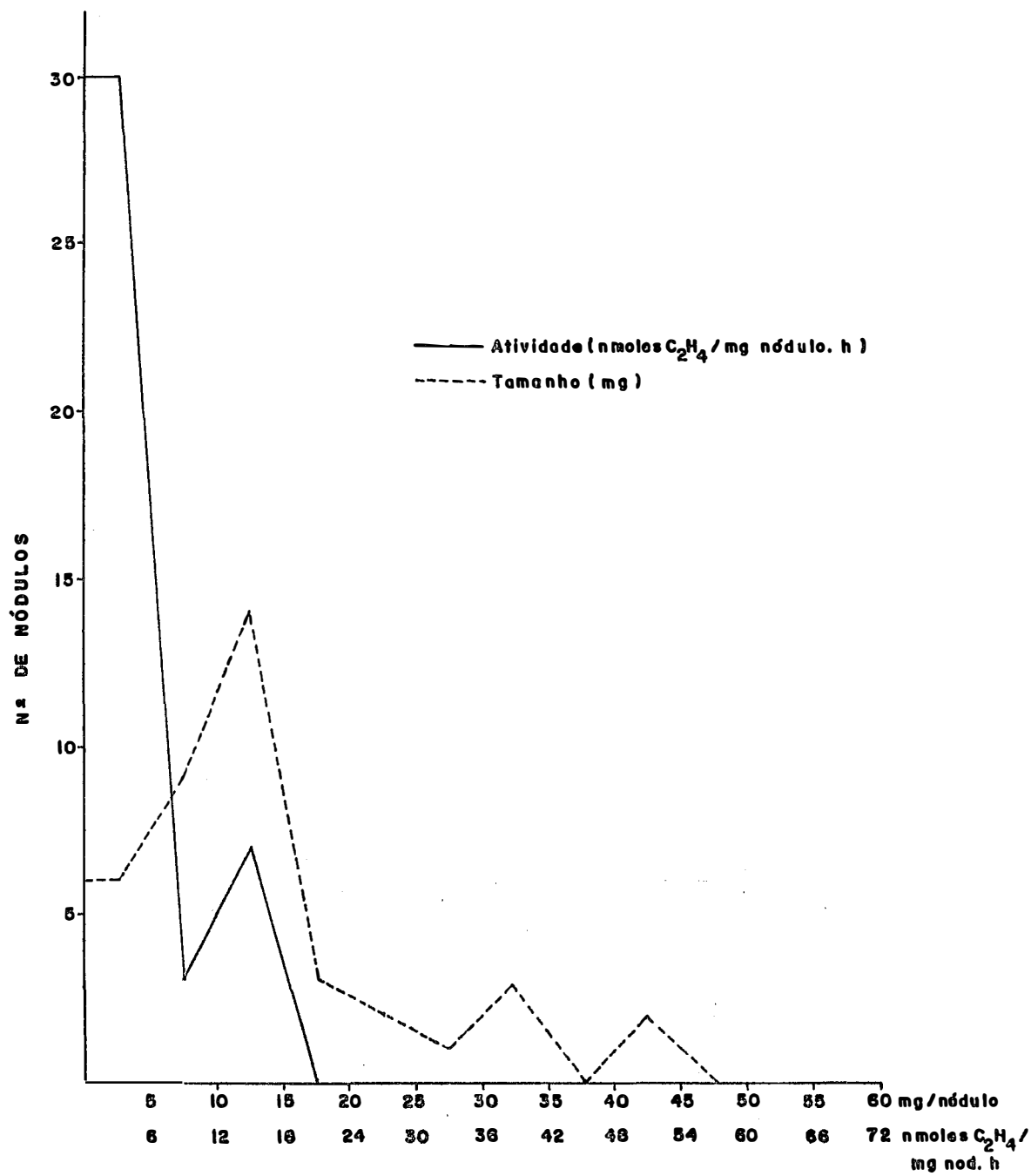


FIGURA 5. Padrão de nodulação da estirpe 1899.

C_2H_4 /mg de nódulo.hora) para as estirpes C05 e os isolados C05 I e C05 II, a estirpe SEMIA 487 e o isolado SEMIA 487-2 e a estirpe 1899, respectivamente. De um modo geral, o padrão de comportamento indicou a predominância de muitos nódulos com baixa atividade, o que se reflete numa curva assintótica deslocada visivelmente à esquerda. 70 a 80% dos nódulos apresentaram atividade nodular individual menor a 12 nmoles C_2H_4 /mg nódulo.hora com extremos representados pelo isolado C05 II (70%) e a estirpe 1899 (83%) (Figura 6). Uma exceção foi dada pela estirpe C05, que como foi dito anteriormente, nodulou pouco e tardiamente (item 4.3). Esta estirpe apresentou uma distribuição atípica, com maior número de representantes nas classes de maior atividade (65%), porém em termos de contribuição total à planta isto nada significou. A estirpe SEMIA 487 e o isolado SEMIA 487-2 apresentaram comportamento similar, porém o isolado teria uma distribuição mais favorável para classes de maior atividade, o que foi significativamente evidenciado nos parâmetros de rendimento da parte aérea (item 4.3) (Figura 4).

Quando comparadas as estirpes que apresentaram melhor performance simbiótica (Figura 6), observou-se uma maior concentração de nódulos em classes de menor atividade para a estirpe 1899 seguida pelo isolado SEMIA 487-2. Estes nódulos com baixa atividade eram grandes, com aparência de efetivos, o que poderia estar indicando um ciclo de ativi

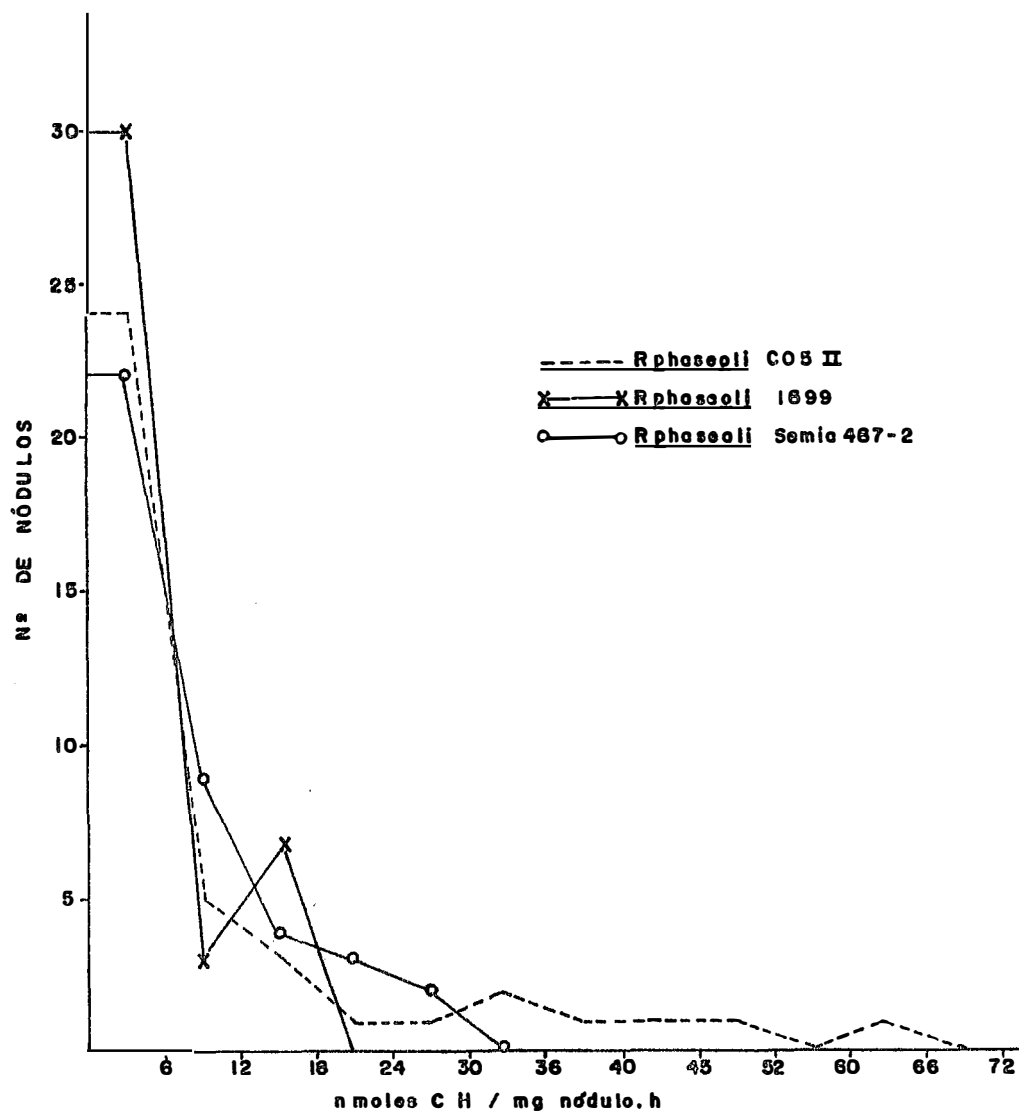


FIGURA 6. Padrão comparativo de atividade nodular de estirpes ou isolados de *R. phaseoli* com performance simbiótica efetiva aos 35 dias após inoculação.

dade nodular precoce para ambas estirpes que se encerrou na floração, ocasião na qual foi feita a amostragem.

O isolado C05 II apresentou uma distribuição das classes de frequência diferente, com 30% de seus nódulos com atividade maior a 12 nmoles de C_2H_4 /mg nódulo.hora, e dentro desta, 40% de nódulos com valores acima de 30 nmoles de C_2H_4 /mg nódulo.hora (Figura 6).

Não existem antecedentes neste tipo de estudos para *R. phaseoli*. PERES **et alii** (1984) em *B. japonicum* encontraram uma distribuição normal para umas estirpes e assimétricas para outras. Os resultados aqui expostos permitiriam sugerir que a atividade nodular em *R. phaseoli* seria responsabilidade de um alto número de nódulos com baixa atividade nodular. Alguns autores (SAITO, 1982; PEREIRA, 1983) têm encontrado para feijão, baixa correlação entre o peso dos nódulos e o N-total ou alto peso de nódulos associado a baixa atividade da nitrogenase no sistema radicular, indicando que tanto peso de nódulos como atividade da nitrogenase não seriam parâmetros conclusivos para avaliar eficiência.

As Figuras 7 e 8 refletem a distribuição dos nódulos por classes de tamanho (mg/nódulo). As estirpes consideradas ineficientes (item 4.3), a C05 e SEMIA 487 apresentaram uma curva deslocada à esquerda, o que significa um maior número de nódulos de pequeno tamanho. Isto poderia se

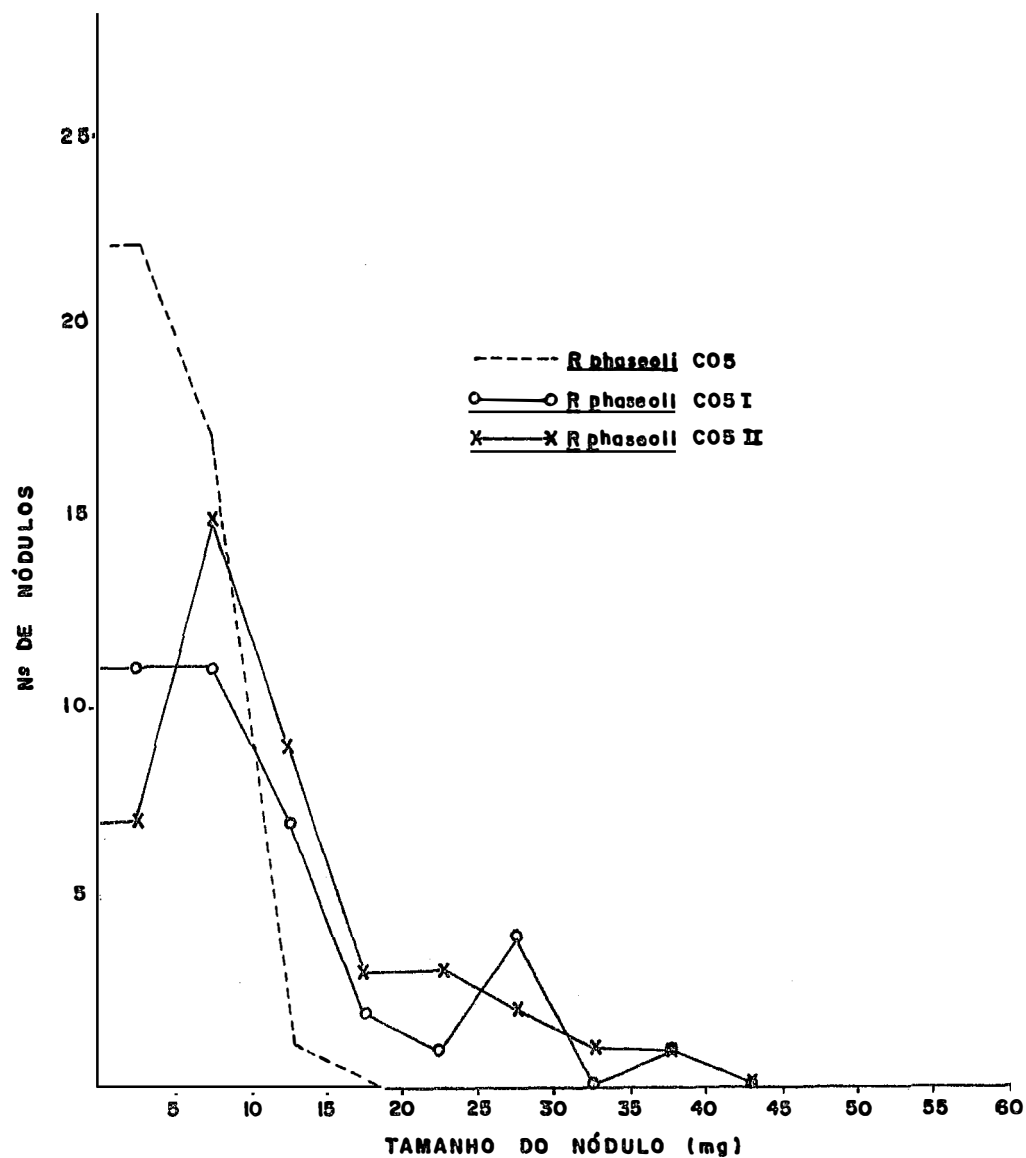


FIGURA 7. Padrão de tamanho nodular (mg matéria fresca/nódu-
lo) da estirpe C05 e isolados C05 I e C05 II aos
35 dias após inoculação.

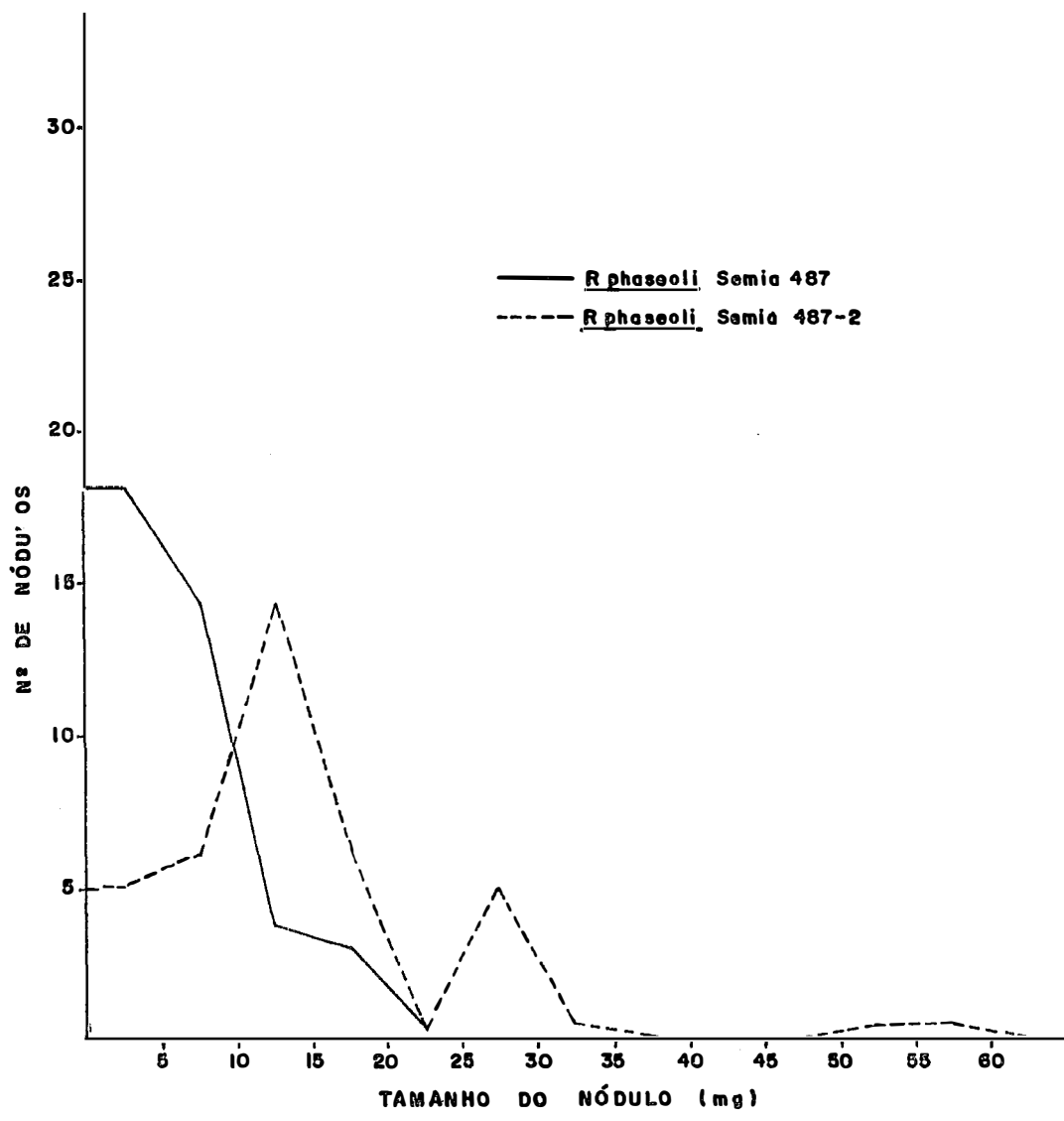


FIGURA 8. Padrão de tamanho nodular da estirpe SEMIA 487 e do isolado SEMIA 487-2

relacionar para a estirpe C05 com uma nodulação tardia. Segundo NUTMAN (1981) existe uma relação inversa entre o número de nódulos e a média de tamanho por planta. Para este autor, o que interessa seria o volume de nódulos que a planta assegura, independente do número e das circunstâncias ocorridas durante o processo de infecção. Porém, como será visto mais adiante, existe um potencial autoregulador da simbiose regido pelo padrão de nodulação.

Os isolados C05 II, SEMIA 487-2 e a estirpe 1899 (Figura 9) apresentaram mais de 80% dos seus nódulos com tamanho maior a 5 mg, sendo que para as duas últimas, as classes predominantes estariam entre 10 e 15 mg/nódulo. Para 1899, 73% dos nódulos maiores a 5 mg são também maiores a 10 mg, e para SEMIA 487-2, 80% dos nódulos maiores a 5 mg foram maiores a 10 mg. No caso de C05 II, somente 55% dos nódulos maiores a 5 mg eram também maiores a 10 mg. Portanto, para as condições de relações simbióticas eficientes, o padrão de nodulação estaria determinado por nodulação abundante de atividade menor a 12 nmoles de C_2H_4 /mg de nódulo.hora e nódulos de tamanho maior a 5 mg de matéria verde.

A presença de nódulos grandes e pouco ativos, poderia ser indicativa de nodulação precoce, parâmetro sugerido por vários autores como índice de competitividade das estirpes pelos sítios de infecção nodular (LABANDERA e VINCENT, 1975; FRANCO e VINCENT, 1976). Estes predominaram nas

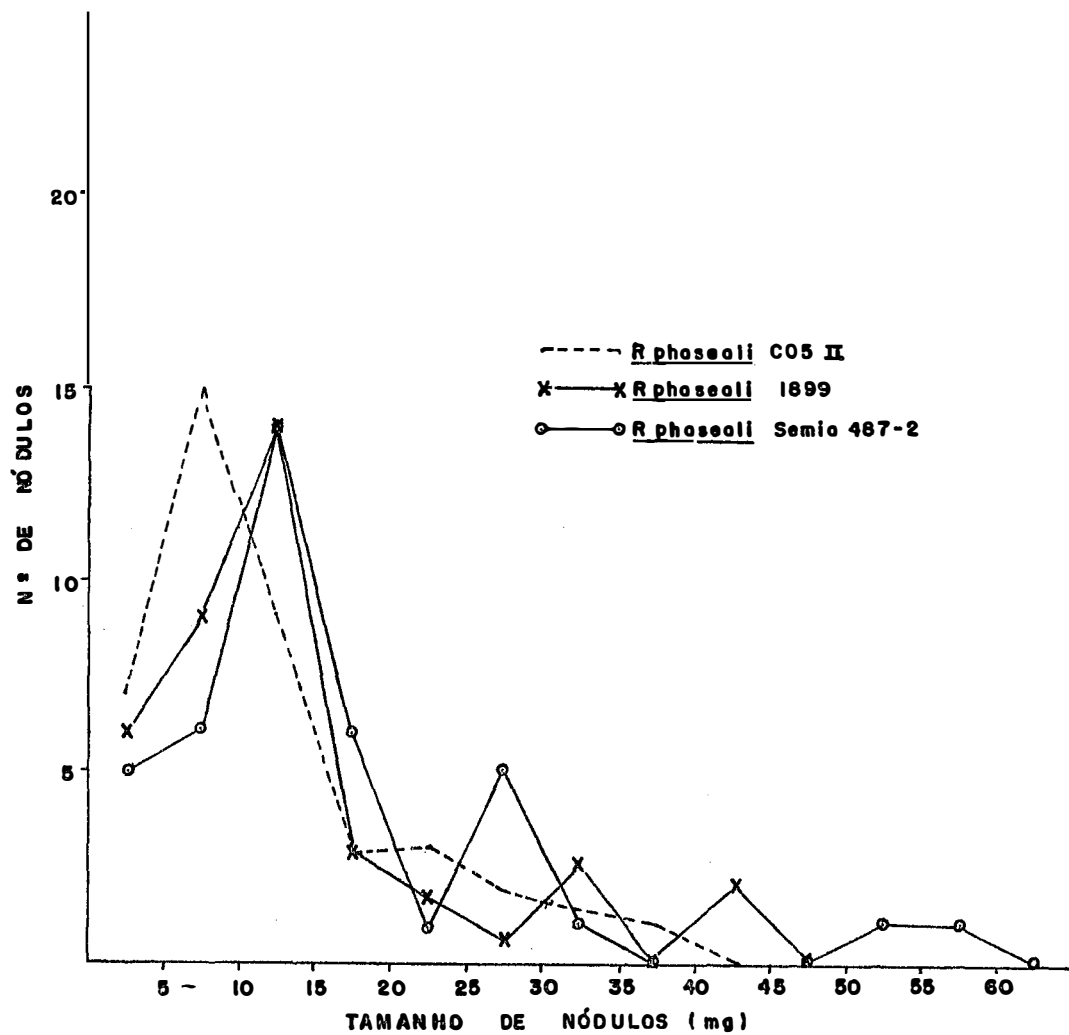


FIGURA 9. Padrão comparativo de tamanho nodular de estirpes ou isolados de *R. phaseoli* com comportamento efetivo aos 35 dias.

simbiosis com SEMIA 487-2, 1899 e C05 III. O isolado C05 II apresentou uma distribuição mais equilibrada das classes de tamanho, com nódulos menores porém pertencendo a classes mais ativas.

Várias seriam as implicações ecológicas que se estabelecem a partir das observações do padrão de comportamento nodular. O rápido estabelecimento de uma simbiose efetiva está em função da velocidade de nodulação e início de atividade dos nódulos. Existe variabilidade de comportamento entre estirpes como foi evidenciado por ANTONIW e SPRENT (1978) e VOSS *et alii* (1983) para *Phaseolus vulgaris*, que demonstraram que com poucos dias de antecipação, poder-se-ia conseguir incrementos no N total fixado (TRUJILLO e FREIRE, 1986). A estirpe 1899, os isolados de C05 e SEMIA 487-2 conseguiram nodular precocemente e fixar adequados níveis de nitrogênio atmosférico. A velocidade de formação dos nódulos de uma determinada estirpe bloquearia aliás a infecção de outras, segundo foi demonstrado por LABANDERA e VINCENT (1975), FRANCO e VINCENT (1976), o que seria uma vantagem adicional. NUTMAN (1981) estabeleceu a partir de experimentos fisiológicos, que este efeito inibitório das futuras infecções estaria associado a um padrão de nodulação que apresente tamanho nodular grande, poucos nódulos e espaçados no sistema radicular. Portanto, a nodulação abundante e de pequeno tamanho como a que define o sistema feijão - *R. phaseoli* não possuiria este componente autoregulador.

No presente experimento, a estirpe C05 II apresentou uma vantagem na distribuição de atividade nodular sobre as estirpes restantes, o que pode levantar-se como hipótese para uma maior persistência nodular.

4.3.2. EVOLUÇÃO DO PADRÃO DE NODULAÇÃO DO ISOLADO C05 II

Foi estudada a evolução dos padrões de atividade e tamanho nodular da estirpe C05 II aos 20, 26, 35, 44, 55 e 65 dias após inoculação. Não foi determinado explicitamente o início da nodulação porém aos 20 dias (1ª amostragem) as indicações foram de que estava se iniciando. ANTONIW e SPRENT (1977) assinalam em 17 dias o aparecimento de nódulos visíveis em feijoeiro. Entretanto, Baird (1981) citado por TRUJILLO e FREIRE (1986), determinaram somente após 21 dias.

A Figura 10 representa a distribuição das classes de atividade e de tamanho nodular média das seis datas de amostragem, onde ficou comprovada a tendência assintótica observada nos experimentos anteriores. Na Figura 11, representa-se a evolução da atividade nodular, sendo observada uma predominância de nódulos com atividade menor a 8 nmoles de C_2H_4 /mg nódulo.hora. Nas amostragens realizadas aos 35 dias e 44 dias foi constatado um aumento na representatividade de classes maiores a 8 nmoles e a 28 nmoles de C_2H_4 /

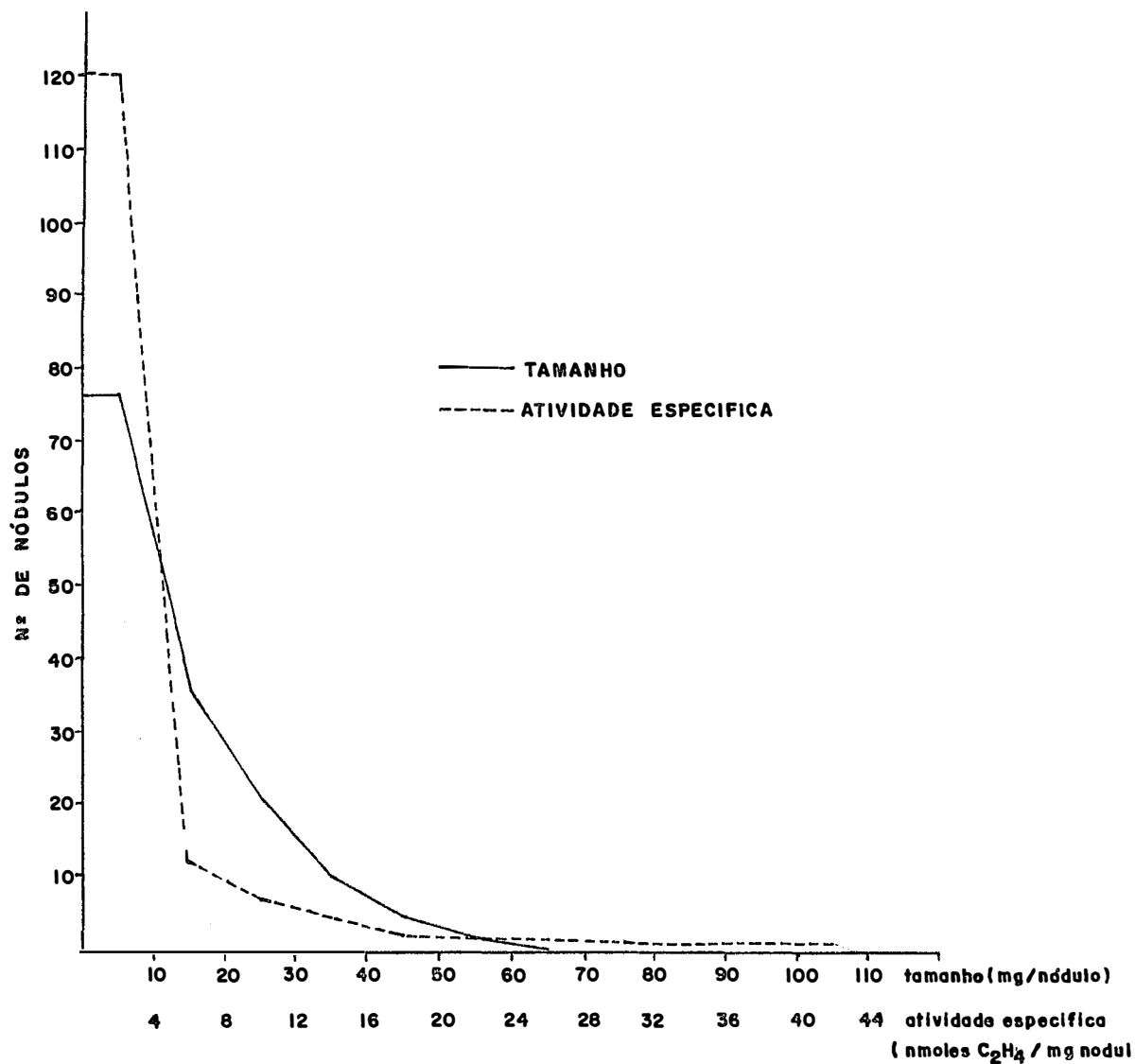


FIGURA 10. Padrão de nodulação de *R. phaseoli* CO5 II em feijão da variedade Carioca-80. Média das 6 datas de amostragem.

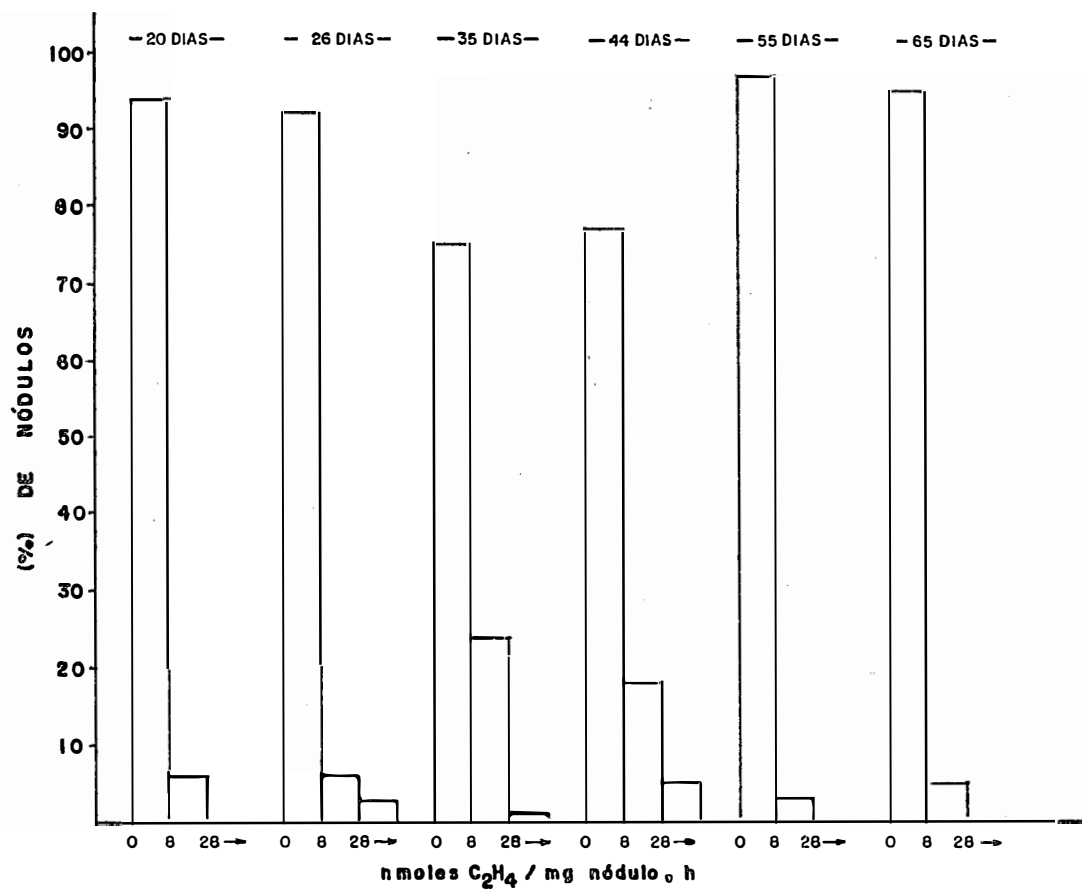


FIGURA 11. Distribuição (%) das classes de atividade nodular para *R. phaseoli* C05 II em 6 datas de amostragem após inoculação.

mg nódulo.hora com uma queda de 90% para 75% na frequência das classes de atividade menor a 8 nmoles. Nos períodos seguintes, tornou-se ao padrão de comportamento primeiramente definido, porém, interessa destacar que ainda aos 65 dias, existem 15% de nódulos com atividade maior a 8 nmoles C_2H_4 /mg nodulo.hora.

Quando analisados os componentes da classe mais frequente (Figura 12) observou-se predominância de nódulos com 0 a 4 nmoles de C_2H_4 /mg nod.h, sendo esta classe a que apresentou a queda observada aos 35 e 44 dias.

A análise dos dados de tamanho dos nódulos (Figura 13) permite apreciar um comportamento dual. Nas primeiras quatro amostragem, a tendência assintótica expressa concordância com informações prévias do padrão geral de distribuição observando-se um deslocamento à direita e diminuição correspondente dos números de nódulos considerados pequenos (0 a 10 mg de matéria fresca). Isto seria explicado pela formação de tecido nodular que a planta precisa garantir para um adequado funcionamento da simbiose nas etapas iniciais de fixação (NUTMAN, 1981). A partir dos 44 dias após inoculação e nas seguintes amostragens (55 e 65 dias), a distribuição das classes de tamanho nodular adquire características de normalidade com valores centrais de 25 a 30 mg de matéria fresca/nódulo. A Figura 14 visualiza em detalhe estas mudanças. A classe menor a 10 mg/nódulo sofre queda drás

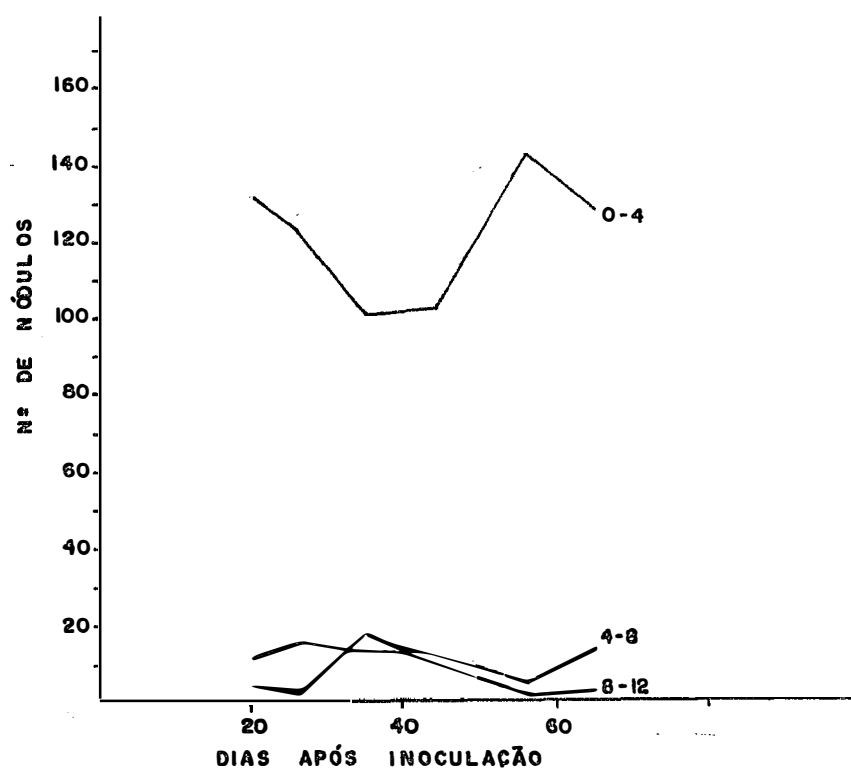


FIGURA 12. Evolução das classes de atividade específica de nódulos (nmoles C_2H_4 reduzido/mg nódulo.hora) de *R. phaseoli* C05.11 em feijão cv. Carioca-80.

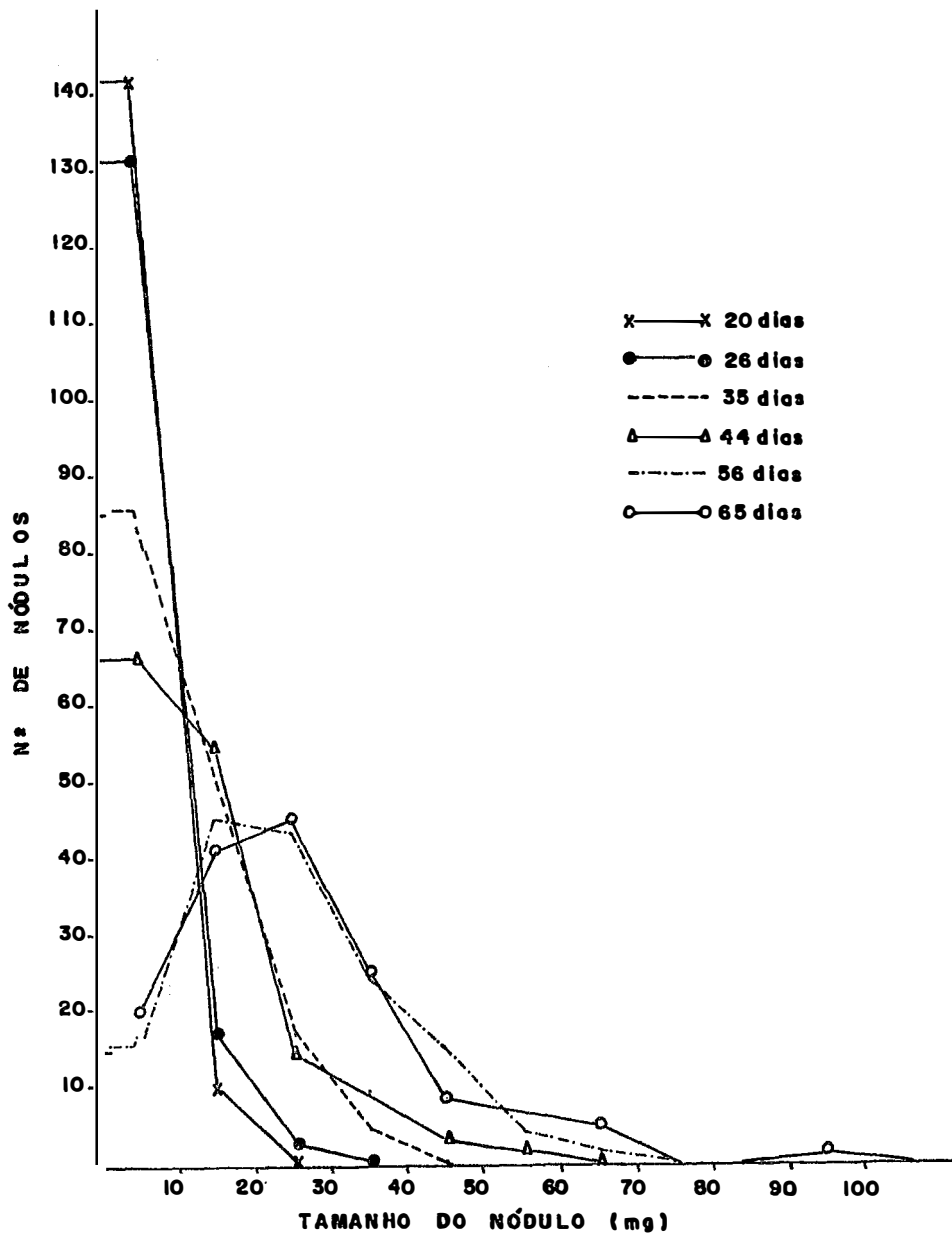


FIGURA 13. Evolução do tamanho dos nódulos (mg) de *R. phaseoli* C05 II em feijão cv. Carioca-80 em 6 datas de amostragem após inoculação.

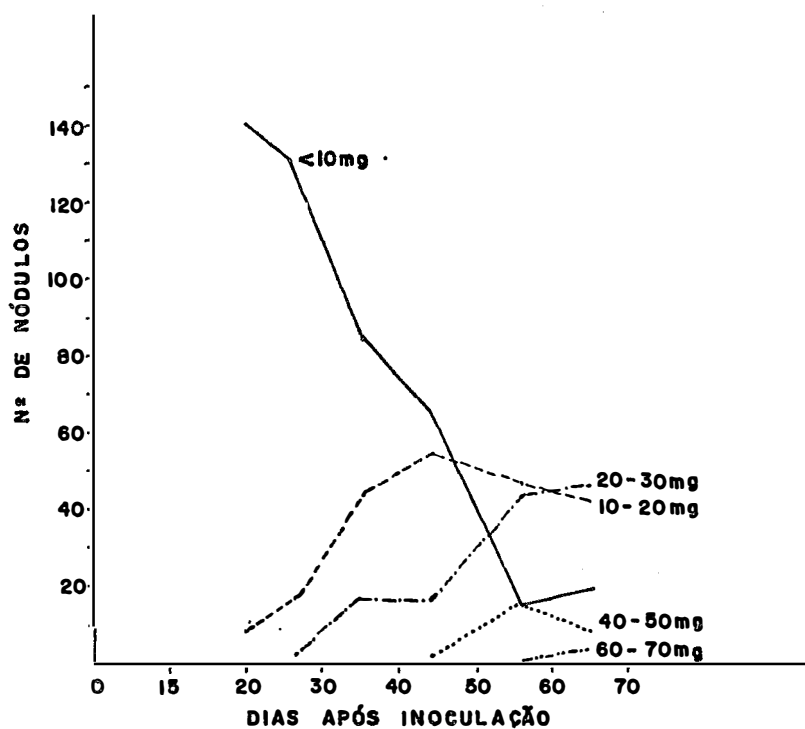


FIGURA 14. Evolução das categorias de tamanho nodular (mg) em 6 datas de amostragens para *R. phaseoli* C05 II em feijão da cultivar Carioca-80.

tica sendo substituída em forma gradual pelas que correspondem a nódulos de tamanho maior. Para cada data de amostragem, nas sucessivas épocas, uma nova classe, de tamanho maior aparece (20-30; 40-50; 60-70 mg/nódulo) com frequências baixas porém crescentes.

Quando confrontados os valores médios unitários de tamanho e atividade nodular foi observada uma evolução crescente nos valores até os 40 dias em que continuou aumentando a massa nodular, enquanto que a atividade específica (nmoles C_2H_4 /mg.hora) caiu (Figura 15). HUNGRIA *et alii* (1985b) observaram que a atividade específica da nitrogenase do sistema radicular de feijão continuava incrementando até o período de formação e enchimento dos grãos. Os dados de atividade nodular individual indicam um pico correspondente a época de formação das vagens, porém é importante salientar que este parâmetro não necessariamente refletiria a contribuição total da fixação à planta.

A evolução da matéria seca das plantas nos períodos de amostragem, apresentou crescimento linear nas primeiras quatro amostragens ($r = 0,99$) e comportamento tipo sigmoide para todo o período estudado (Figura 16). Similares resultados são relatados por HUNGRIA (1981) para diferentes combinações estirpe-cultivar de feijão. Após 40 dias em que começou a formação das vagens, incrementaram-se significativamente as taxas de produção de matéria seca por planta. HUN

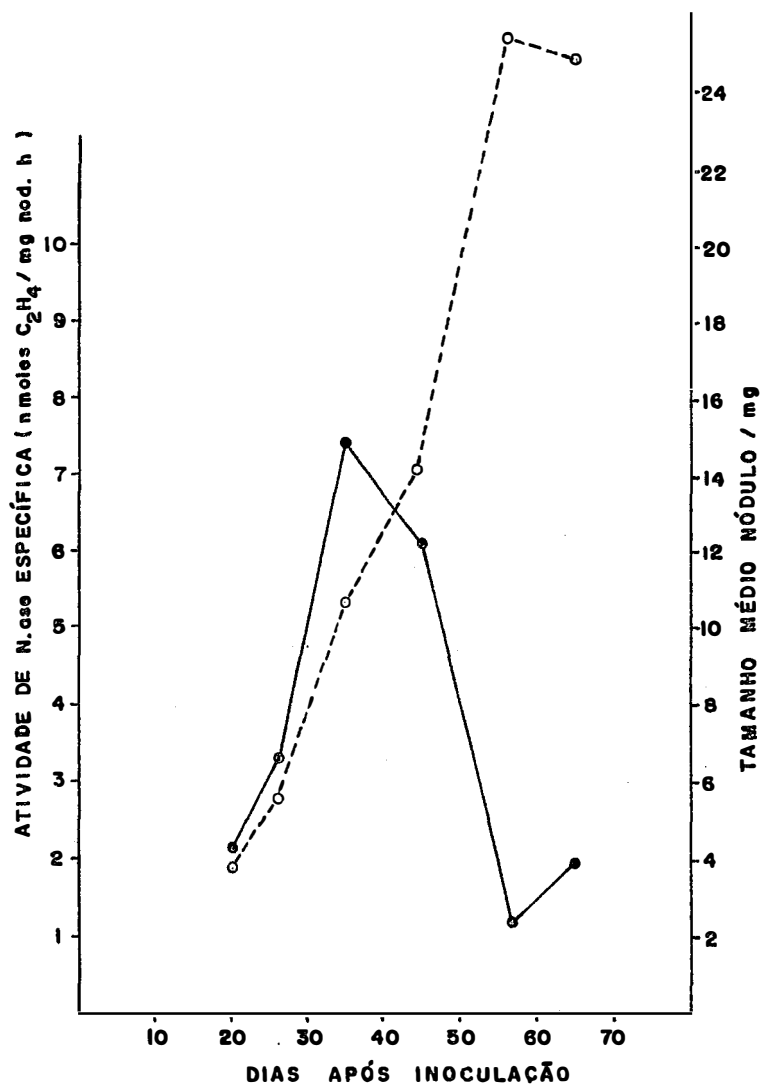


FIGURA 15. Evolução da atividade específica da N.ase (●—●) (nmoles C₂H₄/mg.hora) e do tamanho unitário de nódulos (o---o) de *R. phaseoli* C05 II inoculado em feijão da variedade Carioca-80. Valor médio de 150 nódulos.

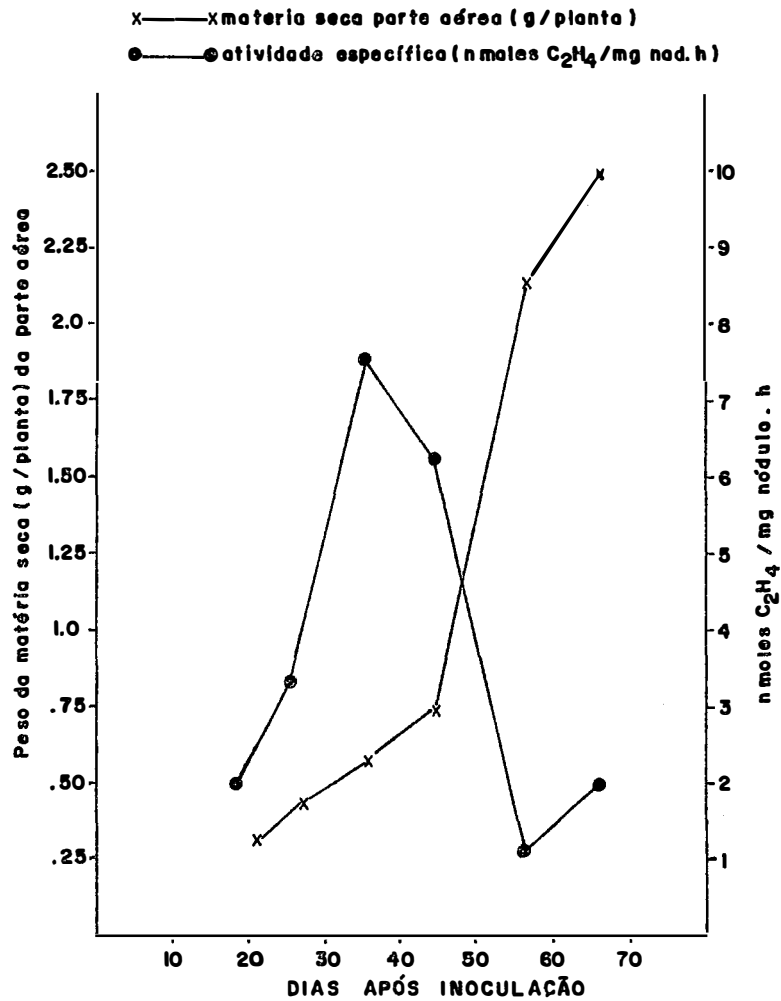


FIGURA 16. Evolução dos valores de peso da matéria seca (g/planta) da parte aérea e da atividade específica de Nase dos nódulos (nmoles C_2H_4 /mg nod.h) de planta de *P. vulgaris* cv. Carioca-80 inoculadas com a estirpe C05 II. Média de 6 plantas e 150 nódulos.

GRIA et alii (1985a) assinalam que este período corresponde com a máxima acumulação de N_2 fixado e intensa remobilizações às vagens. Neste estudo, a matéria seca nodular (média de 150 nódulos) acompanhou o incremento da matéria seca da parte aérea (Figura 17), porém não existem elementos suficientes que indiquem se existem ou não benefícios em termos de fixação de nitrogênio como resultado desta maior massa nodular. Estes conhecimentos contribuiriam portanto à determinação dos fatores envolvidos na persistência ou senescência nodular.

Pouco se sabe dos mecanismos que regulam a persistência nodular. Tem sido indicados vários fatores principalmente condições de estresse ambiental no solo (LIE, 1974; ROUGHLEY et alii, 1981; van RENSBURG e STRIDJOM, 1980, 1982) como responsáveis pelas mudanças na proporções de estirpe nos nódulos, porém, as populações nativas de rizóbios específicos e sua competitividade são sugeridas como os fatores de maior implicação (MOAWAD et alii, 1984; KOSSLAK e BOHLOOL, 1985). O efeito rizosférico significativo que ocorre nas etapas posteriores à floração (LOVATO et alii, 1985) poderia causar invasão das estirpes nativas nos pontos de infecção se a estirpe do inoculante não for persistente.

Os estudos em casa de vegetação permitiram uma avaliação primária do padrão de nodulação que contribui ao conhecimento do ciclo de fixação que apresentam as estir-

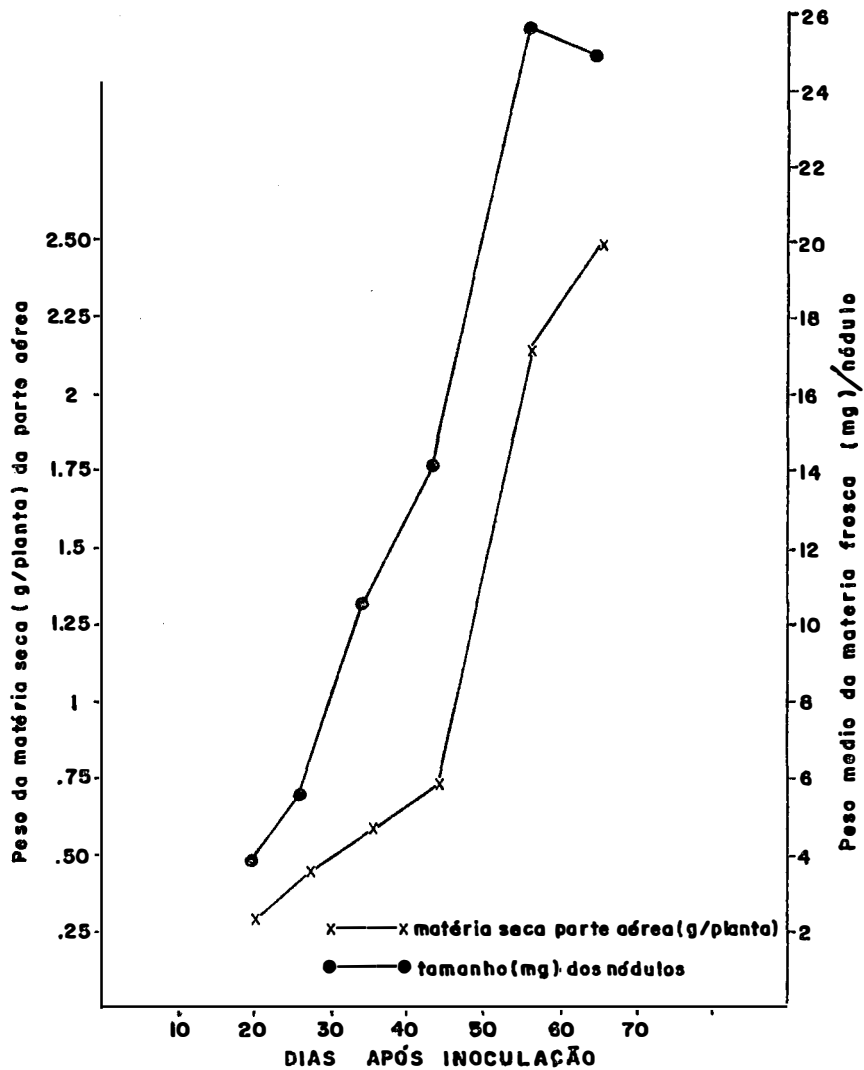


FIGURA 17. Evolução do peso da matéria seca (g/planta) da parte aérea, e do tamanho (mg) de nódulos de plantas de *P. vulgaris* cv. Carioca inoculadas com a estirpe C05 11 de *R. phaseoli*. Média de 6 plantas e 150 nódulos.

pes. Algumas evidências surgiram em favor do isolado C05 II porém deverão ser confirmados em experimentação de campo onde a população nativa atinja níveis apreciáveis.

O seguimento da nodulação durante todo o ciclo da cultura em condições de campo permitirá a seleção de estirpes com ciclo de fixação mais prolongado para controlar o avanço das nativas.

4.4. COMPETIÇÃO PELOS SÍTIOS DE INFECÇÃO NODULAR

As Tabelas 12 e 13 apresentam as respostas analisadas do efeito da inoculação com estirpes puras ou em mistura de *R. phaseoli* em areia:vermiculita ou com o agregado de solo-inóculo altamente populado por estirpes nativas ($5,7 \times 10^8$ R/g).

Com referência aos parâmetros da parte aérea (Tabela 12) observou-se novamente que a estirpe C05 apresentou características de ineficiência, sendo significativamente inferior a C05 II tanto para matéria seca como para N total. Neste experimento foi utilizada uma variante da estirpe C05 matriz que apresentava característica de resistência a 300 µg/ml de estreptomicina, tolerância a acidez e mostrou-se efetiva em testes de nodulação. Uma vez mais ficou demonstrada perda de eficiência simbiótica associada à instabi-

TABELA 12. Eficiência simbiótica e competitividade pelos sítios de nodulação de estirpes de *R. phaseoli* inoculadas em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) do cultivar Carioca-80 crescendo em vasos Leonard e com uma suspensão de solo (3 g/vaso) após 5 semanas. 1. Parâmetros de rendimento da planta (média de quatro repetições).

Tratamentos	Parte aérea			Eficiência ^{2/} relativa
	Matéria seca (g/planta)	N (%)	N-total (mg/planta)	
1899	0,46cde	4,14a	19,04cd	65,0
C05	0,27e	1,85cd	4,99e	16,7
C05 II	0,60c	3,89ab	23,34abcd	79,6
C05:C05II	0,56c	4,22a	23,63ab	80,6
1899:C05II	0,44cde	3,53ab	15,53d	53,0
C05 + solo ^{1/}	0,58c	3,98a	23,08abcd	78,8
1899 + solo	0,51cd	4,03a	20,81bcd	71,0
C05 II + solo	0,64c	3,99a	25,54abcd	87,2
C05:C05II + solo	0,65c	3,79ab	24,64abc	84,1
1899:C05II + solo	0,57c	4,09a	23,31abcd	79,5
Testemunha	0,33de	1,44d	4,75e	16,2
Nitrogênio	0,91b	3,22b	29,30a	100,0
Solo (estirpes nativas)	0,47cde	3,97a	18,66cd	63,7
Solo + Nitrogê nio (70 ppm) ^{2/}	1,13a	2,43c	27,38ab	93,5
F	27,86**	40,15**	22,63	
DMS (Tukey 5%)	0,229	0,738	8,022	
CV (%)	14	8	15	

^{1/} Foi agregada suspensão de 3 g de uma mistura de solos.

^{2/} avaliada conforme relação:

$$Ef_r = \frac{\text{Média N-total planta inoc.}}{\text{Média N-total planta C/N}} \times 100$$

TABELA 13. Eficiência simbiótica e competitividade pelos sítios de infecção nodular de estirpes de *R. phaseolii* inoculadas em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) do cultivar Carioca-80 crescendo em vasos Leonard e com uma suspensão de solo (3 g/vaso) após 5 semanas. II. Parâmetros de nodulação. (média de quatro repetições).

Tratamentos de inoculação	Nodulação/planta ^{1/}			Atividade N ase ^{1/} (μ moles/ pl.hora)	Eficiência nodular ^{3/} (mgNfix/g nod.)
	Número	Matéria seca (mg)	Tamanho (mg/nódulo)		
1899	85ab	57,86a	0,68	0,87ab	247
C05	29b	10,6b	0,37	0,09c	22,6
C05 II	82ab	51,2a	0,62	1,21a	363
C05:C05 II	89ab	51,88a	0,58	1,28a	363,9
C05 II:1899	64ab	39,09a	0,61	1,05ab	275,8
C05 + solo ^{2/}	142a	98,03a	0,69	1,08ab	187,1
1899 + solo	113a	45,64a	0,40	0,98ab	351,9
C05 II + solo	145a	76,6a	0,53	0,78ab	271,4
C05:C05 II + solo	134a	65,63a	0,49	1,05ab	303,1
1899:C05 II + solo	119a	53,9a	0,45	0,94ab	344
Solo (estirpes nativas)	140a	95,65a	0,68	1,04ab	145,4
Solo + nitrogênio (70 ppm)	167a	94,31a	0,56	0,46bc	240
F	4,20**	7,55**		5,83**	
DMS (Tukey 5%)	6,07	3,707		0,312	
CV (%)	25	20		11,2	

^{1/} Dados analisados segundo $\sqrt{x+0,5}$.

^{2/} suspensão de 3 gramas de uma mistura de 5 solos com 570×10^6 R/g.

^{3/} avaliada conforme a relação:

$$Ef_{\text{nodular}} = \frac{\text{mg N fix} - \text{mg N test.}}{\text{matéria seca nod. (g)}}$$

lidade genética da estirpe C05 que permite sugerir sua exclusão das recomendações à indústria de inoculantes. Similares resultados foram citados por GEROSA (1985).

O isolado C05 II superou à estirpe 1899 tanto para matéria seca como para N total da parte aérea (Tabela 12). Quando calculado o parâmetro de eficiência relativa com base na testemunha com 70 ppm de nitrogênio (NH_4NO_3) observou-se que a estirpe C05 II rendeu aproximadamente 80% daquele valor, sendo sugerido que a contribuição desta, a nutrição nitrogenada da planta foi satisfatória; a estirpe 1899 entando rendeu quase 70% da testemunha com nitrogênio. Estes dados concordam plenamente nas suas tendências com os encontrados no experimento anterior (item 4.3), porém nos valores absolutos para matéria seca e N total são inferiores. Isto poderia ser explicado pelas condições de baixa temperatura registradas neste segundo estudo que atrasaram o ciclo da planta. Aos 35 dias as plantas ainda não registraram floração plena,

Quando analisados os dados da nodulação (Tabela 13) para os tratamentos em areia-vermiculita, as diferenças unicamente foram significativas para a estirpe C05 que nodulou com baixo número, peso e atividade. Não são registradas diferenças significativas entre 1899 e C05 II porém a eficiência nodular indicou uma superação do isolado C05 II em 32%, o que significa uma taxa assimilatória do nitrogênio fi

xado maior para esta estirpe.

As inoculações das estirpes em mistura 1:1 indicaram segundo a Tabela 14, que C05 II dominou completamente à C05, ocupando 100% dos nódulos em tanto que foi igualmente competitiva que 1899 pelos sítios de infecção nodular. Esta informação permitiu interpretar a superação nos valores para todos os parâmetros simbióticos registrados na mistura C05 + C05 II. Estes resultados estariam indicando na realidade que a estirpe C05 II, apesar de se encontrar em concentrações equivalentes à metade no inóculo, conseguiu se multiplicar e infectar o sistema radicular eficientemente, confirmando uma vez mais a importância da velocidade de nodulação como fator na competição nodular das estirpes (LABANDERA e VINCENT, 1975). Não foram portanto evidenciados efeitos da concentração do inóculo em nenhum parâmetro simbiótico. PEREIRA (1983) em estudos de competição não encontrou relação entre a concentração da estirpe no inóculo e percentagem dos nódulos, já que as estirpes competitivas dominaram ainda em inferioridade de condições. PERES e VIDOR (1980b) igualmente observaram que quando as estirpes são altamente competitivas sempre predominavam nos nódulos.

A identificação dos nódulos no tratamento C05 II + 1899 revelou que ambas estirpes foram igualmente competitivas para a formação de nódulos (TABELA 14). Isto poderia explicar a tendência à depressão observada nos parâmetros

TABELA 14. Presença (%) das estirpes de *R. phaseoli* nos nódulos de plantas de feijão da variedade Carioca - 80 aos 35 dias após plantio. Média de quatro repetições.

Estirpes	% nos nódulos			
	C05	C05 II	1899	nativas
1899	-	-	100	-
C05	100	-	-	-
C05 II	-	100	-	-
C05:C05 II	0	100	-	-
1899:C05 II	-	49,75(±15)	50,25(±15)	-
C05 + solo	11,25(±8)	-	-	88,75(±8)
1899 + solo	-	-	96	4,0
C05 II + solo	-	90 (±5)	-	10 (±5)
C05:C05 II + solo	0	83,75(±7)	-	16,25(±7)
1899:C05 II + solo	0	42,25	54	3,75
Testemunha + solo	-	-	-	100

de rendimento da parte aérea e atividade da nitrogenase cujos valores se aproximaram mais aos registrados para a estirpe 1899 (Tabela 12 e 13). Embora sejam somente tendências, poderia ser interpretado pelo fato da estirpe 1899 ser menos eficiente e apresentarem um ciclo de nodulação mais precoce, como foi sugerido no item 4.3.1. Estas observações apoiam os conceitos de que competição nodular e eficiência não são critérios correlacionados (AMARGER, 1981a,b; TRINICK, 1982; PEREIRA, 1983). Seria interessante conferir em etapas mais avançadas do ciclo da cultura, se ocorrem mudanças na composição da população dos nódulos e se a estirpe C05 II é capaz de ocupar novos pontos de infecção. TRUJILLO e FREIRE (1986) avaliaram o efeito de inóculos múltiplos de *R. phaseo- li* na nodulação do feijoeiro e determinaram que para algumas combinações de estirpes ocorriam mudanças na proporção relativa nos nódulos ao longo do ciclo. Porém, quando as estirpes eram altamente competitivas elas dominaram nos nódulos aos 18 dias tanto como aos 51 dias.

A inoculação dos vasos com solo-inóculo contendo 17×10^8 rizóbios nativos específicos marcou um efeito significativo para os parâmetros de rendimento e nodulação dos tratamentos inoculados com a estirpe C05 (Tabela 12 e 13). Isto se explica pela invasão das estirpes nativas que ocuparam 88,75% dos nódulos (Tabela 14). A estirpe C05 conseguiu formar apenas 11.25% dos nódulos porém com maior chances que quando confrontada com o isolado C05 II.

As estirpes nativas são eficientes mas não tanto quanto a estirpe C05 II. Apresentaram eficiência nodular 60% menor que este isolado e 40% menor que a estirpe 1899 (tabela 13). Poucas pesquisas citam estudos das populações nativas. Para *R. phaseoli* sabe-se que elas representam 60 até $6,9 \times 10^6$ R/g de solo variando em função de região e tradição da cultura do feijão (SAITO *et alii*, 1983) sendo de eficiência média. Estudos de competição com estirpes introduzidas têm demonstrado que embora não sendo capazes de superar inicialmente as vantagens de localização estratégica e concentração do inóculo, as estirpes nativas invadem tardiamente o sistema radicular do hospedeiro deslocando as estirpes introduzidas (SAITO e RUSCHEL, 1980; MOAWAD *et alii*, 1984). Neste estudo, as estirpes nativas não conseguiram crescer nas placas seletivas demonstrando sensibilidade aos níveis de antibióticos e fungicidas utilizados. Da mesma forma, GEROSA (1985) encontrou sensibilidade natural a três antibióticos da população nativa de *R. phaseoli* estudada.

A estirpe C05 II quando inoculada ao mesmo tempo que as nativas, em concentrações similares e sem vantagens estratégicas conseguiu formar 90% dos nódulos enquanto que 1899 o fez em 96% dos casos. Outros efeitos da incorporação do solo não foram evidenciados; apenas uma tendência à diminuição no tamanho dos nódulos com o conseguinte aumento no número. Isto não apresentou nenhuma repercussão nos parâmetros de rendimento. PEREIRA (1983) encontrou aumento

no peso dos nódulos nos tratamentos crescendo em solo, porém não refletidos em dados de matéria seca ou N-total. Isto confirmaria que o efeito do tratamento de inoculação com solo é referido à população nativa de rizóbios especificamente.

O padrão de competição do isolado C05 II quando inoculado em mistura com C05 e com solo-inóculo mudou de 90% a 84% da representação nodular. Isto estaria indicando que a redução à metade na concentração celular de C05 II no inóculo aumentou as chances das estirpes nativas de 4 para 16% na proporção de nódulos formados. Apesar disto, a predominância deste isolado foi evidente. Alguns estudos têm demonstrado que a população indígena muda o padrão de competição das estirpes (KOSSLAK e BOHLOOL, 1985) em forma mais significativa que fatores físicos ou químicos do solo. WINARNO e LIE (1979) observaram diminuição na nodulação de uma estirpe eficiente quando era inoculada conjuntamente com uma não eficiente. SAITO e RUSCHEL (1980) concluíram que a competição entre estirpes em um inoculante polivalente promove efeitos na simbiose mais pronunciados que a que acontece em um inóculo monovalente com as estirpes do solo. Os autores (WINARNO e LIE, 1979; VIDOR *et alii*, 1979; JOSEPHSON e PEPPER, 1984) chamam a atenção às relações de competitividade que podem ocorrer no inóculo mudando as proporções inicialmente consideradas.

Quanto à performance da mistura C05 II + 1899

em presença das estirpes nativas, existem evidências através da proporção nódulos identificados (Tabela 15) que as estirpes do inoculante conseguiram bloquear em parte a nodulação das estirpes nativas que somente formavam 3,75% dos nódulos. Das duas estirpes, 1899 foi responsável por 54% dos nódulos sendo que para C05 II foi de 42,25%. Esta distribuição com respeito ao tratamento mistura sem solo, estaria levemente a favor do 1899. A nodulação e atividade supostamente mais precoces desta estirpe poderiam explicar estes fatos. Porém, não são registradas diferenças significativas para matéria seca e N total entre este tratamento e o isolado C05 II, assim como para a eficiência nodular.

A mistura de C05 II + 1899 no inoculante não seria recomendável para situações de baixa população nativa. Nestas condições estaria assegurada a predominância de C05 II nos sítios de nodulação, uma estirpe com alto potencial simbiótico e indícios de persistência nodular sempre e quando seja garantizada uma concentração adequada no inóculo. Para o caso de altas densidades de populações nativas, a inclusão de uma estirpe com ciclo de nodulação precoce como a 1899 em mistura com a C05 II poderia assegurar a ocupação de 95% ou mais dos nódulos com estirpes eficientes.

Os estudos de competição desenvolvidos no presente trabalho não incluíram o seguimento da performance das estirpes e isolados além da floração. Portanto, não foi

possível confirmar se a habilidade do isolado C05 II de continuar produzindo nódulos durante o ciclo da cultura significava um fator positivo para a competição e persistência nodular. Sugere-se a realização a curto prazo, de estudos desta natureza.

4.5. SOBREVIVÊNCIA NA TURFA

As Figuras 18, 19 e 20 representam as respostas encontradas nos estudos de sobrevivência das estirpes C05, 1899 e dos isolados (C05 I, C05 II e C05 III) de *R. phaseoli* nos inoculantes preparados em diferentes turfas mantidos a 28°C durante 60 dias.

A população de bactérias sofreu uma queda numérica a partir dos 3 dias de armazenamento e em forma contínua até os 30 dias em que os efeitos foram menos significativos (Figura 18). Não foram registradas perdas de umidade que expliquem esses fatos. Este comportamento é de se esperar em inoculantes mantidos a temperaturas de 28°C (SOMASEGARAN *et alii*, 1984, 1985), devendo se salientar que os níveis de inóculo inicial tanto como a natureza da turfa utilizada poderiam ter contribuído a concentrações iniciais de bactérias pouco satisfatórias. A diminuição populacional foi marcada para os tratamentos de turfa sem esterilizar seguida por os que receberam irradiação com doses de 1 Mrad (Figura 19), sen

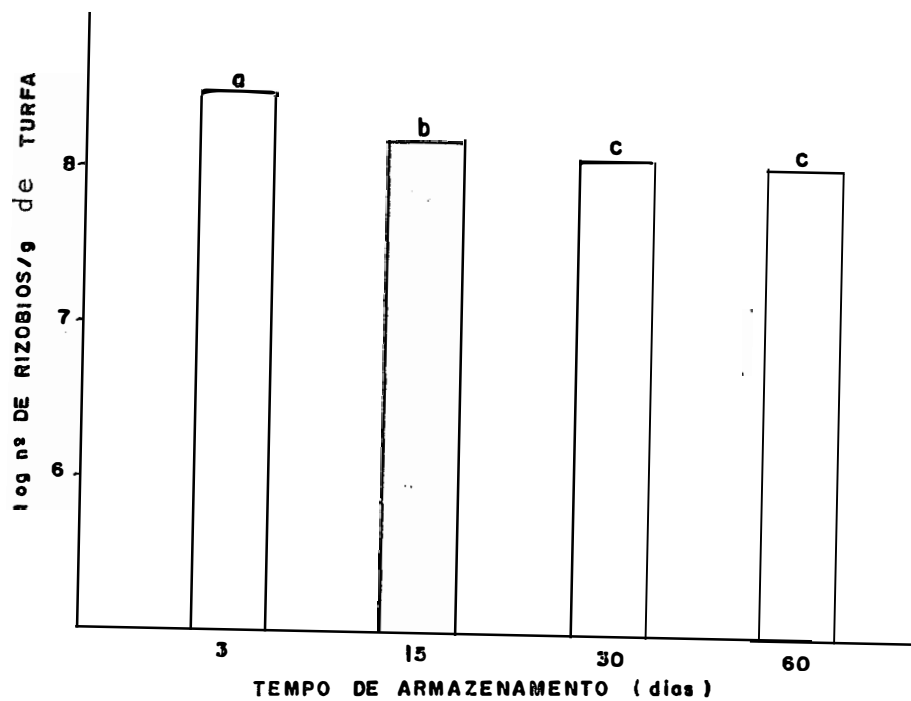


FIGURA 18. Efeito do tempo de armazenamento na sobrevivência de *R. phaseoli* na turfa.

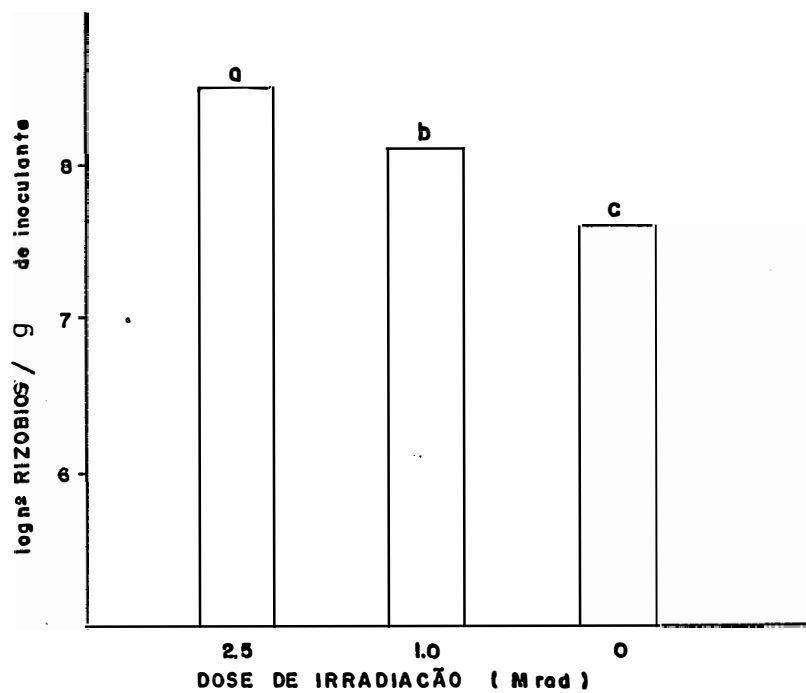


FIGURA 19. Efeito do tratamento da turfa na sobrevivência de *R. phaseoli*.

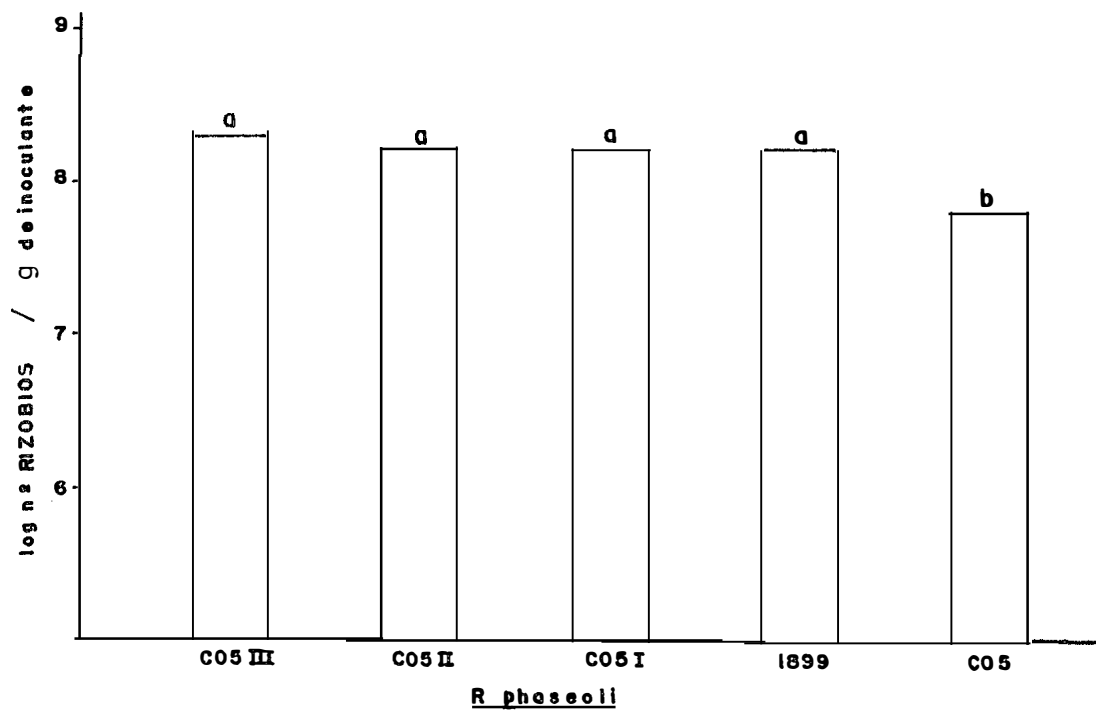


FIGURA 20. Efeito das estirpes de *R. phaseoli* na qualidade dos inoculantes.

do que, as turfas irradiadas com doses de 2,5 Mrad apresentaram os valores médios mais altos de concentração de bactérias. Quanto às estirpes, a C05 se destacou pelas baixas concentrações, e apresentando diferenças significativas em relação às demais (Figura 20), indicando que as características de resistência a antibióticos e fungicidas poderiam ter contribuído para incrementar a sobrevivência de mutantes e isolados. Similares resultados foram apresentados por FONSECA e SAITO (1982) para estirpes de *R. phaseoli* resistentes à estreptomicina, espectinomicina e novobiocina.

Quando analisado mais em detalhe o comportamento das estirpes (Tabela 15) observou-se que unicamente para turfas irradiadas com 2,5 Mrad não se detectam diferenças significativas na sobrevivência para o período de estudo considerado. Porém, para todas as outras situações, a estirpe C05, não resistente a antibióticos apresentou concentrações significativamente menores. Não se registraram diferenças relativas entre os isolados com a estirpe 1899, o que indica um padrão de sobrevivência na turfa similar qualquer que seja o tratamento feito ao suporte. Estudos de sobrevivência além dos 60 dias de incubação para turfas irradiadas a 2,5 Mrad poderiam ter expressado diferenças entre as estirpes não encontradas durante este período. A inoculação de turfas irradiadas com 2,5 Mrad com uma suspensão de At5 identificado como de grande potencial inibitório afetou diretamente a estirpe C05, o que confirma os resultados citados nos

estudos "in vitro" em meio agarizado, identificando este isolado da turfa como um dos responsáveis da baixa sobrevivência das estirpes de *Rhizobium* nos inoculantes (Tabela 15). Inoculantes preparados com as estirpes resistentes a antibióticos não manifestaram em geral perdas de sobrevivência pela presença do antagonista At5 o que indica a vantagem competitiva conseguida na seleção. Este tipo de estudo poderia ser indicado para testar futuras estirpes quanto a seu comportamento na turfa e quantificar as perdas de sobrevivência do *Rhizobium* quando confrontado a um forte antagonista.

TABELA 15. Comportamento de estirpes de *R. phaseoli* em inoculantes preparados em turfas com diferentes tratamentos de irradiação. Média de 8 dados.

Estirpes	Dose de irradiação (Mrad)				Teste F (1%)
	0	1	2,5+At5	2,5	
	log n° de rizobios/g				
1899	7,73a ¹ c ²	8,16aB	8,54aA	8,39aA	**
C05	7,20bC	8,09bB	8,14bB	8,37aA	**
C05I	7,72aC	8,27aB	8,50aA	8,55aA	**
C05II	7,94aB	8,13aB	8,48aA	8,56aA	**
C05III	7,79aC	8,27aB	8,61aA	8,49aA	**
Teste F(1%)	**	**	**	**	
CV(%) = 7,62%					

Valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente a nível de 5% pelo teste de Tukey.

^{1/} Para médias de estirpes dentro do fator turfa.
^{2/} Para médias de turfa dentro do fator estirpe.

De um modo geral, a estirpe 1899 e os três isolados não diferiram na sua performance nos inoculantes nas quatro datas de amostragem, apesar da aparente superioridade de C05 II ao final do período. A estirpe C05 apresentou sempre os valores de concentração significativamente mais baixos (Tabela 16 e Figura 21). Para todos os casos a queda significativa na população ocorreu de 3 para 15 dias de armazenamento e independentemente do tratamento turfa. No caso de C05 e C05 III continuou decrescendo até o fim do período de estudo; para a estirpe 1899 e os isolados C05 I e C05 II não foram observadas diferenças significativas nas contagens aos 15, 30 e 60 dias o que indicaria que os contaminantes remanescentes estão sendo controlados e que a queda inicial poderia ser devido a outros fatores talvez físicos além do biológico.

Os resultados até aqui apresentados confirmam observações prévias de outros autores (LOPES e GIARDINI, 1977; MORETTI e SAITO, 1978; LABANDERA *et alii*, 1982) sobre a baixa sobrevivência dos rizóbios em turfas não esterilizadas. Várias poderiam ser as causas sendo o antagonismo microbiano a mais provável (DATE e ROUGHLEY, 1977). No presente estudo ficou demonstrado que a inclusão na turfa esterilizada de 2,5 Mrad de um antagonista de alto-potencial inibitório, foi capaz de reduzir as populações em média unidade logarítmica quando elas não foram resistentes (Figura 22). A expressão do antagonismo de At5 foi evidenciada a partir dos

TABELA 16. Sobrevivência de *R. phaseoli* em inoculantes armazenados a 28°C durante 60 dias. Média de 8 dados.

Estirpe	Tempo (dias.)				Teste F (1%)
	3	15	30	60	
log nº de rizóbios/g umido					
1899	8,18b ¹ A ²	8,43aB	8,06abB	8,13abB	**
C05	8,24bA	7,96cB	7,88bBC	7,71cC	**
C05 I	8,70aA	8,15bcB	8,16aB	8,05abB	**
C05 II	8,57aA	8,12bcB	8,19aB	8,25aB	**
C05 III	8,74aA	8,28abB	8,15aBC	7,98bC	**
Teste F (1%)	**	**	**	**	

Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente a nível de 5% pelo teste de Tukey.

^{1/} Para médias de estirpes dentro do fator tempo.

^{2/} Para médias de tempo dentro do fator estirpe.

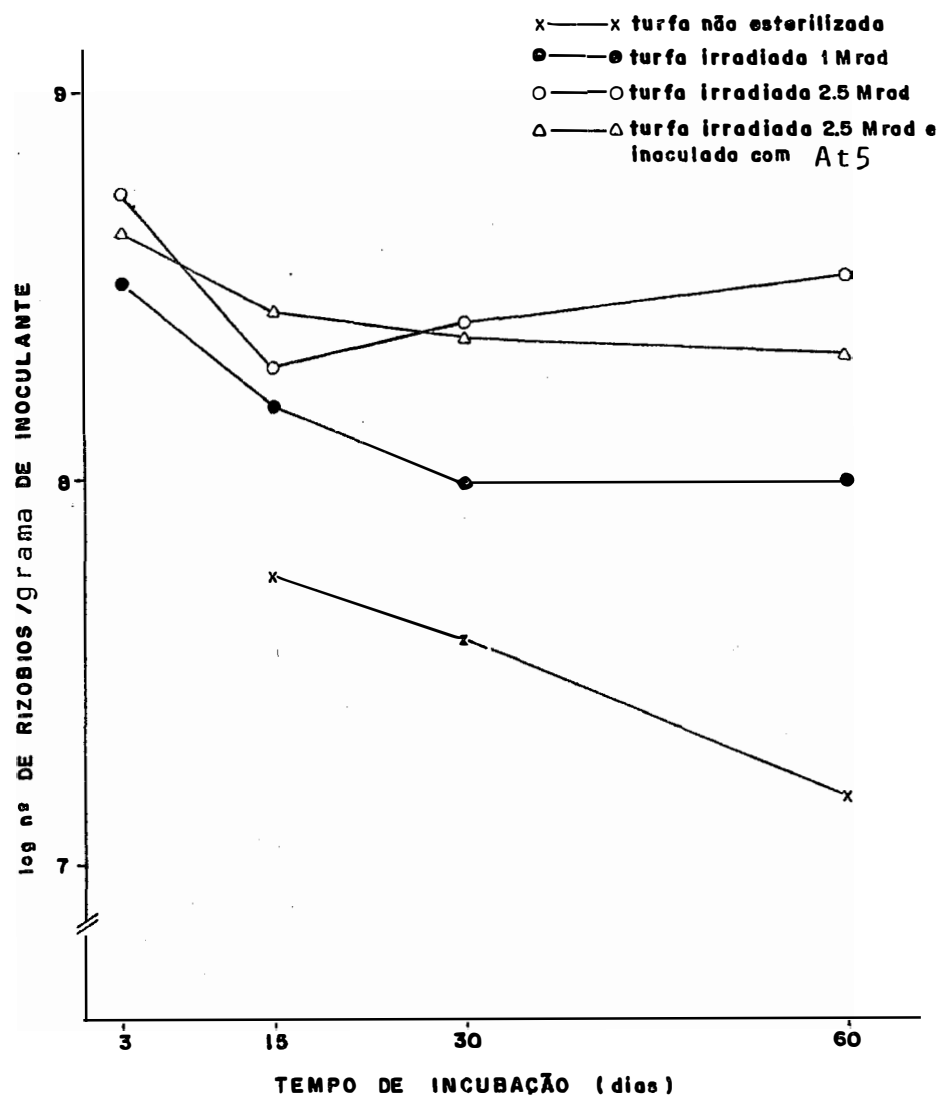


FIGURA 21. Sobrevivência de *Rhizobium phaseoli* em turfa com diferentes tratamentos de irradiação.

15 dias (Tabela 17) e poderia atingir efeitos mais drásticos com períodos de contagens além dos 60 dias. Foram observadas diferenças na performance das estirpes. Para a estirpe C05 e os isolados C05 I, o efeito do antagonista começou a partir dos 15 dias sendo significativamente evidente aos 60 dias de armazenamento dos inoculantes. C05 II apresentou comportamento similar, porém foi observada uma recuperação ao final do período de difícil explicação. Para o isolado C05 III e a estirpe 1899 não houve efeito do *Streptomyces* At5 na sobrevivência das bactérias durante todo o período de estudo. A baixa capacidade competitiva e lento crescimento são características bem conhecidas dentro dos actinomicetos (ALEXANDER, 1977) que se tornam mais agressivos em função das condições e tempo de armazenamento dos inoculantes. Uma vez mais ficou demonstrada que é possível através de uma seleção massal obter indivíduos com características competitivas superiores.

Turfas brasileiras não irradiadas (SAITO *et alii*, 1985; FONSECA *et alii*, 1985) apresentaram altas densidades de actinomicetos do gênero *Streptomyces* de $4,5 \times 10^5$ até 5×10^8 /g de turfa junto a protozoários como amebas (5×10^4) flagelados (10^3) e cistos (10^5 /g). Isto determina que a esterilização da turfa seja essencial (DATE e ROUGHLEY, 1977), sendo a irradiação gama o método mais recomendável.

TABELA 17. Efeito do *Streptomyces* At5 inoculado na turfa irradiada com 2,5 Mrad, na sobrevivência de *R. phaseoli*. Média de 2 repetições (em duplicata).

Tempo de armazenamento (dia)	<i>Rhizobium phaseoli</i>				
	C05	C05 I	C05 II	C05 III	1899
	log nº de rizobios/g				
3	8,42a	8,71a	8,88a	8,82a	8,26a
15	8,24ab	8,51ab	8,24b	8,58a	8,51a
30	8,01ab	8,55ab	8,26b	8,56a	8,34a
60	7,88b	8,25b	8,55ab	8,47a	8,43a
Teste F (1%)	**	**	**	**	**

Valores seguidos pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

A dose de irradiação dependerá das concentrações de contaminantes. No presente trabalho, a dose máxima utilizada foi de 2,5 Mrad e não foram registradas perdas populacionais significativas nos 60 dias que durou o período experimental (Figura 21) para nenhuma das estirpes (Tabela 15). PARKER e VINCENT (1981) estimaram que doses de 1 a 2,3 Mrad eram suficientes para eliminar actinomicetos, porém as

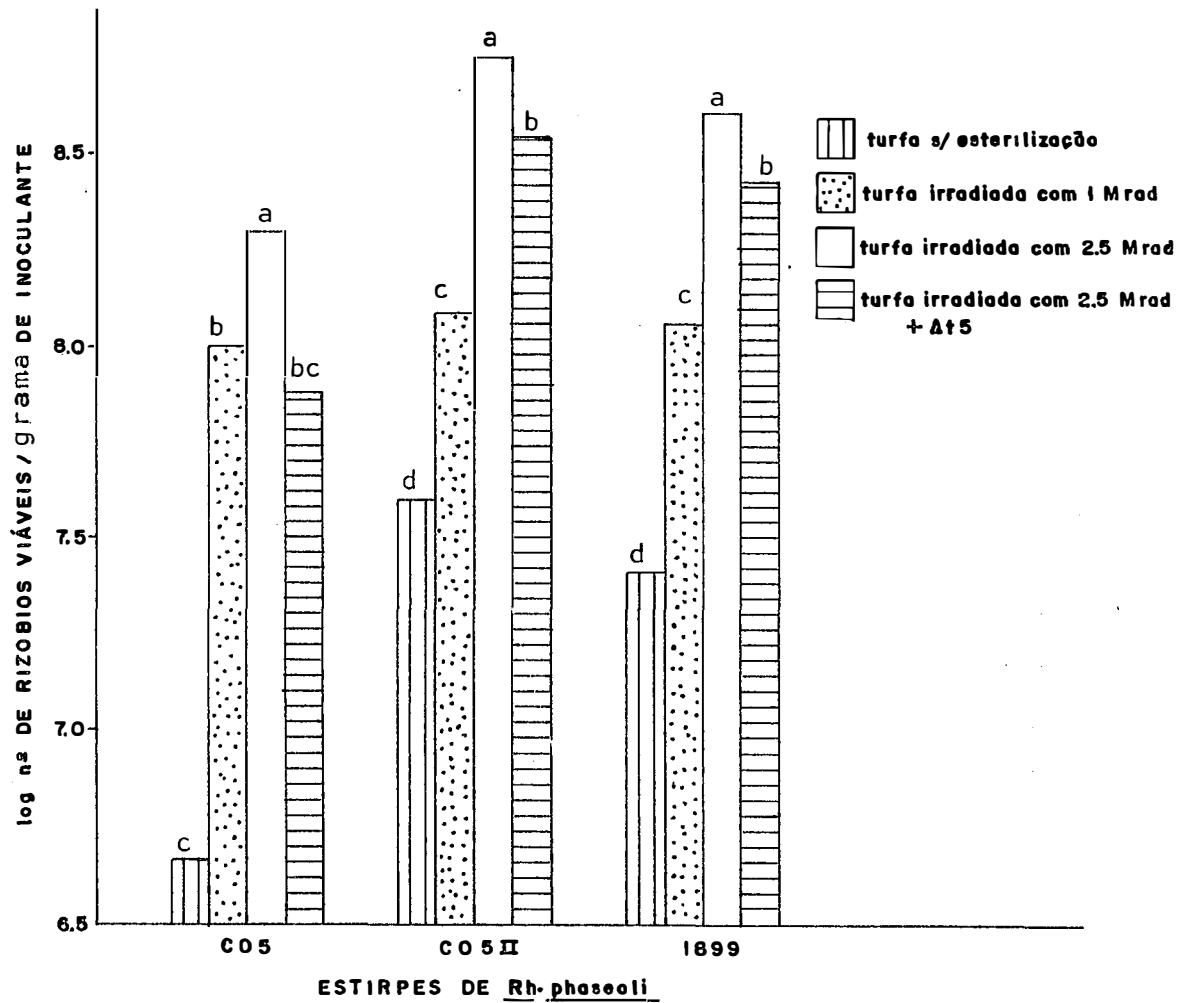


FIGURA 22. Qualidade de inoculantes em função das estirpes de *R. phaseoli* utilizadas e do tratamento aplicado à turfa 60 dias após armazenamento a 28°C.

altas populações deste tipo de microrganismos registradas nas turfas no presente estudo permitem concluir que doses de 1,0 Mrad não foram adequadas. SAITO *et alii* (1985) para turfas com níveis de actinomicetos de $2,5 \times 10^7$ cel/g não conseguiram esterilização eficiente com doses de 2,5 Mrad.

A maioria dos trabalhos publicados consideram níveis de irradiação equivalentes a 5,0 Mrad com excelentes resultados na sobrevivência do *Rhizobium* independente do tipo de turfa (ROUGHLEY e VINCENT, 1967; LOPES e GIARDINI, 1977; MORETTI e SAITO, 1978; PARKER e VINCENT, 1981; STRIDJOM e VAN RENSBURG, 1981; FONSECA *et alii*, 1985).

Existem boas razões tanto econômicas como biológicas para evitar altas doses se um tratamento médio, menor ao requerido para absoluta esterilização é suficiente para atingir e manter por longos períodos concentrações adequadas de *Rhizobium* (PARKER e VINCENT, 1981). A dose de 2,5 Mrad não promoveu uma esterilização completa da turfa em estudo, porém conseguiu controlar os contaminantes pelo menos durante o período de experimentação (60 dias), conduzido a temperaturas que poderiam simular as condições de armazenamento (28°C). A partir destas informações, surge a proposta de uma avaliação mais profunda das possibilidades de combinar métodos de esterilização parcial adequados ao tipo de turfa com utilização de estirpes com maior competição saprofítica como uma das alternativas para incrementar a qualida-

de dos inoculantes brasileiros.

Segundo DATE e ROUGHLEY (1977) um passo importante no preparo dos inoculantes em turfas parcialmente esterilizadas seria assegurar altas concentrações iniciais de *Rhizobium* para controlar a proliferação dos contaminantes remanescentes. Neste sentido, foi constatado no presente estudo uma baixa capacidade de absorção de caldo da turfa utilizada nos inoculantes (30%), o que é levantado como limitação importante para atingir contagens de 5×10^9 R/g úmido, considerados ideais para inoculantes saídos de fábrica (SOMASEGARAN, 1985; LABANDERA, 1986). Os inoculantes preparados atingiram na turfa esterilizada com 2,5 Mrad, concentrações aproximadas a $6,3 \times 10^8$ R/g úmido ou seja dez vezes inferiores aos requeridos o que sugere a condução de futuros experimentos que visem o melhoramento das propriedades físicas do suporte atual.

5. CONCLUSÕES

1. Foi possível através de uma seleção massal, obter indivíduos com características competitivas superiores. As colônias crescidas nos halos de inibição das estirpes C05 e SEMIA 487 confrontadas com *Streptomyces* fortemente antagônicas apresentaram elevada resistência a antibióticos, fungicidas e cresceram em meio ácido (pH 4,3), não sendo detectada atividade bacteriocinogênica.
2. O isolado C05 II foi superior em eficiência e capacidade competitiva para a formação de nódulos, apresentando um ciclo de nodulação mais persistente. Se propõe a condu-

ção de experimentos de campo que comprovem este comportamento em forma definitiva.

3. A resistência a antibióticos conferiu vantagens de sobrevivência às estirpes e isolados de *R. phaseoli* na turfa não esterilizada ou parcialmente esterilizada com radiações gama (1 Mrad ou 2,5 Mrad).
4. Por todas as características que apresenta recomenda-se a utilização do isolado C05 II para a produção de inoculantes comerciais para feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e a condução de futuros estudos para melhorar a qualidade do suporte de forma a garantir uma concentração inicial maior do *Rhizobium* na turfa.

6. LITERATURA CITADA

- AARONSON, S.H., 1970. *Experimental Microbial Ecology*. Academic Press. New York London. 235 p.
- AHMED, B. e P. QUILT, 1981. Effect of inoculum concentration and seed pelleting on growth and nitrogenase activity of *Centroccema virginianum* cv. "Antigua". *Trop Agric* (Trinidad), 58: 349-355.
- ALEXANDER, M., 1977. Introduction to Soil Microbiology. John Wiley e Sons (eds). New York. Lo. 472 p.
- AL-RASHIDI; R.K., T.E. LOYNACHAN e L.R. FREDERICK, 1982. Desiccation tolerance of four strains of *Rhizobium japonicum*. *Soil Biol. Biochem.* 14: 489-493.
- AMARGER, N., 1981a. Competition for nodule formation between effective and ineffective strains of *Rhizobium meliloti*. *Soil Biol. Biochem.* 13: 475-480.

- AMARGER, N., 1981b. Selection of *Rhizobium* strains on their competitive ability for nodulation. *Soil Biol. Biochem.* 13: 481-486.
- AMARGER, N. e J.P. LOBREAU, 1982. Quantitative study of nodulation competitiveness in *Rhizobium* strains. *Appl. Environ Microb*, 44: 583-588.
- ANTONIW, L.D. e J.I. SPRENT, 1977. Growth and nitrogen fixation of *Phaseolus vulgaris* L. at two irradiances. *Ann. Bot.* 42: 389-397.
- ANUSUYA, D. e S.B. SULLIA, 1984. The antibiotic effect of culture filtrates of some soil fungi on rhizobial growth in cultures. *Plant and Soil* 77: 387-390.
- AZEVEDO, J.L., S.T.A. CASSINI e A. OLIVERA, 1980. Réplica dor multialça para uso geral em bacteriologia. Laboratório de Genética. *Summa Pathologica* (no prelo).
- BARAIBAR, A., C. LABANDERA e A. MILIAN, 1982. Caracteres culturales e simbióticos de cepas de *Rhizobium* de interés comercial. Anais. XI RELAR, Lima, Peru.
- BARRIOS, S., N. RAGGIO e M. RAGGIO, 1963. Effect of temperature on infection of isolated bean roots by rhizobia. *Plant Physiol.*, 38: 171-174.
- BERGERSEN, F.J., J. BROCKWELL, A.H. GIBSON e E.A. SCHWINGHAMER, 1971. Studies of natural populations and mutants of *Rhizobium* in the improvement of legume inoculants. *Plant Soil*. Special Volume. p. 3-16.

BEYNON, J.L., D.P. JOSEY, 1980. Demonstration of heterogeneity in a natural population of *Rhizobium phaseoli* using variation in intrinsic antibiotic resistance. *J. Gen. Microb.*, 118: 437-442.

BHUVANESWARI, T.V., D.G. TURGEON, W.D. BAVER, 1980. Early events in the infection of soybean (*Glycine max* L. Merr.) by *Rhizobium japonicum* 1 - Localization of infectible root cells. *Plant Physiol.*, 66: 1027-1031.

BOONKERD, N., D.F. WEBER e D.F. BEZDICEZ, 1978. Influence of *Rhizobium japonicum* strains and inoculation methods on soybean grown in rhizobia populated soils. *Agronomy Journal*. 70: 547-549.

BROCKWELL, J., W.F. DUDMAN, A. H. GIBSON, F.W. HELY e A.C. ROBINSON, 1968. An integrated programme for the improvement of legume inoculant strains. In: HOLMES, J.W. (ed.). *Trans. 9th International Congress of Soil Science*, vol. 2. Angus e Robertson, Sidney, Australia p. 103-114.

BROCKWELL, J., 1981. Can inoculant strains ever compete successfully with established soil populations? In: GIBSON, A.H. e W.E. NEWTON (eds.). *Current Perspectives in Nitrogen Fixation*. Proceed. of the 4th Int. Symp. on Nitrogen Fixation. Canberra. Australia. p. 208.

BROCKWELL, J., A. DIATLOFF, R.J. ROUGHLEY e R.A. DATE, 1982. Selection of *Rhizobium* for inoculants. In: VINCENT, J.M. (ed.). *Nitrogen Fixation in Legumes*. Academic Press, p. 173-189.

BROCKWELL, J., R.R. GAULT, D.L. CHASE, G.L. TURNER e F.J. BERGERSEN, 1985. Establishment and expression of soybean symbiosis in a soil previously free of *Rhizobium japonicum*. *Aust. J. Agric. Res.* 36: 397-409.

- BURTON, J.B., 1980. New developments in inoculating legumes. In: SUBRA RAO, N.S. (ed.). *Recent Advances in Nitrogen Fixation*. Londres. Edward Arnold. p. 380-405.
- BUSHBY, H.V.A. e K.C. MARSHALL, 1977. Some factors affecting the survival of root nodule bacteria on desiccation. *Soil Biol. Biochem.* 9: 143-147.
- BUSHBY, H.V.A., 1981a. Quantitative estimation of Rhizobia in non-sterile soil using antibiotics and fungicides. *Soil Biol. Biochem.* 13: 237-239.
- BUSHBY, H.V.A., 1981b. Changes in the numbers of antibiotic-resistant Rhizobia in the soil and rhizosphere of field grown *Vigna mungo* cv. Regur. *Soil Biol. Biochem.* 13: 241-245.
- BUSHBY, H.V.A., 1984. Colonization of rhizospheres and nodulation of two *Vigna* species by rhizobia inoculated onto seed: influence of soil. *Soil Biol. Biochem.*, 16: 635-641.
- CAETANO, E., A. LAGARES, L.G. WALL e G. FAVELUKES, 1986. Adhesi3n especifca de *Rhizobium meliloti* a la superficie radicular de alfalfa. Anais XII Relar. Campinas, SP, Bra sil. Outubro 1984 p. 243-249.
- CALDWELL, B.E. e G. VEST, 1970. Effects of *Rhizobium japonicum* strains on soybean yields. *Crop Sci.* 10: 19-21.
- CASSINI, S.M.T., 1980. Atividade bacteriocinog4nica a capacidade competitiva entre estirpes de *Rhizobium phaseoli* - Piracicaba, ESALQ/USP, 103 p. (Disserta33o de Mestrado).

- CASSMAN, K.G., D.N. MUNNS e D.P. BECK, 1981. Phosphorus nutrition of *Rhizobium japonicum* strain differences in phosphate storage and utilization - *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 45: 517-520.
- CECCATTO, E., 1985. Tolerância e competitividade do *Rhizobium phaseali* em solo ácido. V Congresso Brasileiro de Iniciação Científica em Ciências Agrárias 2-6 setembro 1985 - Escola Superior de Agricultura de Lavras - Lavras - MG.
- COELHO, R.R.R. e R. DROZDOWICS, 1979. The occurrence of actinomycetes in a cerrado soil in Brasil. *Rev. Ecol. Biol. Sol.*, 15: 459-473.
- COSTA, S.O.P., 1973. Produção de colicinas *Escherichia coli*. Em: Exercícios Práticos de Genética. Azevedo J.L. e Costa, S.O.P. (org.). Companhia Ed. Nacional, SP p. 186-188.
- CUNNINGHAM, S.D. e D.N. MUNNS, 1984a. The correlation between extracellular polysaccharide production and acid tolerance in *Rhizobium*. *Soil Sci. Soc. Am. J.*: 48: 1273-1276.
- CUNNINGHAM, S.D. e D. MUNNS, 1984b. Effects of rhizobial extracellular polysaccharide on pH and Aluminium activity. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 48: 1276-1280.
- CHATEL, D., R. GREENWOOD e C.A. PARKER, 1968. Saprophytic competence as an important character in the selection of *Rhizobium* for inoculation. *Trans. of the 9th Int. Congr. Soil Sci.*, Adelaide, 2: 65-73.
- CHATEL, D.L. e C.A. PARKER, 1972. Inhibition of rhizobia by toxic soil-water extracts. *Soil Biol. Biochem.* 4: 289-294.

- CHOWDHURY, M.S., 1977. Effects of soil antagonists on symbiosis. In: VICENT, J.M., A.S. WHITNEY e J. BOSE (eds). *Exploiting the Legume Rhizobium Symbiosis in Tropical Agriculture*. Univ. of Hawai. p. 385-411.
- DAMIRGI, S.M. e H.W. JOHNSON, 1966. Effect of soil actinomycetes on strains of *Rhizobium japonicum*. *Agronomy Journal*, 58: 223-224.
- DANSO, S.K.A. e M. ALEXANDER, 1974. Survival of two strains of *Rhizobium* in soil. *Soil. Sci. Soc. Amer. Proc.* 38: 86-89.
- DART, P.I., 1981. Physiological factors affecting field nodulation and nitrogen fixation. Temperature and light. Specialist discussion. In: GIBSON, A.H. e W.E. NEWTON (eds). *Current Perspectives in Nitrogen Fixation*. Proceed. of the 4th Int. Symp. on Nitrogen Fixation. Canberra - Australia, p. 260-261.
- DATE, R.A., 1976. Principles of strain selection. In: NUTMAN; P.D. (ed.). *Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants*. Cambridge Univ. Press. p. 137.
- DATE, R.A. e R.J. ROUGHLEY, 1977. Preparation of legume seed inoculants. In: HARDY, R.W.F. e A.H. GIBSON (eds). *A Treatise on Dinitrogen Fixation. Section IV: Agronomy and Ecology*. John Wiley e Sons, Inc. N.Y. p. 243-275.
- DATE, R.A., 1981. Nodulation difficulties related to low PH. Specialist Discussion. In: GIBSON, A.J. e W.E. NEWTON (eds). *Current Perspectives in Nitrogen Fixation*. Proceed. of the 4th Int. Symp. on Nitrogen Fixation. Canberra. Australia, p. 261-262.

- DAZZO, F.B., C.A. NAPOLI e D.H. HUBBELL, 1976. Adsorption of bacteria to roots as related to host specificity in the *Rhizobium*: Clover association. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 168-171.
- DILWORTH, M.J., 1966. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. *Biochim. Biophys. Acta.* 127: 285-294.
- DÖBEREINER, J., A.A. FRANCO e I. GUZMAN, 1970. Estirpes de *Rhizobium japonicum* de excepcional eficiência. *Pesq. Agrop. Bras.*, (sêr agron), 5: 155-161.
- DÖBEREINER, J. e F.F. DUQUE, 1980. *Contribuição da pesquisa em fixação biológica do nitrogênio*. EMBRAPA/PFBN. Rio de Janeiro. 23 p. mimeo.
- DÖBEREINER, J., M.R.M.L. SCOTTI, N.M.H. SÁ e M.A.T. VARGAS, 1982. Resistance to streptomycin of *Rhizobium* isolates from Cerrado and Amazon Soils. In: GIBSON, A.H. e W.E. NEWTON (eds). *Current Perspectives in Nitrogen Fixation*. Proc. 4th Int. Symp. on Nitr.-Fix Canberra -Australia p. 434.
- DUQUE, F.F., M.C.P. NEVES, A.A. FRANCO, R.L. VICTÓRIA e R.M. BODDEY, 1985. The response of field grown *Phaseolus vulgaris* to *Rhizobium* inoculation and the quantification of N₂ fixation using ¹⁵N. *Plant and Soil.* 88: 333-343.
- ELEGBA, M.S. e R.J. RENNIE, 1984. Effect of different inoculant adhesive agents on rhizobial survival, nodulation and nitrogenase (acetylene reducing) activity of soybeans (*Glycine Max* (L.) Merril). *Canadian J. Soil Sci.*, 64: 631-636.
- ✕ FAIZAH, A.W., W.J. BROUGHTON e C.K. JOHN; 1980. Rhizobia in tropical legumes. XI. Survival in the seed environment. *Soil Biol. Biochem.* 12: 219-227.

- FONSECA, S.M. e S.M.T. SAITO, 1982.. Determinação da sobrevivência de *Rhizobium phaseoli* mutante em turfa comercial. Anais XI RELAR. Lima. Peru.
- FONSECA, S.M., S.M.T. SAITO e C. VIDOR, 1985. A vantagem dos mutantes resistentes à estreptomicina na competição e sobrevivência de *Rhizobium phaseoli* em turfa comercial. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 20(5): 609-614.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 1978. *Production Yearbook* 32: 33.
- FRANCO, A.A. e J. DÖBEREINER, 1961. Especificidade hospedeira na simbiose com *Rhizobium* - feijão e influência de diferentes nutrientes. *Pesq. Agrop. Bras.* 2: 467-474.
- FRANCO, A. e J.M.VINCENT, 1976. Competition among rizobial strains for the colonization and nodulation of two tropical legumes. *Plant and Soil*, 45: 27-48.
- FRED, E.B., J.L. BADWIN e E. McCOY, 1932. Root nodule bacteria and leguminous plants. *Wisconsin University Studies*, nº 5, 343 p.
- FREIRE, J.R.J. e C. VIDOR, 1970. A inoculação da soja com *Rhizobium*. In: *Simpósio Brasileiro da Soja*. Campinas, SP.
- FREIRE, J.R.J. e C. VIDOR, 1978. Fixação de nitrogênio pela simbiose *R. japonicum* • Soja. In: Miyasaka J. (ed). *A Soja no Brasil*.
- FREIRE, J.R.J. e J. KOLLING, 1986. Alguns tópicos sobre o manejo para a maximização da fixação do N₂ pela simbiose *Rhizobium*-Leguminosas. In: Anais XII RELAR, Campinas, SP, Brasil. Instituto Agronômico. p. 461-481.

- GAUR, Y.D. e W.L. LOWTHER, 1982. Competitiveness and persistence of introduced rhizobia on oversown clovers: influence of strain, inoculation rate and lime pelleting. *Soil Biol. Biochem.*, 14: 99-102.
- GEROSA, R.M.L., 1985. Influência do calcário e cobertura morta na competitividade e persistência da estirpe C05 e nas características da população nativa de *R. phaseoli*. Itaguaí Rio de Janeiro. Universidade Federal Rural Rio de Janeiro. 150 p. (Dissertação de Mestrado).
- GHAJ; B.S., I.S. KARIR e S.K. AGNIHOTRI, 1982. Competition of strains of *Rizobium* of the cowpea group in two soils. *Plant and Soil* 64: 251-253.
- GIBSON, A.H., R.A. DATE, J.A. IRELAND e J.BROCKWELL, 1976. A comparison of competitiveness and persistence amongst five strain of *Rhizobiu trifolii*. *Soil Biol. Biochem.*, 8: 395-401.
- GIBSON, A.H., 1981. Some required inputs from basic to applied nitrogen fixation research. In: GIBSON, A.H. e W.E. NEWTON (eds). *Current Perspectives in Nitrogen Fixation*. Canberra. Australia. p. 6-7.
- GRAHAM, P.H., G.C. OCAMPO, L.D. RUIZ e A. DUQUE, 1980. Survival of *Rhizobium phaseoli*. in contact with chemical seed protectants. *Agronomy Journal*, 72: 625-627.
- GRAHAM, P.H. e S.R. TEMPLE, 1984. Selection for improved nitrogen fixation in *Glycine max* (L.) Merril and *Phaseolus vulgaris* L. *Plant and Soil* 82: 315-327.
- GROSS, D.C. e A.K. VIDAVER, 1978. Bacteriocin-like substances produced by *Rhizobium japonicum* and other slow-growing Rhizobia. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36(6): 936-943.

- HABTE, M. e M. BARRION, 1984. Interaction of *Rhizobium* sp with toxin - producing fungus in culture medium and in tropical soil. *Appl. Environ Microbiol*, 47(5): 1080.
- HABTE, M., 1985. Selective medium for recovering specific populations of *Rhizobium* introduced into tropical soils, *Appl. Environ. Microbiol.* 50(6): 1553-1555.
- HALE, C.N., 1981. Methods of white clover inoculation. Their effect on competition for nodule formation between naturalized and inoculated strain of *Rhizobium trifolii*. *N.Z.J. of Exp. Agric.* 9: 169-172.
- HAM, G.E., 1980. Inoculation of legumes with *Rhizobium* in competition with naturalized strains. In: NEWTON, W.E. e W.H. ORME.- JOHNSON (eds) *Nitrogen Fixation Vol. II. Symbiotic Associations and Cyanobacteria*. Baltimore, Univ. Park. Press. p. 131-138.
- HAVELKA, V.D. e R.W.F. HARDY, 1976. Photosynthate as a major factor limiting nitrogen fixation by field grown legumes with emphasis on soybeans. In: NUTMAN, P.D. (ed). *Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants*. Cambridge. Cambridge University, Press. p. 421-439.
- HAWIRKO, R.Z., D.P. SINGH, R.T. NALECH e J.W. MICKERSON, 1981. Identification of strains of Rhizobia by bacteriocin production and sensitivity. *Proceeding 8^o North American Rhizobium Conference*. p. 442-444.
- HODGSON, A.L.M., W.P. ROBERTS e J.S. WAID, 1985. Regulated nodulation of *Trifolium subterraneum* inoculated with bacteriocin-producing strains of *Rhizobium trifolii*. *Soil Biol. Biochem.* 17: 475-478.

- HOSSAIN, A.K.M. e M. ALEXANDER, 1984. Enhancing soybean rhizosphere colonization by *Rhizobium japonicum*. *Appl Env. Microbiol.* 48: 468-472.
- HUNGRIA, M., 1981. Eficiência da fixação simbiótica do nitrogênio x evolução do H_2 x respiração dos nódulos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Piracicaba, ESALQ/USP, 190 p. (Dissertação de Mestrado).
- HUNGRIA, M., 1985. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em *Phaseolus vulgaris* L. Itaguai, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 292 p. (Tese de Doutorado).
- HUNGRIA, M., M.C.P. NEVES e R.L. VICTÓRIA, 1985a. Assimilação do nitrogênio pelo feijoeiro. I. Atividade da nitrogenase, de redutase do nitrato e transporte do nitrogênio na seiva do xilema. *R. bras. Ci. Solo.* 9: 193-200.
- HUNGRIA, M., M.C.P. NEVES e R.L. VICTÓRIA, 1985b. Assimilação do nitrogênio pelo feijoeiro. II. Absorção e translocação do N mineral e do N_2 fixado. *R. bras. Ci. Solo.* 9: 201-209.
- HUNGRIA, M., M.C.P. NEVES e J.I. SPRENT, 1986. Atividade de Nitrogenase, evolução de H_2 e transporte de nitrogênio em 5 cultivares de *P. vulgaris* inoculados em estirpes de eficiência diferente na fixação de nitrogênio. *Anais XII RELAR.* Campinas, SP, Brasil. pag. 563.
- HUNGRIA, M. e M.C.P. NEVES, 1986. Interação entre cultivares de *Phaseolus vulgaris* e estirpes de *Rhizobium phaseoli* na fixação e transporte de nitrogênio. *Pesq. Agrop. Bras.* 21(2): 127-140.
- IBGE, 1983. Anuário estatístico do Brasil. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, R.J., 987 p.

- IRELAND, J.A. e J.M. VINCENT, 1968. A quantitative study of competition for nodule formation. *Trans. Int. Congr. Soil Sci.* Adelaide. 2: 85-93.
- JANSEN van RENSBURG, H. e B.W. STRIDJOM, 1982. Competitive abilities of *Rhizobium meliloti* strains considered to have potential as inoculants. *Appl. Env. Microbiol.* 44: 98-106.
- JONES, R. e I. GIDDENS, 1984. Introduction of effective N₂ fixing rhizobial strains in the soybean plant by use of fungicide resistance. *Agronomy Journal.* 76: 599-602.
- JOHNSON, L.F., E.A. CURL, J.H. BOND e H.A. FRIBOURG, 1959. Methods for Studing Soil Microflora. *Plant Disease Relationships.* Burgess. Minneapolis.
- JOHNSTON, A.W.B. e I.E. BERINGER; 1976. Mixed inoculation with effective and ineffective strains of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Appl. Bact.*, 40: 375-380.
- JOSEPH, M.V., J.D. DESAI e A.J. DESAI, 1985. Possible involmnet of phase-like structures in antagonism of cowpea rhizobia by *Rhizobium trifolii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49: 459-461.
- JOSEPHSON, K.L. e I.L. PEPPER, 1984. Competitiveness and effectiveness of strains of *Rhizobium phaseoli* isolated from the Sonoran desert. *Soil. Biol. Biochem.*, 16: 651-655.
- KOSSLAK, R.M. e B.B. BOHLOOL, 1984. Suppression of nodule development of one side of a split-root-system of soybeans caused by prior inoculation of the other side. *Plant Physiol*, 75: 125-130.

- KOSSLAK, R.M. e B.B. BOHLOOL, 1985. Influence of environmental factors on interstrain competition in *Rhizobium japonicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49(5): 1128-1133.
- KÖLLING, J., J.R.J. FREIRE, J.S. PEREIRA e I.G. KÖLLING, 1986. Resposta da soja à inoculação com níveis de inóculo e ocorrência de serogrupos de *Rhizobium japonicum* em solo com população estabelecida. *Anais XII RELAR*. Campinas, SP - Brasil. Outubro, 1984 p. 358.
- LABANDERA, C. e J.M. VINCENT, 1975. Loss of symbiotic capacity in commercially useful strains of *Rhizobium trifolii*. *J. Appl. Bact.* 39: 209-211.
- LABANDERA, C., A. BARAIBAR e A. MILIAN, 1982. Calidad de inoculantes en la distribución. *Anais XI RELAR* - Lima - Peru.
- LABANDERA, C.A., 1986. Producción y uso de inoculantes para leguminosas. In: *Anais XII RELAR*, Campinas, SP, Brasil. Instituto Agronômico, p. 502-511.
- LENNOX, L.B. e M. ALEXANDER, 1981. Fungicide enhancement of nitrogen fixation and colonization of *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium phaseoli*. *Appl. Environ. Microb.* 41: 404-411.
- LEVIN, R.A. e M.P. MONTGOMERY, 1974. Symbiotic effectiveness of antibiotic resistant mutants of *Rhizobium japonicum*. *Plant and Soil.* 41: 669-676.
- LI, D. e D.H. HUBDELL, 1969. Infection thread formation as a basis of nodulation specificity in the *Rhizobium* - Strawberry Clover Associations. (*Can. J. Microbiol.* 15: 1133-1136).

- LIE, T.A., 1974. Environmental factors on nodulation and symbiotic nitrogen fixation. In: QUISPEL, A. (ed). *The Biology of Nitrogen Fixation*. North Holland Publ. Co. Amsterdam. The Netherlands. p. 555-582.
- LOPES, E.S., A.R. GIARDINI, M.L.C. OLIVERA, 1976. Especificidade hospedeira e pré-seleção de estirpes de *Rhizobium phaseolis* para as cultivares Moruna, Carioca, Piralã e Goiana - precoce de feijão (*Phaseolus vulgaris*). *Anais VIII RELAR*. Cali - Colombia. p. 24.
- LOPES, E.S. e A.R. GIARDINI, 1977. Sobrevivência de *Rhizobium phaseoli* em turfa esterilizada. *Bragantia* 36:
- LOVATO, P.E., J.C. PEREIRA e C. VIDOR, 1985. Flutuação populacional de estirpes de *Rhizobium phaseoli* na rizosfera de feijão. *R. bras. Ci. Solo.* 9: 211-218.
- MAHLER, L.R. e A.G. WOLLUM, II, 1980. Influence of water potential on the survival of Rhizobia in a Goldsboro laomy sand. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 14: 988-992.
- MALLIK, M.A.B. e K. TESFAI, 1985. Pesticidal effect on soybean - rhizobia symbiosis. *Plant and Soil*, 85: 33-41.
- MANGUIATT, J., F.G. TORRES e S.N. TILO, 1981. Preinoculation seeds with Rhizobia. *Phil. Agron. U.P. Los Baños*. 64(2): 113-124.
- MARQUES PINTO, C.; P.V. YÃO e J.M. VINCENT, 1974. Nodulation competitiveness amongst strains of *Rhizobium meliloti* e *Rhizobium trifolii*. *Aust. J. Agric. Res.*, 25: 317-329.
- MARTYNUICK, S. e G.M. WAGNER, 1978. Quantitative and qualitative examination of soil microflora associated with different management systems. *Soil Sci.* 125(6): 343-350.

- MARY, P., D. OCHIN e R. TAILLIEZ, 1985. Rates of drying and survival of *Rhizobium meliloti* strains during storage at different relative humidities. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 207-211.
- MASTERSON, C.L. e P.M. MURPHY, 1980. The acetylene reduction technique. In: SUBBA RAO, N.S. (ed.) *Recent Advances in Nitrogen Fixation*. Londres. E. Arnold. p. 8-33.
- MATERON, L.A. e C. HAGEDORN, 1982. Competitiveness of *Rhizobium trifolii* strains associated with red clover (*Trifolium pratense*) in mississippi soils. *Appl. Environ. Microb.* 44: 1096-1101.
- McKNIGHT, T., 1949. Efficiency of isolates of *Rhizobium* in the cowpea group with proposed additions to this group. *Qld. J. Agric. Sci.* Brisbane. 6: 61-76.
- McLOUGHLIN, e L.K. DUNICAN, 1985. Competition studies with *Rhizobium trifolii* in laboratory experiments. *Plant and Soil*, 88: 139-143.
- MEADE, J., P. HIGGINS e F. O'GARA, 1985. Studies on the inoculation and competitiveness of a *Rhizobium leguminosarum* strain in soil containing indigenous rhizobia. *Appl. Environ. Microb.*, 49: 899-903.
- MINCHIN, F.R., J.F. WITTY, J.E. SHEENY e M. MULLER, 1983. A major error in the acetylene reduction assay: Decreases in nodular nitrogenase activity under assay conditions. *J. Exp. Bot.* 34: 641-649.
- MOAWAD, H.A., W.R. ELLIS e E.L. SCHMIDT, 1984. Rhizosphere responses as a factor in competition among three serogroups of indigenous *Rhizobium japonicum* for nodulation of field-grown soybeans. *Appl. Environ. Microbiol.* 47(1): 607-612.

- MOAWAD, H. E B.B. BOHLOOL, 1984. Competition among *Rhizobium* spp for nodulation of *Leucaena leucacephala* in two tropical soil. *Appl. Environ. Microb.*, 48: 5-9.
- MORETTI, V.L. e S.M.T. SAITO, 1978. Crescimento e sobrevivência de *Rhizobium phaseoli* em torta de filtro de cana, "peat-moss" e turfa comercial. *O Solo*, 70(1): 44-48.
- MUNÉVAR, F. e A.G. WOLLUM II, 1981. The legume *Rhizobium* association as affected by high root temperature. In: GRAHAM, P.H. e S.C. HARRIS (eds). *Biological Nitrogen Fixation Technology for Tropical Agriculture*. CIAT. Cali - Colombia. p. 173-182.
- NEVES, M.C.P., A.D. DIDONET, F.F. DUQUE e J. DÖBEREINER 1985. *Rhizobium* strains effects on nitrogen transport and distribution in soybeans. *J. Exp. Bot.* 36: 1179-1192.
- NEVES, M.C.P., 1986. Manejo da FBN. Efeitos de estirpes de *Rhizobium*. *Anais. XII RELAR*. Campinas, SP - Brasil. Outubro. p. 485-488.
- NORRIS, D.O., 1971. Seed pelleting to improve nodulation of tropical legumes. III. A field evaluation of inoculant survival under lime and rock phosphate pellet on *Dolichos lablab*. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.*, 11: 677-683.
- NUTMAN, P.S., 1981. Hereditary host factors affecting nodulation and nitrogen fixation. In: GIBSON, A.H. e W. E. NEWTON (eds.). *Current Perspectives in Nitrogen Fixation*. Proceed of the 4th Int. Symp. Nitrogen Fixation. Canberra. Australia. p. 194-204.
- ODEYEMI, O. e M. ALEXANDER, 1977. Use of fungicide - resistant rhizobia for legume inoculation. *Soil. Biol. Biochem.*, 9: 247-251.

- OLIVERA, L.A. e C. VIDOR, 1984a. Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* em soja. II. Capacidade competitiva por sítios de nódulos. *R. bras. Ci. Solo.* 8: 43-47.
- OLIVERA, L.A. e C. VIDOR, 1984b. Capacidade competitiva de estirpes de *Rhizobium phaseoli* em solos com alta população deste *Rhizobium*. *R. bras. Ci. Solo.* 8: 49-55.
- OLIVERA, L.A. e C. VIDOR, 1984c. Colonização, Sobrevivência e Competitividade de estirpes de *Rhizobium japonicum*. *R. bras. C. Solo.* 8: 57-62.
- OSA - AFIANA, L.O. e M. ALEXANDER, 1982. Clays and the survival of *Rhizobium* in the soil during desiccation. *Soil Sci. soc. Am. J.*, 46(2): 285-288.
- PACOVSKY, R.S., H.G. BAYNE e G.J. BETHLENFALVAY, 1984. Symbiotic interactions between strains of *Rhizobium phaseoli* and cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. *Crop Sci.* 24: 101-105.
- PANKHURST, C.E., 1977. Symbiotic effectiveness of antibiotic resistant mutants of fast and slow growing strains of *Rhizobium* nodulating *Lotus* species. *Can. J. Microbiol.*, 23: 1026-1033.
- PANKHURST, C.E., 1981. Effect of plant nutrient supply on nodule effectiveness and *Rhizobium* strain competition for nodulation of *Lotus pedunculatus*. *Plant and Soil.* 60: 325-339.
- PARKER, C.A. e P.L. GROVE, 1970. *Bdellovibrio gacteriovorus* parasiting. *Rhizobium* in Western Australia. *J. Appl. Bact.* 33: 253-255.
- PARKER, F.E. e J.M. VINCENT, 1981. Steritization of peat by gamma radiation. *Plant and Soil.* 61: 285-294.

- PARKER, C.A. e D.L. CHATEL, 1982. Factors determining success or failure in legume establishment. In: VINCENT; J.M. (ed). *Nitrogen Fixation in Legumes*. Acad. Press. Australia. 14: 145-153.
- PATEL, J.J., 1974. Antagonism of actinomycetes against rhizobia. *Plant and Soil*, 41: 395-402.
- PEREIRA; J.C., 1983. Obtenção e avaliação de mutantes espontâneos de *Rhizobium phaseoli* resistentes a antibióticos e fungicidas. Porto Alegre, UFRGS. 88 p. (Dissertação de Mestrado).
- PERES, J.R.R. e C. VIDOR, 1980a. Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* e competitividade por sítios de infecção nodular em cultivares de soja (*Glyxine max* L. Merril). *Agron. Sulriograndense* (Porto Alegre) 16(2): 205-219.
- PERES, J.R.R. e C. VIDOR, 1980b. Relação entre concentração de células no inoculante e competição por sítios de infecção nodular entre estirpes de *Rhizobium japonicum* em soja. *R. bras. Ci. Solo*. 4: 139-143.
- PERES, J.R.R., M.A.T. VARGAS e A.R. SUHET, 1984. Variabilidade na eficiência em fixar nitrogênio entre isolados de uma mesma estirpe de *Rhizobium japonicum*. *R. bras. Ci. Solo*, 8: 193-196.
- PERES, J.R.R. e A.R. SUHET, 1986. Relações de especificidade na fixação de N₂. *Anais XII RELAR*, Campinas, SP, Brasil. p. 445-460.
- PITARD, R.M., R.M. BODDEY e J. DÖBEREINER, 1982. Efeito de actinomicetos e de estreptomomicina na nodulação de *Phaseolus vulgaris*. *Anais 1^a Renafe*, Giânia, Goiás, p. 313-315.

- PUEPPKE, S.G., W.D. BAUER, K. KEEGSTRA, A.L. FERGUSON, 1978. Role of lectin in plant-microorganism interactions. II. Distribution of soybean lectin in tissues of *Glycine max* (L.) Merril. *Plant Physiol.*, Rockville, 61: 779-784.
- RAMIREZ, C e M. ALEXANDER, 1980. Evidence suggesting protozoan predation on *Rhizobium* associated with germinating seeds and in the rhizosphere of beans (*Phaseolus vulgaris*, L.). *Appl. Env. Microbiology*, 40: 492-499.
- RANDRUP, R.G., 1981. Parâmetros e técnicas de caracterização dos materiais a serem empregados como suporte de inoculantes. *Anais Simposio Brasileiro de Pesquisa em Soja*, Vol. II. EMBRAPA. 16 a 21 janeiro. p. 685-782.
- RENNIE; R.J. e G.A. KEMP, 1980. Dinitrogen fixation in pea beans (*Phaseolus vulgaris*, L.) as affected by growth stage and temperature regime. *Can. J. Bot.* 58:
- REYES, V.G. e E.L. SCHMIDT, 1981. Population of *Rhizobium japonicum* associated of soil-grown roots. *Plant and Soil*, 61: 71-80.
- RICE, W.A., D.C. PENNY e M. NYBORG, 1977. Effects of soil acidity on rhizobia numbers, nodulation and nitrogen fixation by alfalfa and red clover. *Can. J. Soil Sci.* 57: 197-203.
- ROBERT, F.M. e E.L. SCHMIDT, 1983. Population changes and persistence of *R. phaseoli* in soil and rizospheres. *Appl. Environ. Microbiol.* 45(2): 550-556.
- ROBINSON, A.C., 1969. Competition between effective and ineffective strains of *Rhizobium trifolii* in the nodulation of *Trifolium subterraneum*. *Aust. J. Agric. Res.*, 20: 827-841.

- RODRIGUEZ, J.J., 1984. Isolamento e caracterização de variantes de *Rhizobium phaseoli*. Porto Alegre, Universidade Federal Rio Gde. do Sul. 86 p. (Dissertação de Mestrado).
- ROSCLYCKY, E.B., 1967. Bacteriocin production in the *Rhizobia* bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 13: 431-433.
- ROUGHLEY, R.J. e J.M. VINCENT, 1967. Growth and survival of *Rhizobium spp* in peat culture. *J. Appl. Bacteriol.*, 30: 362-376.
- ROUGHLEY, R.J., 1970. Preparation and use of legume seed inoculant. *Plant and Soil*. Special Volume, 32: 675-701.
- ROUGHLEY, R.J., 1975. The production of high quality inoculants and their contribution legume yield. In: NUTMAN, P.S. (ed.). *Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants*. I.B.P. Cambridge University Press. Cambridge. vol. 7. p. 125-136.
- ROUGHLEY, R.J., W.M. BLOWES e D.F. HERRIDGE, 1976. Nodulation of *Trifolium subterraneum* by introduced *Rhizobium* in competition with naturalized strains. *Soil Biol. Biochem.* 8: 403-407.
- ROUGHLEY, R.J., P.S. NUTMAN e M.R. CHANDLER, 1981. Effect of host plant selection and temperature on the structure of root nodules of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Plant and Soil* 61 113-124.
- ROVIRA, A.D., 1965. Interactions between plant roots and soil microorganisms. *Annual Review of Microbiology*, 19: 241-266.

- RUIZ ARGUESO, J., J. SANTAMARIA, C. LABANDERA e R. ORIBE, 1979. Crecimiento y sobrevivencia de *Rhizobium japonicum* CB 1809 y *Rhizobium trifolii* WU 290 en turbas españolas de diferentes origenes. *Anuales del Inst. Nac. de Inv. Agr. Prod. Veg.* 11:8.
- RUSCHEL, A.P. e S.M.T. SAITO, 1977. Efeito da inoculação de *Rhizobium*, nitrogênio e matéria orgânica na fixação de nitrogênio em feijão (*Phaseolus vulgaris* (L.)). *R. Bras. Ci. Solo.* 1: 21-24.
- RUSCHEL, A.P., S.M.T. SAITO e A. TULMAN NETO, 1979. Eficiência da inoculação de *Rhizobium* em *Phaseolus vulgaris*. L. I. Efeito de fontes de nitrogênio e cultivares. *R. bras. Ci. Solo.* 3: 13-17.
- RUSCHEL, A.P., P.B. VOSE, E. MATSUI, R.L. VICTÓRIA e S.M.T. SAITO, 1982. Field evaluation of N₂ fixation and nitrogen utilization by *Phaseolus* bean varieties determined by ¹⁵N isotope dilution. *Plant and Soil* 65: 397-407.
- SÁ, N.M.H., M.R.M.L. SCOTTI, M.A.T. VARGAS e J. DÖBEREINER, 1983. Resistência natural à estreptomicina e eficiência das estirpes de *Rhizobium* nativas nos cerrados associadas a *Stylosanthes*. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 18(3): 213-218.
- SAITO, S.M.T. e A.P. RUSCHEL, 1976. Comportamento de estirpes de *Rhizobium phaseoli* inoculadas em cinco variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) em condições normais de cultivo. *VIII RELAR*, Cali, Colombia, 28 p.
- SAITO, S.M.T., E.C.S. MARTINS, J.R. DE FREITAS e A.J. ROSTON, 1983. Ocorrência natural de micorriza e *Rhizobium phaseoli* em áreas com feijoeiro. *Pesq. agropec. bras.* Brasília, 18 (8): 855-861.

- SAITO, S.M.T. e E.J.B.N. CARDOSO, 1977. Seleção de estirpes de *Rhizobium phaseoli* para o feijoeiro cultivar Carioca. *O Solo*. Ano LXIX. 1: 44-47.
- SAITO, S.M.T., V.M. ZAIA e A.P. RUSCHEL, 1978. Efficiency of N_2 -fixation of *R. phaseoli* strains inoculated in the bean cultivar Venezuela-350. *Ann. Report of the bean improvement cooperative*.
- SAITO, S.M.T. e A.P. RUSCHEL, 1980. Capacidade competitiva e de sobrevivência no solo de uma estirpe de *Rhizobium phaseoli* usada como inoculante. *Ciência e Cultura*. 32: 888-892.
- SAITO, S.M.T., E. MATSUI e E. SALATI, 1980. $^{15}N_2$ fixation, H_2 evolution and C_2H_2 reduction relationships in *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum*. 49: 37-42.
- SAITO, S.M.T. e J.R. FREITAS, 1982. Eficiência e especificidade hospedeira de *Rhizobium phaseoli* em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). *O Solo*. Ano LXXIV - nº 1 e 2, p. 71-75.
- SAITO, S.M.T., 1982. Avaliação em campo da capacidade de fixação simbiótica de estirpes de *Rhizobium phaseoli*. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 17(7): 999-1006.
- SAITO, S.M.T., E.C.S. MARTINS, J.R. FREITAS e A.J. ROSTON, 1982. Levantamento da presença de micorriza e *Rhizobium phaseoli* naturalmente estabelecidos em áreas com feijoeiro. *1ª RENAFE*, Goiânia-Goiás, p. 320-322.
- SAITO, S.M.T., J.M. ARAUJO, A. BARAIBAR e L.V. GALLI, 1985. Survival of *Rhizobium* in the carrier. Trabalho apresentado na Reunião de Inoculantes para *Rhizobium*-Leguminosas. 22-25, outubro, Porto Alegre, RS, Brazil.

- SALEMA, M.P., C.A. PARKER, D.K. KIDBY, D.L. CHATEL e T.M. ARMITAGE, 1982. Rupture of nodula bacteria on drying and rehydration. *Soil Biol. Biochem.* 14: 15-22.
- SARRUGE, J.R. e H.P. HAAG, 1974. Análises químicas em plantas. Piracicaba, ESALQ/USP, 27 p. mimeo.
- SCOTTI, M.R.M.L., M.A.T. VARGAS e J. DÖBEREINER, 1981. Susceptibility of *Rhizobium* strains to antibiotics; a possible reason for legume failure in Cerrado soil. In: GRAHAM, P. e S.C. HARRIS (eds.). *Biological Nitrogen Fixation for Tropical Agriculture*. CIAT. p. 195-200.
- SCHÖLLHORN, R. e R.H. BURRIS, 1967. Acetylene as a competitive inhibitor of N₂ fixation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 58: 213-216.
- SCHUBERT, K.R. e H.J. EVANS, 1977. The relation between hydrogen reactions to nitrogen fixation in nodulated symbionts. In: NEWTON, W., J.R. POSTGATE e C. RODRIGUEZ-BARUECO (eds.). *Recent Developments in Nitrogen Fixation*. Londres Academic Press. p. 469-489.
- SCHWINGHAMER, E.A. e D.J. REINHART, 1963. Lysogeny in *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. *Aust. J. Biol. Sci.* 16: 597-605.
- SCHWINGHAMER, E.A. e R.P. BELKENGREN, 1968. Inhibition of rhizobia by a strain of *Rhizobium trifolii*: some properties of the antibiotic and of the strains. *Arch. Mikrobiol.*, 64: 130-145.
- SCHWINGHAMER, E.A., 1971. Antagonism between strain of *Rhizobium trifolii* in culture. *Soil Biol. Biochem.*, 3: 355-363.

- SCHWINGHAMER, E.A., 1975. Properties of some bacteriocins produced by *Rhizobium trifolii*. *Journal of General Microbiology*, 91: 403-413.
- SCHWINGHAMER, E.A. e J. BROCKWELL, 1978. Competitive advantage of bacteriocin and phage-producing strains of *Rhizobium trifolii* in mixed culture. *Soil Biol. Biochem.* 10: 383-387.
- SICARDI, M., C. LABANDERA e C. BATTYANY, 1969. Control y sobrevivência de *Rhizobium* en los inoculantes uruguayos. *Anais V RELAR*, Rio de Janeiro, Brasil, p. 332-345.
- SINCLAIR, M.J. e A.R.J. EAGLESHMAN, 1984. Intrinsic antibiotic resistance in relation to colony morphology in three populations of West African cowpea rhizobia. *Soil Biol. Biochem.*, 16(3): 247-251.
- SKRLEDTA, V. e J. KARIMOVA, 1969. Competition between two somatic serotypes of *Rhizobium japonicum* used as double strain inocula in varying proportions. *Arch. Microbiol.* Berlin, 66: 25-28.
- SOMASEGARAN, P., P. REYES e H.J. HOBEN, 1984. The influence of high temperatures on the growth and survival of *Rhizobium spp* in peat inoculants during preparation, storage and distribution. *Can. J. Microbiol.* 30: 23-30.
- SOMASEGARAN, P., 1985. Inoculant production with diluted liquid cultures of *Rhizobium spp* and autoclaved peats evaluation of diluents. *Rhizobium spp, peats, sterility requirements, storage, and plant effectiveness. Appl. Environ. Microb.*, 50: 398-405.

- STACEY, G., A.S. PAU e W.J. BRILL, 1980. Host recognition in the *Rhizobium*-soybean symbiosis. *Plant Physiol.* 66: 609-614.
- STRIDJOM, B.W. e H.J. VAN RENSBURG, 1981. Effect of steam sterilization and gamma irradiation of peat on quality of *Rhizobium* inoculants. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 1344-1347.
- TICHY, H.V. e W. LOTZ, 1981. Plasmids and bacteriocins production in newly isolated strains of *Rhizobium leguminosarum*. *Proc. 8th Nort American Rhizobium Conference*, p. 150-151.
- THOMPSON, J.A., 1980. Production and quality control of legume inoculants. In: BERGERSEN, F.J. (ed.). *Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation*, John Wiley e Sons, Inc., N.Y. p. 489-533.
- THORNTON, F.C. e C.B. DAVEY, 1984. Saprophytic competence of acid tolerance strains of *Rhizobium trifolii* in acid soil. *Plant and soil*, 80: 337-344.
- TRINICK, M.J. e C.A. PARKER, 1982. Self inhibition of rhizobial strains and the influence of cultural conditions on microbial interactions. *Soil Biol. Biochem.* 14: 79-86.
- TRINICK, M.J., 1982. Competition between Rhizobial strains for nodulation. In: VINCENT, J.M. (ed.). *Nitrogen Fixation in Legumes*. Academic Press. p. 229-238.
- TRUJILLO, G. e J.R.J. FREIRE, 1986. Efeito de inóculos múltiplos sobre fixação de nitrogênio em *Phaseolus vulgaris* L. *Anais XII RELAR*. Campinas Brasil - Outubro 1984 p. 167-170.

- URBANA, C.M., A. JUNQUEIRA NETO e M.A. de SOUZA, 1982. Compatibilidade de estirpes de *Rhizobium phaseoli* com fungicidas, antibiótico e nitrogênio e seus efeitos na fixação simbiótica e produção do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). *Anais 1ª RENAFE*. Goiânia. Goiás. Brasil. p. 322-323.
- VALARINI, M.I., 1981. Aspectos genéticos e ecológicos em espécies de *Rhizobium*. Piracicaba, ESALQ/USP, 92 p. (Dissertação de Mestrado).
- van SCHREVEAN, D.A., 1970. Some factors affecting growth and survival of *Rhizobium* spp in soil peat cultures. *Plant and Soil*. 32: 113-130.
- van RENSBURG, H.J. e B.W. STRIDJOM, 1980. Survival of fast and slow-growing *Rhizobium* spp under conditions of relatively mild desiccation. *Soil Biol. Biochem.*, 12: 353-356.
- van RENSBURG, H.J. e B.W. STRIDJOM, 1985. Effectiveness of *Rhizobium* strains used in inoculants after their introduction into soil. *Appl. Environ. Microb.*, 49(1): 127-131.
- VIDOR, C., 1977. Studies of saprophytic competence in strains of *R. japonicum* (Kirchner) Buchanan. Tese de Doutorado. Ohio State University Columbus, OH. USA. 189 p. mimeo.
- VIDOR, C., E. BROSE e J.S. PEREIRA, 1979. Competição por sítios de infecção nodular entre estirpes de *R. japonicum* em culturas de soja (*Glycine max* L. Merr.). *Agronomia Sulriograndense* 15(2): 227-238.
- VIDOR, C. e R.H. MILLER; 1980. Relative saprophytic competence of *Rhizobium japonicum* strains in soils as determined by the quantitative fluorescent antibody technique (F.A.). *Soil Biol. Bioch.* 12:483-487.

- VIDOR, C., 1981. Microbial constraints to legume symbiosis. In: GRAHAM, P. e S. HARRIS (eds.). *BNF Technology for Tropical Agriculture*. CIAT. p. 183-194.
- VINCENT, J.M., 1956. Principles of strain selection. *Proc. VII Int. Grass Congr.* n^o2 p. 179-189.
- VINCENT, J.M., 1970. *Manual of the practical study of root nodule bacteria*. Intern. Biol. Program. Handbook n^o 15. Oxford. Blackwell. 163 p.
- VINCENT, J.M., 1974. Root nodule symbiosis with *Rhizobium*. In: QUISPEL, A. (ed). *The Biology of Nitrogen Fixation*. Amsterdam, North-Holland, p. 265-341.
- VINCENT, J.E. e M.S. SCOTT, 1982. Evaluation of inoculant viability on commercially inoculated legume seed. *Agronomy Journal*, 74: 921-923.
- VOSS, M., J.R.J. FREIRE e P.A. SELBACH, 1983. Potencial de fixação de N₂ de estirpes de *Rhizobium phaseoli* de regiões produtoras de feijão no estado do Rio Grande do Sul. *R. Bras. Ci. Solo.* 7: 203-207.
- WEAVER, R.W. e L.R. FREDERICK, 1974. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max* L. Merrill II. Field studies. *Agr. J.* 66: 233-236.
- WINARNO, R. e T.A. LIE, 1979. Competition between *Rhizobium* strains in nodule formation: interaction between nodulating and non nodulating strains. *Plant and Soil.* 51: 135-142.
- WILLIAMS, P.M., 1982. The isolation of effective and ineffective mutants of cowpea *Rhizobium*. *Plant and Soil* 60: 349-356.