

ANÁLISE DA INTERAÇÃO *Rhizobium tropici*-FEIJOEIRO
(*Phaseolus vulgaris* L.): USO DA ESTIRPE CM-255 *Gus*⁺

CÍLSON CÉSAR FAGIANI

Biólogo

Orientadora: Profa. Dra. Siu Mui Tsai

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: Microbiologia Agrícola.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Maio - 1995

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS "LUIZ DE QUEIROZ" /USP

Fagiani, Cílon César

Análise da interação *Rhizobium tropici*-FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris*
L.): uso da estirpe CM-255 *Gus+*. Piracicaba, 1995.
69p. ilus.

Diss. (Mestre) - ESALQ

Bibliografia.

1. Bactéria fixadora de nitrogênio 2. Feijão - Inoculação I. Escola
Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 635.652

ANÁLISE DA INTERAÇÃO *Rhizobium tropici*-FEIJOEIRO
(*Phaseolus vulgaris* L.): USO DA ESTIRPE CM-255 *Gus*⁺

CÍLSON CÉSAR FAGIANI

Aprovada em 29/06/1995.

Comissão Julgadora :

Dra. Siu Mui Tsai

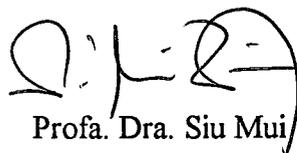
CENA/USP

Dr. Luís Eduardo Aranha Camargo

ESALQ/USP

Dra. Beatriz M. J. Mendes

CENA/USP



Prof. Dra. Siu Mui/Tsai

Orientadora

**aos meus pais Jarmir e Paschoalina,
e em especial à minha esposa Fabiane,**

dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de alguma forma, colaboraram na execução deste trabalho. Entre eles:

- à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz ", pela oportunidade de realização do curso de Mestrado;
- em especial à Professora Siu Mui Tsai pela orientação, pelas sugestões e pelo apoio constante na condução dos trabalhos;
- ao Centro de Energia Nuclear na Agriocultura (CENA), em nome de todos os funcionários do laboratório de Microbiologia/Biologia Molecular: David, Elias, Francisco, Odair e Mário, pela amizade e ajuda durante a realização dos experimentos, e da biblioteca: Marília, Elsie e Marta, pela ajuda nas buscas bibliográficas e correções das referências bibliográficas;
- à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro;
- aos Professores Itamar Soares de Melo e Pedro José Valarini, pelo incentivo a pesquisa;
- aos meus pais Jarmir Antonio Fagiani e Paschoalina Gianoni Fagiani, pela formação de bons costumes e educação;
- à minha esposa Fabiane Santana Previtali, pelo estímulo, carinho, compreensão e amizade;
- aos professores do curso de Pós-graduação da ESALQ/USP, pela formação acadêmica.

- SUMÁRIO -

RESUMO.....	vii
SUMMARY	ix
1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 - Taxonomia do rizóbio e origem do feijoeiro.....	3
2.2 - Eficiência da interação simbiótica rizóbio-feijoeiro.....	5
2.3 - Outros fatores que influenciam a interação simbiótica rizóbio- feijoeiro	8
2.4 - Identificação do rizóbio após inoculação.....	13
3 - MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 - Conjugação para introdução de marcador genético e monitoramento da infecção nodular pela estirpe marcada	17
3.1.1 - Obtenção de transconjugantes	17
3.1.2 - Eficiência simbiótica	18
3.1.3 - Nitrogênio mineral e FBN	19
3.2 - Eficiência das estirpes em interação com variedades de feijão de diferentes origens evolutivas.....	20
3.3 - Eficiência simbiótica da estirpe CM-255 Gus ⁺ no solo.....	21
3.3.1 - Eficiência simbiótica em solo natural	21
3.3.2 - Eficiência simbiótica em solo adubado	22

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1 - Conjugação para introdução de marcador genético e monitoramento da infecção nodular pela estirpe marcada.....	23
4.1.1 - Obtenção de transconjugantes	23
4.1.2 - Eficiência simbiótica	25
4.1.3 - Nitrogênio mineral e FBN	27
4.2 -Eficiência das estirpes em interação com variedades de feijão de diferentes origens evolutivas.....	30
4.3 - Eficiência simbiótica da estirpe CM-255 Gus ⁺ no solo	36
4.3.1 - Eficiência simbiótica em solo natural	36
4.3.2 - Eficiência simbiótica em solo adubado	41
5 - CONCLUSÕES	53
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
APÊNDICE	66

**ANÁLISE DA INTERAÇÃO *Rhizobium tropici*-FEIJOEIRO
(*Phaseolus vulgaris* L.): USO DA ESTIRPE CM-255 *Gus*⁺**

Autor: CÍLSON CÉSAR FAGIANI

Orientadora: Dra. SIU MUI TSAI

RESUMO

Na região de Cunha do Estado de São Paulo, encontramos um cultivo de feijão de baixa tecnologia, porém de elevada importância econômica para a região. A cultura tem sido cultivada tanto nas áreas de baixada quanto nas áreas mais declivosas, onde os solos são predominantemente ácidos e de baixa fertilidade, com uma alta adaptabilidade da cultura às mais variadas condições climáticas e de solo encontradas nessa região. Nessas áreas, o cultivo tem sido de subsistência, pois além da produção de grãos, o feijoeiro nesses declives tem sido cultivado para enriquecimento de N do solo para a cultura subsequente, geralmente o milho. Mas, devido à não utilização de insumos básicos, tais como a adubação e calagem, a produtividade tem sido extremamente baixa. Essa baixa produção tem acarretado alta exposição do solo, com riscos reais de erosão. A recomendação de insumos nesse sistema produtivo seria um passo importante para a sua melhoria.

Adubação (macro e micronutrientes), calagem e inoculação com estirpe selecionada de *Rhizobium* foram consideradas neste trabalho, os principais fatores que podem incrementar a produção do feijoeiro. Utilizando-se de estirpe selecionada de *R. tropici* (CM-255), tolerante a solos ácidos (pH 4,5) e com hidrogenase ativa (*Hup*⁺), avaliou-se em casa-de-vegetação a contribuição da inoculação dessa estirpe em variedades de feijoeiro, comerciais e de uso regional, cultivadas em solo ácido de Cunha,

com ou sem uma adubação básica (sem N) ou calagem. A estirpe, geneticamente marcada para a metabolização dos substratos isopropil-*B*-D-tiogalactopiranosidina (IPTG) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil-glucuronidina (X-Gluc), foi submetida a testes de eficiência simbiótica, e comparada com outras estirpes, quanto à capacidade de formar nódulos, atividade de redução de acetileno, matéria seca e nitrogênio acumulado da parte aérea em variedades de feijoeiro provenientes de diferentes centros de origem. Avaliou-se também a capacidade competitiva da estirpe CM-255 *Hup*⁺*Gus*⁺ em relação a uma estirpe de *R. etli* - CNPAF-512, inoculados numa variedade elite para nodulação - Puebla-152, cultivada em vasos previamente esterilizados, contendo vermiculita e solução nutritiva. O efeito do N-mineral na nodulação e no crescimento das plantas foi estudado nessa variedade, de origem mesoamericana, e em outras duas - Cargamanto (origem andina) e G12873 (selvagem mesoamericana). Estímulos no desenvolvimento de nódulos ocorreram a doses baixas de N (1 mM) e completa inibição a partir de 6 mM, nas três variedades estudadas.

Os resultados dos testes no solo demonstraram que a estirpe CM-255 *Hup*⁺*Gus*⁺ apresentou elevada capacidade de ocupação dos sítios de infecção nodular nas raízes, em interação com cinco variedades de feijoeiro - Carioca-80, Serro Azul, Negro Argel, Jalo EEP558 e Rajadão. A adubação PKS + micronutrientes, assim como a calagem foram essenciais para um melhor estabelecimento da nodulação e fixação de N₂ pela estirpe introduzida, cuja prevalência nos nódulos radiculares foi comprovada com a identificação dos nódulos azuis em presença dos substratos X-Gluc e IPTG.

A variedade Serro Azul demonstrou baixa capacidade noduladora, quando associada com estirpes nativas ou mesmo com a introduzida. Carioca-80, por sua vez, associou-se melhor com as estirpes nativas e não apresentou resposta à inoculação. Jalo EEP558, mostrou-se bem nodulada, independentemente das estirpes dos nódulos serem provenientes do solo ou do inoculante.

**ANALYSIS THE EFFICIENCY OF *Rhizobium tropici*-BEAN
(*Phaseolus vulgaris* L.): THE USE OF *Rhizobium* STRAIN CM-255 *Gus*⁺**

Author: CÍLSON CÉSAR FAGIANI

Adviser: Dra. SIU MUI TSAI

SUMMARY

In the region of Cunha- State of São Paulo, common bean has been cultivated with low inputs, although this legume has been considered an important local cash crop. The crop there has been cultivated in lowlands and in the most hilly areas, where the soils are predominantly acid and unfertile, due to a high crop adaptability to the diverse climatic and soil conditions found in the region. In these areas, bean has been cropped as subsistence food crop, and for enriching the soil-N for a subsequent crop, maize in most of the cases. Bean productivity has been extremely low, due to the little use of basic inputs such as fertilization and liming, causing low yields with a higher soil exposure. Improvement of this production system could avoid the most substantial risks of the soil erosion.

Basic dressing (macro and micronutrients), liming and inoculation with a selected *Rhizobium* strain were focussed in the present study, as factors for enhancing the bean yield. A superior strain of *R. tropici* (CM-255), tolerant to acid soils (pH 4,5) and with an active hydrogenase (*hup*⁺), was tested in greenhouse using several bean varieties, commercial and landrace lines, cultivated in an acid soil of Cunha, with ou without a basic fertilizer dressing (PK + micronutrients) or liming. The strain, genetically

labelled for substrate metabolization of isopropyl-*B*-D-thiogalactopyranoside (IPTG) and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-glucuronide (X-Gluc), was submitted to tests for evaluating symbiotic efficiency and compared to other strains, for determination of the ability of nodule formation, activity of acetylene reduction, dry matter and nitrogen accumulated in the shoot of several bean varieties from the two domestication centers - Andean and Mesoamerican. The competitive ability of the strain CM-255 *Hup*⁺*Gus*⁺ was compared to a *R. etli* strain - CNPAF-512, and both strains were inoculated into an elite variety - Puebla-152, previously surface sterilized, and grown in Leonard jars containing vermiculite and nutrient solution. The effect of mineral-N on nodulation and on the plant growth was studied in this variety, of mesoamerican origin, and in two other varieties - Cargamanto (andean origin) and G12873 (wild mesoamerican). A synergistic effect of low rates of N (1 mM) and a complete inhibition of nodulation at increasing rates of N, above 6 mM, were observed in the three varieties.

The results from the soil studies have shown the great capability of the strain CM-255 *Hup*⁺*Gus*⁺ to associate and form effective root nodules with the five bean varieties - Carioca-80, Serro Azul, Negro Argel, Jalo EEP558 and Rajadão. Fertilization with PKS + micronutrients, as well as liming were essential for a better establishment of the selected strain in the roots, identified in the nodules by the formation of a blue color after reaction with the IPTG and the X-Gluc substrates.

The landrace variety Serro Azul was poorly nodulated, when associated with native strains or with the introduced strain. Carioca-80, on the other hand, was able to better associate with the native strains, and show responses to the inoculation. Jalo EEP558 was abundantly nodulated, independently if the root-nodule bacteria were originally from the soil or the inoculant.

1 - INTRODUÇÃO.

Os solos do Estado de São Paulo apresentam elevado número de estirpes nativas fixadoras de nitrogênio em simbiose com feijoeiro, porém nem sempre são eficientes (SAITO, 1982). A introdução de estirpes de eficiência comprovada é de grande interesse, pois existe grande variabilidade genética em *Phaseolus vulgaris* quanto à capacidade de fixar biologicamente o nitrogênio, refletindo em diferenças no número e eficiência dos nódulos, atividade da nitrogenase e nitrogênio total acumulado pelas plantas (RUSCHEL et al., 1979) e também entre plantas do mesmo cultivar de feijão inoculados com diferentes estirpes de *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* (SAITO & FREITAS, 1982).

Embora o solo seja um ambiente de extrema complexidade, a interação simbiótica leguminosa-rizóbio deve necessariamente ser estudada neste meio, pois os resultados apresentam diferenças quando obtidos em condições diferentes, de maior controle (RUSCHEL & SAITO, 1977; SAITO, 1982). Em condições de solo, onde ocorrem estirpes nativas menos eficientes na fixação do nitrogênio e mais adaptadas às condições do solo, usualmente ocorre um maior número de nódulos infectados pelas estirpes nativas, tornando o manejo da inoculação ineficiente. Sendo assim, a identificação das estirpes responsáveis pelo desenvolvimento dos nódulos é uma importante variável no estudo da capacidade de infecção dos pêlos radiculares das leguminosas, por determinadas estirpes, quando inoculadas no solo.

Uma das principais características reconhecida no feijão é sua versatilidade. Poucas culturas mostram, como o feijão, capacidade de adaptação a diversas condições climáticas (WALLACE, 1985) ou exibem uma grande diversidade de cultivares e períodos vegetativos (SINGH, 1989) permitindo a ele fazer parte de diversos sistemas de produção em todo mundo. Sua diversidade varietal permite que seja cultivado em áreas

planas, onde pode ser beneficiado por todas as vantagens da agricultura mecanizada, assim como em áreas em declive, onde somente é possível trabalhar com tração animal. Seu período vegetativo pode variar de menos 70 dias até mais que 200 dias, viabilizando sua utilização em sistemas de rotação de culturas, onde uma cultura de período vegetativo curto é necessário, ou como uma continua fonte de alimento, notada na região dos Andes na América do Sul, onde a variedade com mais de 200 dias permite o fornecimento de vagens, grãos verdes e grãos secos por quase todo ano.

Apesar de todas estas vantagens e ainda o fato do feijão representar um alimento de grande valor nutritivo (BLISS & BROWN, 1983) consumido por milhões de pessoas distribuídas pelos 5 continentes, ele ainda não é preferido pelos médios e grandes produtores. As razões para isto são os riscos que a cultura proporciona ao produtor, riscos devido as inúmeras pragas (CARDONA, 1989) e doenças (BEEBE et al., 1991) que atacam o feijão, e principalmente pela flutuação de seu preço, tendo sua produção originada por pequenos agricultores e pela agricultura de subsistência onde os recursos financeiros são escassos.

Na região de Cunha no Estado de São Paulo, encontramos um cultivo de feijão de baixa tecnologia, porém de elevada importância econômica para região. Sendo seus solos predominantemente ácidos, propôs-se neste trabalho o estudo da capacidade de nodulação de uma estirpe de *Rhizobium tropici*, hidrogenase ativa (Hup⁺) e tolerante a solos ácidos (pH 4,5), na presença de outras estirpes já adaptadas as condições do solo, daquela região, em interação com variedades de feijão de diferentes centros de origens e da própria região, utilizando-se o marcador genético *B*-glucuronidase (Gus⁺), inserido na estirpe através da conjugação com a bactéria *E. coli* S17-1, garantindo-se sua identificação após mistura com outras estirpes em meio esterilizado ou no próprio solo.

2 - REVISÃO DE LITERATURA.

2.1 - Taxonomia do rizóbio e origem do feijoeiro.

Um importante aspecto sobre a simbiose leguminosa-rizóbio é sua especificidade hospedeira que pode ser utilizada na distinção entre diferentes estirpes de rizóbio. A família Rhizobiaceae é constituída por quatro gêneros: *Rhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* e *Bradyrhizobium*. Todas pertencem ao grupo de bactérias Gram-negativo (STACKEBRANDT, 1985), e apresentam como principal semelhança o fato de induzir a formação de nódulos e fixação do nitrogênio atmosférico. As estirpes dos três primeiros gêneros são de crescimento rápido, sendo as estirpes do gênero *Rhizobium* de hospedeiros restritos e de não fixação do nitrogênio quando estão sozinhas, diferentes das estirpes do gênero *Azorhizobium* que apresentam a capacidade de fixar nitrogênio quando estão sozinhas e indução de nódulos sobre hastes de árvores tropicais, por exemplo a *Sesbania* (YOUNG et al., 1991).

As estruturas dos genes simbióticos das estirpes dos gêneros *Rhizobium*, *Azorhizobium* e *Bradyrhizobium* são similares, porém encontramos algumas diferenças significativas em sua organização e regulação. Em *Rhizobium*, os genes de expressão nos primeiros passos da nodulação (*nod*), e os que determinam a habilidade em fixar o nitrogênio (*fix* e *nif*) são agrupados em um grande plasmídio "simbiótico" (*Sym*). Esse plasmídio define os hospedeiros, diferenciando as espécies em vários biovares (bv.), tais como *R. leguminosarum* dividido em bv. *phaseoli*, bv. *trifolii* e bv. *viciae* que nodulam feijão, trevo e ervilha respectivamente. Em contraste, nas linhagens de *Bradyrhizobium*, os genes *nif* e *nod* são mais afastados e localizados no cromossomo. Algumas linhagens de *Bradyrhizobium* fixam pouco nitrogênio quando cultivadas de forma livre, mas não assimilam amônia e não podem crescer pelo nitrogênio fixado (LONG, 1984).

Recentemente, refinadas técnicas moleculares têm sido usadas na classificação do rizóbio, envolvendo a hibridização-classificação de oligonucleotídeos e determinação da sequência do RNA ribossômico 16S (YOUNG, 1991).

Com base na expressão do gene *psi*, o qual codifica a produção de exopolissacarídeo e na capacidade de sobrevivência em temperaturas elevadas, as estirpes de *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* foram classificadas em *Rhizobium tropici* e *Rhizobium etli* (MARTINEZ-ROMERO et al., 1991).

No fim do século XIX, pesquisadores ainda divergiam sobre o centro de origem do feijão. Na década de quarenta, já no século XX, Burkart e McBryde encontraram evidências da origem do feijão na região dos Andes e na América Central. A existência do feijão selvagem nessas duas regiões levou Delgado, em 1985, a denominar as diferentes variedades - Mesoamericana, que compreende o México e América Central e - Sulamericana, que compreende a América do Sul, como *Phaseolus vulgaris* var. *mexicanus* e *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus* respectivamente. As sementes do selvagem Mesoamericano são menores e de germinação mais demorada em relação ao selvagem Andino (DELGADO et al., 1988).

KAPLAN (1981) sugeriu três teorias a respeito da domesticação e migração dos dois ancestrais comuns do feijão no continente americano, sendo duas abordando a domesticação localizadas ora na região Mesoamericana, ora na região Andina, e outra abordando a domesticação de forma difusa, em diferentes lugares e em diferentes tempos nas regiões Mesoamericana e Andina.

2.2 - Eficiência da interação simbiótica rizóbio-feijoeiro.

Já na primeira metade deste século, foi demonstrada a relação da presença de uma estirpe específica de rizóbio no solo, com a obtenção de maior produção de determinada leguminosa (ERDMAN, 1943). Uma vez tratadas as sementes com inoculante de boa qualidade e estirpe de rizóbio apropriada, obtinha-se maior produção. Porém, subsequentes cultivos da mesma leguminosa no mesmo lugar, não demonstravam a mesma resposta à inoculação (LYNCH & SEARS, 1952). A inoculação se dá de forma eficiente principalmente em áreas de primeiro plantio da determinada leguminosa (BROCKWELL et al., 1988).

A eficiência simbiótica na fixação do nitrogênio da interação *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* - *Phaseolus vulgaris*, já apresentou excelentes resultados quando manipulados por GRAHAM e colaboradores (GRAHAM, 1981; GRAHAM & HALLYDAY, 1977) em condições subtropicais com mais de 600 variedades de feijão. Em outro trabalho, PEREIRA et al. (1984), estudaram a resposta à inoculação de 339 variedades de *Phaseolus vulgaris* em condições de cerrado e obtiveram variadas respostas. As constatações de que existe diferenças nas respostas a inoculação entre as variedades de feijão, demonstram a diversidade genotípica desta leguminosa e abre um caminho na direção do melhoramento genético das variedades comerciais.

Por outro lado, o rizóbio também demonstrou variabilidade na eficiência da interação quando avaliados em casa-de-vegetação (SAITO & FREITAS, 1982; LALANDE et al., 1990) e em campo (SAITO, 1982). A estes resultados, somam-se outros resultados que demonstram, através da utilização de diferentes critérios como padrão de proteínas (ROBERTS et al., 1980), resistência a antibióticos (BEYNON et al., 1980), tipo sorológico (ROBERTS et al., 1985), hibridização de DNA-DNA (SCHOLLA et al., 1990), perfil de plasmídeo (MARTINEZ & PALACIOS, 1984), e estrutura do exopolissacarídeo (ZEVENHUIZEN et al., 1989), a heterogeneidade do

rizóbio, indicando outro caminho a ser trabalhado em direção a maximização dos benefícios da interação simbiótica.

As evidências de variabilidade nas respostas às inoculações de diferentes estirpes em um mesma variedade e entre variedades de feijão inoculados com a mesma estirpe, somando-se às diferenças de respostas na eficiência da fixação simbiótica, obtidas sob condições controladas e no campo, demonstram a especificidade existente entre os simbioses e a complexidade dos fatores que interagem no solo, afetando sobremaneira a eficiência da inoculação, sendo imprescindível o estudo da interação em seu meio para obtenção de maiores detalhes e melhor aproveitamento da simbiose.

Uma análise mais detalhada da integração dos simbioses nos processos fisiológicos de assimilação, distribuição e utilização de carbono e nitrogênio revela uma importante relação e interdependência dos processos metabólicos da bactéria e a produção da leguminosa. O nitrogênio é usado na produção dos órgãos fotossintéticos e o carbono produzido nesses órgãos é necessário para fornecer a energia utilizada na fixação do nitrogênio, redução do nitrato e assimilação do nitrogênio em proteínas, além de fornecer os esqueletos de carbono necessários ao processo de assimilação (NEVES, 1981). Consequentemente a "saúde" da leguminosa é primordial para o sucesso da interação simbiótica.

Como resultado de sua elevada constituição nutritiva, as leguminosas exigem um solo rico em minerais. Muitos solos que podem beneficiar o desenvolvimento das leguminosas e também a fixação do nitrogênio são frequentemente deficientes em alguns minerais essenciais. Respostas positivas com o uso da inoculação são observadas principalmente em áreas experimentais onde a correção das deficiências nutricionais para as leguminosas foi feita, através da fertilização mineral com macro e micronutrientes. MALAVOLTA (1972), em revisão sobre adubação do feijoeiro, constatou que a suplementação de fósforo e nitrogênio ocasionava respostas positivas mais comuns nos experimentos de adubação. Em cultivos com inoculação, a deficiência do fósforo

demonstrou ser também um problema à eficiência simbiótica. SAITO & RUSCHEL (1978) estudando o efeito da adubação fosfática na nodulação natural do feijoeiro, verificaram que esse elemento afeta tanto o peso como o número de nódulos. VARGAS et al. (1990), estudaram os efeitos da fertilização mineral com P, K, Mn e Zn associados com a inoculação do rizóbio e encontraram aumento na nodulação e rendimento de grãos quando utilizaram P, Mn e Zn, não havendo efeito da fertilização com K, nas condições experimentais estudadas. Segundo GRAHAM & ROSAS (1979), os nódulos representam um forte dreno para o fósforo, pois em estudos onde proporcionavam doses crescentes do macronutriente, constataram que o aumento no conteúdo de fósforo foi mais acentuado nos nódulos do que no resto das plantas. Estes resultados vêm de encontro ao intenso metabolismo energético que ocorre nos nódulos na fixação do nitrogênio e a necessidade da presença do fósforo como parte fundamental deste processo.

A necessidade do nitrogênio para o desenvolvimento do feijoeiro é indiscutível, porém, quando relaciona-se sua presença com a eficiência da interação simbiótica rizóbio-leguminosa, encontramos uma situação de bastante controvérsia. Já se associou a elevada eficiência simbiótica ao desenvolvimento da leguminosa em meio deficiente de nitrogênio (NUTMAN, 1956) e que altos níveis de N mineral reduzem o número de nódulos, inibem seu desenvolvimento e a fixação simbiótica (ALLOS & BARTHOLOMEW, 1955). Trabalhos mais recentes demonstraram respostas positivas da fixação simbiótica, quando fornecido doses baixas do nitrogênio mineral (RUSCHEL et al., 1979; TSAI et al., 1993), enquanto outros não demonstraram tal benefício (FRANCO et al., 1979).

Em trabalhos realizados em casa-de-vegetação, FRANCO & DOBEREINER (1968) utilizaram duas variedades de feijão associadas a quatro níveis de Ca e quatro níveis de N. Neste trabalho, a menor dosagem de N (10ppm) aumentou a nodulação da variedade Venezuela-350, nos tratamentos com pouco cálcio, enquanto as dosagens

maiores (20 e 40 ppm de N) foram altamente prejudiciais à nodulação desta variedade e prejudicaram menos a outra variedade, Rico 23. Nesta segunda variedade ainda se observou um aumento do peso dos nódulos nos tratamentos com 10 ppm de N em doses altas de Ca, enquanto sem Ca esta dosagem de N foi prejudicial, sendo estes resultados contrários ao que se observou na variedade Venezuela-350. A elevada significância da interação Ca x N no peso médio dos nódulos mostrou ainda a interdependência do efeito das dosagens de Ca e N. Sem adubação nitrogenada, o cálcio aumentou muito o tamanho dos nódulos, diminuindo esse efeito gradativamente com o aumento das dosagens de N. A variedade Rico 23 pareceu menos sensível a estes efeitos que a variedade Venezuela-350. Segundo FRANCO & MUNNS (1981), no Brasil a resposta do feijoeiro à calagem e aos fertilizantes nitrogenados pode ser relacionada à alta sensibilidade tanto da planta como da iniciação da formação do nódulo, ao alumínio livre em solos com baixo pH.

2.3 - Outros fatores que influenciam a interação simbiótica rizóbio-feijoeiro.

A acidez do solo, juntamente com todos os fatores associados a ela, como, por exemplo, alta saturação de alumínio, baixo teor de P e Ca, tem sido citado como um dos principais fatores limitantes a fixação do nitrogênio, pois afetam o rizóbio, o hospedeiro e o próprio processo simbiótico (VARGAS & GRAHAM, 1988; TAYLOR et al., 1991). Uma alternativa para contornar o efeito deletério da acidez do solo no crescimento e sobrevivência do rizóbio é o aumento da dosagem do inoculante (RICE & OLCEN, 1983) porém inviável para prática comum; outra é a utilização de corretivos, os quais já apresentaram excelentes resultados no aumento da produção do feijoeiro (BUERKET et al., 1990), porém de utilização praticamente nula na agricultura de subsistência. Sendo assim, a seleção de estirpes de *Rhizobium tropici* e variedades de feijoeiro, de simbiose

eficiente e tolerantes as condições ácidas do solo, tem recebido bastante atenção na solução deste problema (VARGAS, 1987; VARGAS & GRAHAM, 1988; DELLA COLETTA FILHO, 1993).

Outros fatores do solo que afetam a fixação simbiótica do nitrogênio são a umidade e temperatura (BONETTI et al., 1984; HUNGRIA et al., 1992). Uma das características do *Rhizobium tropici* é a capacidade de crescer sob altas temperaturas (40 C) (MARTINEZ-ROMERO et al., 1991).

Algumas características intrínsecas ao genoma das estirpes, de interesse para a inoculação em campo, que podem representar vantagens na interação com outros microrganismos ou na eficiência do metabolismo interno, refletindo maior fixação do nitrogênio são resistência a fungicidas e produção da enzima hidrogenase. GRAHAM et al. (1979) estudaram a resistência de oito estirpes de *Rhizobium phaseoli* aos pesticidas PCNB, thiram, captan e furadan em laboratório e em condições de campo com inoculação das sementes e do solo, no cultivo das variedades Cargamanto e Puebla-152, em duas localidades. Encontraram diferentes respostas com relação ao número de nódulos por planta, sendo que as estirpes apresentaram menor resistência ao fungicida captan e maior resistência ao fungicida PCNB. Na avaliação da interação simbiótica de duas variedades de feijão (Carioca e Venezuela-350) com três estirpes de *Rhizobium* (C05, C88 e C29) em casa-de-vegetação, relacionou-se o melhor desempenho simbiótico, tanto das variedades como das estirpes, com a melhor alocação dos elétrons na redução do nitrogênio e maior produção de amônia pela enzima nitrogenase, devido a menor evolução do hidrogênio pelos nódulos, determinada geneticamente, com a produção da enzima hidrogenase nas estirpes Hup⁺ (HUNGRIA & RUSCHEL, 1987).

A influência benéfica das leguminosas sobre a atividade dos microrganismos do solo, em sua imediata vizinhança, já foi documentada há muito tempo (HILTNER, 1904). Subsequentemente, foi relatado que raízes de leguminosas abrigam maior concentração de microrganismos em sua vizinhança do que raízes de outras plantas

(ROUATT & KATZNELSON, 1961). Pesquisadores japoneses notaram que a rizosfera das leguminosas estimulavam o desenvolvimento do rizóbio mais do que outras bactérias do solo e que rizóbio proliferava mais na rizosfera das leguminosas do que em outras plantas (TUZIMURA & WATANABE, 1966).

No caso do *Rhizobium*, populações de diferentes espécies e biovars podem coexistir em baixas densidades populacionais no solo por muitos anos na ausência da leguminosa (KUCEY & HYNES, 1989). Na ausência do hospedeiro, a bactéria é apenas mais um integrante da comunidade microbiana do solo. Comunidade esta que envolve inúmeras e variadas populações de todos os tipos de microrganismos. Sendo uma característica do solo a constante escassez de nutrientes, a competição por estes é uma interação comum entre os microrganismos. Recentes estudos, porém, mostraram o impacto que a presença do hospedeiro específico pode causar na densidade populacional do *Rhizobium* de biovar relacionado, frente aos outros da mesma espécie. População de *R. leguminosarum* bv. *viciae* foi 103 vezes maior que bv. *phaseoli* em campos de ervilha (*Pisum sativum* L.). Em contraste, as densidades populacionais destes dois biovars foram reversas em campos com feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) (KUCEY & HYNES, 1989). Neste contexto o sistema radicular pode ser visto como uma fonte de nutrientes para tais microrganismos.

De maneira geral as mais variadas substâncias são liberadas pelas raízes das plantas, sendo elas exsudatos e lisados radiculares, mucigel, resíduos de paredes celulares e células vegetais intactas (BUSHBY, 1982). A presença de nutrientes orgânicos exsudados pelas raízes proporcionam novos nichos (CARADUS, 1980), atividades fisiológicas, aos microrganismos, podendo ser considerado como um fator seletivo que explicaria o exemplo anterior.

Outros trabalhos, porém, não dão suporte ao argumento de que a rizosfera das leguminosas são seletivas para o desenvolvimento do rizóbio, revelando inconsistência entre os estudos. Sobre condições de laboratório, uma estirpe de *B. japonicum*

proliferou mais na rizosfera de uma planta não hospedeira do que na rizosfera de uma hospedeira, soja (PENA-CABRIALES & ALEXANDER, 1983). Em contraste, em condições de campo, ocorreu maior proliferação de *B. japonicum* nativo na rizosfera da soja do que na rizosfera da aveia (MOAWAD et al., 1984). Embora *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* colonize pobremente a rizosfera da soja em laboratório (PENA-CABRIALES & ALEXANDER, 1983), sobre condições de campo, a mesma biovar colonizou a rizosfera da soja, melhor do que as estirpes de *B. japonicum* nativas (ROBERT & SCHMIDT, 1983).

Limitações técnicas fazem com que a rizosfera seja tratada de maneira muito simplificada. A frequência, comprimento, densidade e capacidade de infecção dos pêlos radiculares podem variar de forma significativa entre as diferentes espécies de leguminosas (NUTMAN, 1959). Uma vez que as bactérias do solo (incluindo os rizóbios) não apresentam distribuição uniforme sobre as raízes, e os padrões de infecção dos pêlos radiculares precisam ser estabelecidos, pesquisas são necessárias para determinar se estes dois aspectos tem influência nos resultados da competição pela nodulação em solo.

Segundo GRAHAM (1981), a maioria dos solos em que se cultiva feijão contém uma população nativa de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (hoje *R. etli* e *R. tropici*, MARTINEZ-ROMERO et al., 1991), que compete pelos sítios de nodulação com o rizóbio proveniente da inoculação. VINCENT (1956) estabeleceu os critérios básicos para seleção de estirpes competitivas, destacando como prioritários a habilidade de formar nódulos eficientes na fixação do nitrogênio com todos os hospedeiros para os quais a cultura é recomendada e capacidade de interagir em uma larga variedade de condições de solo. BROCKWELL et al. (1968) acrescentaram critérios de velocidade na nodulação e capacidade de persistência no solo. Outros estudos complementaram estabelecendo que a estirpe de *Rhizobium* deve apresentar comprovada eficiência em experimentos de campo, largo espectro de nodulação e eficiência, ou seja baixa

especificidade e boa capacidade de colonização e sobrevivência no solo (FREIRE & VIDOR, 1978).

Nenhum aspecto ecológico do rizóbio tem recebido tanta atenção quanto a competição pela nodulação (AMARGER, 1984). Estudos têm mostrado distribuição desigual entre simples misturas de rizóbio e até entre estirpes de rizóbio nativas na formação dos nódulos, e influências de fatores bióticos e abióticos.

Em alguns estudos, o resultado da ocupação dos nódulos foi extremamente igual e neste caso não houve relato de populações diferentes na rizosfera. Na maioria dos trabalhos com combinações de estirpes foram incluídas uma eficiente e outra ineficiente, porém os resultados de vários estudos mostram que nem sempre uma estirpe eficiente competirá com uma não eficiente e que a densidade populacional das estirpes, tanto no inóculo como na rizosfera, tem influência direta na interação (FRANCO & VINCENT, 1976; JOHNSTON & BERINGER, 1976; BEATTIE et al., 1989).

Os resultados de estudos sobre competição envolvendo diferentes estirpes de rizóbio, desenvolvidos em casa-de-vegetação, podem ser muito diferentes quando feitos em campo. Cabe aqui destacar a necessidade da manipulação das condições que interferem nos experimentos "in vitro" para serem o mais semelhantes possíveis as condições encontradas no solo, uma vez que as discrepâncias nos resultados podem ser devido à riqueza do meio que é proporcionado a estirpe em casa-de-vegetação, negligenciando importantes aspectos fisiológicos, já que em condições de campo a escassez de nutrientes é a situação mais comum. Uma maior compreensão da interação competitiva das estirpes pela nodulação, dependerá do refinamento dos métodos de monitoramento das populações no solo e a correlação entre estudos ecológicos e moleculares.

Estudos a nível molecular têm caminhado rapidamente na elucidação do estabelecimento da simbiose. Embora não se tenha tido como principal objetivo a análise da competição pela nodulação, algumas recentes publicações podem ser relevantes para

tal fenômeno. Os genes *nod* estão localizados em um plasmídio, denominado Sym, e compreendem uma sequência de dez genes, *nod L, M, E, F, D, A, B, C, I e J* (DOWNIE et al., 1983). Várias estirpes com mutação nos genes *nod* resultaram em fenótipos de nodulação alterada (DEMAAGD et al., 1989), ou na desestabilização do desenvolvimento do cordão de infecção (CANTER CREMERS et al., 1989). Entre estirpes de rizóbio de um mesmo hospedeiro, é possível que uma sutil diferença na estrutura ou controle dos genes *nod* possa influenciar a proporção de abortos na infecção dos pêlos radiculares. Muitos produtos dos genes *nodD* podem interagir com flavonóides provenientes tanto das leguminosas hospedeiras como não hospedeiras e induzir a expressão de outros genes *nod* (ZAAT et al., 1988). Além disso, o nível de expressão dos genes *nod* pode influenciar a inibição ou aumento da nodulação (SURIN & DOWNIE, 1989).

AMARGER & LOBREAU (1982), chamou de "índice competitivo" a expressão da proporção dos nódulos formados pelas estirpes, sob condições iguais, em interação na superfície radicular da planta, como sendo um instrumento de grande utilidade na quantificação da eficiência das estirpes e da especificidade hospedeira.

2.4 - Identificação do rizóbio após inoculação.

A utilização de instrumentos da engenharia genética em microrganismos, com objetivo de monitoramento dos mesmos no solo, é de grande valia para a compreensão da ecologia microbiana no solo. Porém, a manipulação genética, por ser artificial, pode ser perigosa para o meio se considerarmos os mecanismos de trocas gênicas existentes no solo (STOTZKY, 1989) e as consequências da manipulação não conhecidas e principalmente não controladas totalmente, frente ao desconhecimento das condições

que as mesmas são submetidas quando liberadas no solo natural (ROSZAK & COLWELL, 1987)

Uma das principais dificuldades na identificação das bactérias após sua inoculação no solo é a utilização de métodos eficientes que distingam a bactéria desejada das outras nativas encontradas no solo. Muitos estudos sobre alterações genéticas naturais têm usado marcadores de resistência a antibióticos no monitoramento do microrganismo (LEVY & MARSALL, 1988). Estes marcadores, porém, não são eficientes em solo natural, pois existem microrganismos nativos que são resistentes a um grande número de antibióticos. Assim técnicas de expressão genica e fenotípica têm sido desenvolvidas para permitir um melhor monitoramento do microrganismo no solo.

Observações diretas e quantificações de microrganismos específicos no solo são possíveis através da técnica que utiliza anticorpos fluorescentes. Antisoros obtidos em coelhos contra células bacterianas, podem ser ligados a marcadores fluorescentes (HILL & GRAY, 1967).

A obtenção de uma característica peculiar e de fácil identificação fenotípica, originada pela expressão de um gene de fácil manipulação, no microrganismo específico é outra maneira concreta de monitoramento do microrganismo no solo. Bactérias isoladas do solo apresentam uma grande variação de cores quando cultivadas em diferentes meios. A habilidade para produzir uma cor não associada com microrganismos nativos e a expressão de um novo metabolismo são as bases do sistema de detecção desenvolvido para *Pseudomonas* fluorescentes (DRAHOS et al., 1986) provenientes do solo e também utilizado para a detecção da estirpe de rizóbio CM-255 nesta dissertação, através da expressão do gene gus A (WILSON et al., 1995; STREIT et al., 1992).

As bactérias do gênero *Pseudomonas* são *B*-galactosidase negativo e, por essa razão, não podem crescer em meio mínimo com lactose, nem metabolizar o substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil-*B*-*D*-glucuronidina, o que induziria a cor azul. *Pseudomonas* transformadas com o plamídio lac-Z e lac-Y, contidos em *Escherichia coli*, foram

determinantes na diferenciação com outras bactérias do solo, quando cultivadas em meio mínimo com lactose, produzindo pigmentos azuis na presença do X-gal. A esta marca pode-se acrescentar resistência a algum antibiótico, por exemplo a rifampicina, que em meio mínimo com lactose elimina o crescimento de bactérias endógenas e permite a detecção de menos de 10 ufc no solo (DRAHOS et al., 1986).

A detecção "in situ" de bactérias do solo também tem sido acoplada com a introdução de plasmídios com genes para luminescência (lux), originalmente clonado de *Vibrio fischeri*. Dependendo da linhagem, pode-se detectar até 2×10^{-2} ufc/g de solo. Sistema de detecção por bioluminescência, com utilização do microscópio e raio-X, também pode ser usado para determinação da distribuição espacial de microrganismos introduzidos no solo (RATTRAY et al., 1990).

Plasmídios são potencialmente instáveis e aumentam a possibilidade da transferência dos genes marcadores, conseqüentemente, é mais viável que tais genes sejam carregados pelos cromossomos. Transposons podem ser usados para inserir novos genes nos cromossomos das bactérias, genes que não são encontrados entre os microrganismos nativos do solo e que conferem único traço fenotípico (CHAUDHRY et al., 1989). O gene de uma toxina inseticida clonado da bactéria *Bacillus thuringiensis* foi inserido em uma estirpe de *Pseudomonas*, que expressava tal gene após colonização da raiz da planta, fornecendo desta maneira suplemento constante de inseticida (OBUKOWICZ et al., 1986).

A extração direta do microrganismo ou DNA proveniente do solo e o uso de sondas para detectar sequências gênicas específicas dentro do "genoma comum", também tem sido feito na identificação do microrganismo no solo. O principal problema com esta técnica é a obtenção de quantidade suficiente de DNA e sua purificação para análise genética (OGRAM et al., 1987; HOLBEN et al., 1988).

3 - MATERIAL E MÉTODOS:

Para atingir o objetivo proposto, o trabalho foi dividido em três etapas, abrangendo atividades em laboratórios de Microbiologia/Biologia Molecular e casa-de-vegetação do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), em Piracicaba, no período de julho de 1993 até março de 1995. A primeira etapa foi: obtenção da estirpe marcada, através da conjugação com a bactéria *E. coli* S17-1, avaliação da eficiência simbiótica sob doses crescentes de nitrogênio e comparação com estirpes selvagens, a segunda foi: avaliação da eficiência simbiótica de estirpes de *Rhizobium* ssp. com marcadores genéticos Gus⁺ e Kan⁺ e a terceira foi a avaliação da capacidade de nodulação da estirpe marcada introduzida em solo, na presença de outras estirpes nativas.

As variedades de feijão utilizadas foram de diferentes centros de origem, sendo elas: G12873 (selvagem *Phaseolus vulgaris* var. *mexicanus*), Puebla-152 (domesticada), Negro Argel (domesticada), Serro Azul (domesticada regional) e Carioca-80 (comercial) de origem mesoamericana, *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus* (selvagem) de origem sulamericana e Cargamanto (domesticada), Rajadão (domesticada regional) e Jalo EEP558 (comercial) de origem andina.

3.1 - Conjugação para introdução de marcador genético e monitoramento da infecção nodular pela estirpe marcada.

3.1.1 - Obtenção de transconjugantes.

As bactérias utilizadas neste experimento foram: como doadora a *E. coli* S17-1 (SIMON et al., 1983), portadora do plasmídeo pmTnSSgusA10 (WILSON et al., 1995) e como receptora as estirpes de *Rhizobium tropici* [CM-255 (USDA 2840), CM-18, CM-01(UM-1899, Dr. P. Graham, Univ. de Minnesota EUA) e CM-12(UM-1135)] e *Rhizobium etli* (Br 10028, CFN 042 e CNPAF-512).

As estirpes foram repicadas separadamente em 50 ml de meio de cultura líquido, incubadas sob agitação constante à temperatura ambiente (25°C), por 24 horas com meio LB mais 50 µg/ml de ampicilina para *E. coli* e por 72 horas com meio YM para as estirpes de rizóbio. Em seguida foram retirados 5ml do meio cultivado de cada bactéria em tubos esterilizados e submetidos a uma centrifugação de 4000 rpm por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado, as células ressuspendidas com 5 ml de YM líquido e fez-se uma nova centrifugação. O sobrenadante foi novamente descartado e ressuspendeu-se a estirpe *E. coli* com 1 ml de YM líquido e as estirpes de rizóbio com 0,25 ml do mesmo meio.

Para servir como controle, este material foi em seguida repicado separadamente em placas de Petri (A) contendo meio de cultura Brown e Dilworth modificado, com 1% de sacarose, 80 µg/ml de espectinomicina e incubadas a 28°C. A composição dos meios de culturas, desta e das demais etapas, se encontram no Apêndice 1.

Volumes iguais de 100 µl, de *E. coli* para cada rizóbio, foram misturados em placa de petri (B) contendo meio de cultura YM sólido e incubadas a 28°C por 48 horas. Foram feitas três repetições para cada combinação.

A seleção dos transconjugantes foi feita da seguinte maneira: foram pipetados 2ml de água esterilizada sobre as superfícies das placas B, suspendidas as bactérias, retirados 1,5 ml da suspensão e preparado três diluições (x10; x100 e x1000). De cada diluição foram transferido 100 ul para placas com meio de cultura sólido e seletivo, Brown e Dilworth modificado, com 1% de sacarose, 80 ug/ml de espectinomicina, 100 ug/ml de isopropil-*B*-D-thiogalactopiranosidina (IPTG) e 125 ug/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-*B*-D-glucuronidina (X-gluc). O X-gluc foi previamente diluído em N,N-dimetilformamida, não havendo necessidade de esterilização e o IPTG diluído em água destilada e esterilizado em filtro "Millipore" (0,2 um).

As culturas em placas com meio seletivo foram incubadas a 28°C por 2-3 dias até a observação de colônias azuis, as quais foram repicadas separadamente em meio sólido inclinado de YM mais 80 ug/ml de espectinomicina e armazenadas em geladeira.

A eficiência da conjugação foi avaliada através da transferência de 10 ul das diluições 10⁵, 10⁶ e 10⁷, provenientes da suspensão das bactérias da placa B em placas com meio seletivo mais 1% de sacarose, permitindo, desta maneira, apenas o crescimento das estirpes receptoras.

3.1.2 - Eficiência simbiótica.

Este experimento foi conduzido em casa-de-vegetação, com utilização de vasos de Leonard contendo vermiculita e areia, na proporção 3:1, com solução nutritiva modificada de Hoagland (Apêndice 2) mais 2mM de nitrogênio, sendo o sistema todo autoclavado por 2 horas a 121°C.

As sementes da variedade Puebla-152 foram desinfestadas com álcool 70% por 3 minutos e hipoclorito de sódio 20%, também por 3 minutos (ANDRADE & HAMAKAWA, 1994). Lavadas várias vezes com água destilada esterelizada e em seguida semeada 1 semente por vaso, em 5 repetições para cada tratamento. O

delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado e as médias obtidas comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Após 2 dias da emergência, inoculou-se 10 ml do inóculo previamente preparado das estirpes CM-255 e CNPAF-512 de maneira separada, e 5 ml do inóculo da estirpe CNPAF-512 mais 5 ml do inóculo da estirpe CM-255 Gus⁺ de maneira misturada. Após inoculação isolou-se a superfície do sistema com uma camada de areia esterilizada.

Os inóculos foram preparados em meio de cultura YM líquido, sob agitação constante durante 3 dias em temperatura ambiente, atingindo uma concentração de aproximadamente 10^9 ufc/ml, conferido através do crescimento das estirpes, em diluições seriadas, em placa de Petri.

Após 35 dias da inoculação fez-se a coleta das plantas e a determinação das seguintes variáveis: número de nódulos, peso de matéria seca da parte aérea, nitrogênio total da parte aérea (PARKINSON & ALLEN, 1975), atividade da nitrogenase pelo método da redução do acetileno (HARDY et al., 1968) e identificação dos nódulos através da atividade da *B*-glucuronidase e consequente expressão da cor azul.

A identificação dos nódulos foi feita com a imersão dos mesmos em solução descrita no Apêndice 3, submetendo-os a vácuo por 15 minutos e incubando-os em estufa a 35°C durante 2 dias.

3.1.3 - Nitrogênio mineral e FBN.

Este experimento também foi conduzido em casa-de-vegetação com o mesmo sistema de vasos do experimento anterior, onde foi acrescentado os tratamentos com 10 doses crescentes de nitrogênio (0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16 e 24 mM) nas soluções nutrientes.

As variedades de feijão utilizadas foram Puebla-152, Cargamanto e G12873, sendo as sementes das duas primeiras desinfestadas e da terceira escarificada com ácido sulfúrico (98%) por 10 minutos e lavadas várias vezes com água destilada esterilizada. Semeou-se uma semente por vaso em 4 repetições por tratamento. Após 2 dias da emergência inoculou-se 10 ml de inóculo previamente preparado e cobriu-se a superfície do sistema com uma camada de areia esterilizada. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado e as médias obtidas comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Os inóculos foram preparados com as estirpes CM-255Gus⁺ e CNPAF-512 de forma separada, em meio de cultura líquido YM, sob agitação constante a temperatura ambiente por 3 dias e misturadas antes da inoculação.

Após 35 dias da inoculação coletou-se as plantas e obteve-se as seguintes variáveis: número de nódulos, peso de matéria seca da parte aérea e atividade da nitrogenase.

3.2 - Eficiência das estirpes em variedades de feijão de diferentes origens evolutivas.

Este experimento também foi conduzido em casa-de-vegetação, com o mesmo sistema dos anteriores. As variedades de feijão utilizadas foram Cargamanto, Puebla-152, G12873 e *Phaseolus vulgaris* var. *aborigineus*, sendo as sementes das duas primeiras desinfestadas e das duas últimas escarificadas, de maneira já descrita acima. Semeou-se uma semente por vaso da variedade Cargamanto e 2 sementes por vaso das demais variedades, em 4 repetições por tratamento. Após 2 dias da emergência, inoculou-se 5 ml de inóculo previamente preparado e cobriu-se a superfície do sistema com uma camada

de areia esterilizada. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado e as médias obtidas comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

As estirpes utilizadas nos tratamentos feitos a inoculação (+I) foram: F98.5 (USDA 9045), CM-01 (USDA 2744, CIAT 899), CM-255 (USDA 2840) e CNPAF-512 (USDA 2945), as quais carregavam ora um plasmídeo com marcador Gus⁺ e resistência ao antibiótico kanamicina (Kan⁺), ora o plasmídeo apenas com resistência a kanamicina.

Um tratamento (+N) apenas com o fornecimento de nitrogênio para obtenção da variável eficiência relativa a matéria seca da parte aérea também foi feito e, neste caso, utilizou-se 16 mM do elemento na forma de nitrato de amônia.

Após 35 dias da inoculação, coletou-se as plantas e foram obtidas as seguintes variáveis: número de nódulos, peso de matéria seca da parte aérea, atividade da nitrogenase, nitrogênio total e eficiência relativa a matéria seca da parte aérea (E.R.).

Para o cálculo da eficiência relativa a matéria seca da parte aérea, utilizou-se a seguinte equação:

$$E.R. = [M. Seca P.A.(+I) \times 100] / M. Seca P.A. (+N)$$

3.3 - Eficiência simbiótica da estirpe CM-255 Gus⁺ no solo.

3.3.1 - Eficiência simbiótica em solo natural.

Este experimento foi conduzido em casa-de-vegetação com utilização de vasos de cerâmica (3 kg), tendo como suporte solo de cultivo anterior de feijão, coletado na região de Cunha S.P., cujas características químicas, analisadas pelo Departamento de Química da ESALQ foram:

pH	MO	P	K	Ca	Mg	H+Al	S	T	V
(CaCl ₂)	%	(ug/cm ³)	----- (meq/100cm ³) -----			-----			%
4,45b	4,09a	5,6mb	0,13b	1,19m	1,48m	7,95a	1,8m	9,8a	18,5mb

(mb - muito baixo; b - baixo; m - médio; a - alto; ma - muito alto)

As variedades de feijão utilizadas foram Carioca-80, Serro Azul, Negro Argel e Jalo EEP558. Semeou-se 2 sementes por vaso de cada variedade, previamente desinfestadas de maneira já descrita, em 5 repetições para cada tratamento. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado e as médias obtidas comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

O inóculo, previamente preparado em meio líquido, da estirpe CM-255Gus⁺ foi utilizado, tratando-se as sementes antes do seu plantio, na quantia de 5 ml por semente. A este tratamento acrescentou-se outros sem inoculação, com suplementação de nitrogênio (16 mM) e sem inoculação e nitrogênio.

Após 35 dias, as plantas foram coletadas e obteve-se as seguintes variáveis: número de nódulos, peso de matéria seca da parte aérea e identificação dos nódulos.

3.3.2 - Eficiência simbiótica em solo adubado.

Neste experimento, utilizou-se o mesmo solo do experimento anterior, sem misturar os tratamentos, em copos plásticos de 500 ml, dividindo-se desta vez os três tratamentos anteriores com calagem (4 ton/ha de CaCO₂) e sem calagem.

As variedades de feijão foram as mesmas, acrescentando-se a variedade Rajadão e suplementou-se todo o solo com NPK, na proporção 0; 80 e 30 kg/ha. A inoculação

foi feita, tratando-se as sementes (5 ml/sem), com inóculo previamente preparado em meio YM líquido, da estirpe CM-255Gus⁺. O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado e as médias obtidas comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Após 35 dias, as plantas foram coletadas e obteve-se as seguintes variáveis: número de nódulos, peso de matéria seca da parte aérea, nitrogênio total, atividade da nitrogenase e identificação dos nódulos.

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.

4.1 - Conjugação para introdução de marcador genético e monitoramento da infecção nodular pela estirpe marcada.

4.1.1 - Obtenção de transconjugantes.

Neste experimento foram utilizadas sete estirpes de *Rhizobium* no processo da conjugação. Cinco estirpes apresentaram transconjugantes no final do processo, sendo a frequência de conjugação diferente entre elas (Tabela 1). A repicagem das diluições (10^5 , 10^6 e 10^7), provenientes da suspensão de células das placas com meio de cultura seletivo, em placas com meio de cultura que permitisse o crescimento apenas das estirpes receptoras, possibilitou o cálculo da frequência da conjugação das estirpes. As placas com meio de cultura seletivo onde foram repicadas tanto as estirpes de *Rhizobium*, como a estirpe *E. coli*, antes do processo da conjugação, não apresentaram crescimento de nenhuma estirpe, indicando a eficiência do meio seletivo.

Como pode-se observar todas as estirpes de *Rhizobium tropici* apresentaram transconjugantes no final do processo, sendo a estirpe CM-255, a que apresentou maior

frequência. Já com as estirpes de *Rhizobium etli*, apenas a estirpe CNPAF-512, apresentou transconjugantes e com a menor frequência entre todas (Tabela 1). Estes resultados indicam que, com o método utilizado, pode haver uma disponibilidade maior para conjugação das estirpes de *Rhizobium tropici* com a bactéria *E. coli*.

TABELA 1 - Transconjugantes obtidos da conjugação entre as bactérias *Rhizobium tropici*** e *Rhizobium etli** com a bactéria *E. coli* S17-1, para monitoramento da infecção nodular pela estirpe marcada misturada com outras estirpes.

ESTIRPES	Bactérias receptoras (ufc/ml)	Transconjugantes obtidos (ufc/ml)	Frequência da conjugação (%)
CM-18**	4,95x10 ⁹	4x10 ⁴	8x10 ⁻⁴
CM-12**	3,94x10 ⁹	5x10 ⁴	12x10 ⁻⁴
CM-255**	4,48x10 ⁹	9x10 ⁴	20x10 ⁻⁴
CM-01**	4,23x10 ⁹	2x10 ⁴	5x10 ⁻⁴
CNPAF-512*	4,2x10 ⁹	0,06x10 ⁴	0,1x10 ⁻⁴
BR10028*	3,14x10 ⁷	0	0
CFN042*	5,15x10 ⁷	0	0

O processo da conjugação é codificado por um plasmídio, já isolado das bactérias gram-negativas de diferentes grupos. Este plasmídio codifica a formação do

"pili", necessário no estabelecimento do contato entre as células. Para ocorrer, de fato, a conjugação, é necessário que exista homologia em uma grande extensão dos plasmídios entre as diferentes estirpes, aproximadamente 33 kb (WILLTTS & WILKINS, 1984). Tais observações podem justificar as diferenças de disponibilidade para a conjugação entre as estirpes *Rhizobium tropici* e *Rhizobium etli*, sendo necessário experimentos voltados para a composição molecular das estirpes e identificação de maior ou menor homologia entre os plasmídios destas com o plasmídio da estirpe *E. coli*. Observa-se, também, que as estirpes que apresentaram transconjugantes tiveram maior número de células envolvidas no processo (Tabela 1).

4.1.2 - Eficiência simbiótica.

Os resultados deste experimento estão apresentados na Tabela 2. Observa-se que as variáveis analisadas não apresentam diferenças significativas entre as diferentes estirpes inoculadas, demonstrando semelhança na eficiência simbiótica das estirpes CM-255 e CNPAF-512 e ao mesmo tempo a não interferência da introdução do marcador genético na eficiência da estirpe CM-255, visto que nos testes com a inoculação da mesma, já com marcador, e junto com a estirpe CNPAF-512, o nível da eficiência simbiótica se manteve inalterado.

Na identificação dos nódulos, do tratamento onde misturou-se as estirpes, CM-255 Gus⁺ e CNPAF-512, observa-se 52,9 % dos nódulos ocupados por bactérias da estirpe com marcador Gus⁺, e 47,1 % ocupado por bactérias da estirpe CNPAF-512. Com estes resultados pode-se considerar que a interação simbiótica da estirpe CM-255 Gus⁺, com a leguminosa, não foi inibida pela presença de outra estirpe, quando em concentração equivalente de células.

Embora de maneira não significativa, a estirpe CNPAF-512 apresentou maior número de nódulos em comparação a estirpe CM-255, porém menor atividade da

nitrogenase, menor quantidade de nitrogênio total e menor peso de matéria seca da parte aérea. Estes resultados indicam maior eficiência na fixação do nitrogênio pela estirpe CM-255, podendo ser devido a sua característica de hidrogenase ativa (Hup⁺) (VAN BERKUN et al., 1994).

TABELA 2 - Eficiência das estirpes de *Rhizobium* ssp. associadas à variedade de feijão Puebla-152 de forma isolada ou associada com estirpe marcada.1- Médias de 6 repetições.*

ESTIRPES	VARIÁVEIS ¹				
	N. Nódulos (pl)	ARA ⁺ (uM C ₂ H ₄ /pl.h)	Matéria Seca P.A. (g/pl)	Nitrogênio Total (mg/pl)	Nódulo Azul (%)
CM-255	204a	16,22a	1,25a	59,1a	----
CNPAF-512	267a	13,29a	1,24a	50,4a	----
CNPAF-512 + CM-255Gus ⁺	281a	16,57a	1,43a	64,2a	52,9
C.V. %	34,1	50,5	40,4	43,0	
D.M.S. (5%)	135	13,08	0,89	33,8	

*Médias seguidas pela mesma letra no sentido vertical não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.

⁺ARA - Atividade da redução de acetileno

4.1.3 - Nitrogênio mineral e FBN.

Neste experimento, submeteu-se a interação simbiótica das estirpes CM-255 Gus⁺ e CNPAF-512, de forma conjunta, com as variedades de feijão Cargamanto, G12873 e Puebla-152 à doses crescentes de nitrogênio. No Gráfico 1a, pode-se observar que o processo de infecção dos pêlos radiculares e conseqüente desenvolvimento dos nódulos nas interações simbióticas com as três variedades apresentou um pequeno estímulo em 1mM de nitrogênio, já a partir de 6 mM de nitrogênio, sofreu forte inibição. O mesmo comportamento é observado para a atividade de redução do acetileno no Gráfico 1b.

O Gráfico 1c mostra a variável matéria seca da parte aérea mais estável em relação as variáveis número de nódulos e atividade de redução do acetileno, pois inicialmente esta variável respondia a presença dos nódulos e quando o desenvolvimento destes foi inibido, respondia as doses elevadas do nitrogênio.

Observa-se também no Gráfico 1a, que a interação simbiótica envolvendo a variedade Puebla-152 foi a que apresentou maior tolerância aos níveis elevados de nitrogênio, desenvolvendo nódulos em substrato contendo 12 mM de nitrogênio. A variedade Cargamanto também desenvolveu nódulo até 12 mM de nitrogênio, porém em menor quantidade, e a variedade de menor tolerância foi a variedade selvagem G12873, que teve o desenvolvimento dos nódulos inibido já com 6 mM de nitrogênio.

Estes resultados são confirmados por alguns autores, que já a muito tempo estudaram o efeito do nitrogênio mineral sobre a interação simbiótica rizóbio-leguminosa e demonstraram: uma eficiência simbiótica máxima associada ao desenvolvimento em meio deficiente de nitrogênio (NUTMAN, 1956), elevados níveis de nitrogênio mineral reduzem o número de nódulos, inibem seu desenvolvimento e também a fixação do nitrogênio (ALLOS & BARTHOLOMEW, 1955) e por outro lado, um estímulo na

interação pela adição de pequenas quantidades do elemento (PATE & DART, 1961). Outro aspecto estudado, foi o efeito do nitrogênio como consequência de outras condições estressantes do solo, como falta de irrigação, fósforo e adubo, que uma vez resolvidos , tornariam o efeito do nitrogênio menos prejudicial a interação simbiótica rizóbio-leguminosa (SAITO & RUSCHEL, 1978; TSAI et al., 1993).

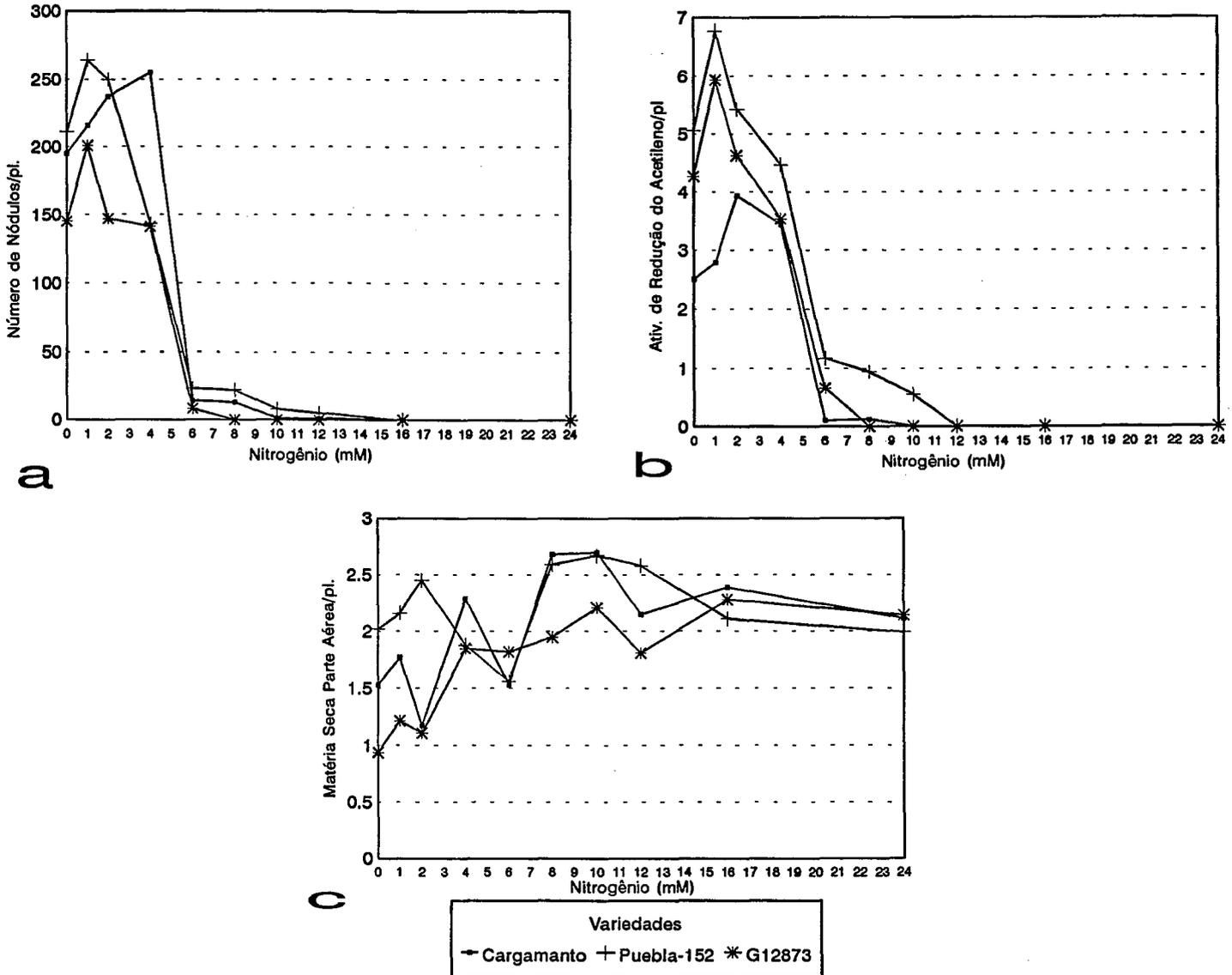


GRÁFICO 1 - (a) Efeito de doses crescentes de nitrogênio no desenvolvimento dos nódulos da interação simbiótica *Rhizobium*-feijoeiro. (b) Atividade de redução do acetileno dos nódulos desenvolvidos sob doses crescentes de nitrogênio. (c) Efeito de doses crescentes de nitrogênio no desenvolvimento da matéria seca da parte aérea das diferentes variedades de feijão.

4.2 - Eficiência das estirpes em variedades de feijão de diferentes origens evolutivas.

A análise estatística demonstrou que o efeito da interação entre os fatores Estirpes e Variedades não foi significativo para todas as variáveis analisadas, número de nódulos, atividade da nitrogenase, nitrogênio total, peso de matéria seca da parte aérea e eficiência relativa ao peso da matéria seca da parte aérea (E.R.) (Tabela 3). Sendo assim, as estirpes apresentaram o mesmo comportamento com as diferentes variedades e estas também apresentaram o mesmo comportamento com as diferentes estirpes. Quando os fatores foram analisados de forma separada, encontrou-se diferença significativa apenas entre as variedades para todas as variáveis e entre as estirpes para as variáveis atividade da nitrogenase e E.R., como mostra a tabela 3.

A Tabela 4 mostra as variedades: G12873, *P. aborigineus*, Puebla-152 e Cargamanto, com diferença significativa, quanto ao número de nódulos desenvolvidos nas interações simbióticas com as estirpes de rizóbio, tendo as variedades domesticadas apresentado maior número que as variedades selvagens. Já as diferentes estirpes, com algumas exceções: F98-5 (na variedade Cargamanto), CM-255 (na variedade G12873) e na variedade *aborigineus* - estirpes F98-5 e CM-255, observa-se que na maioria das interações simbióticas, as estirpes com marcador Gus⁺ apresentaram menor número de nódulos, em comparação com as estirpes com marcador Kan⁺ (Gráfico 2). A Tabela 5 mostra que tal diferença não foi significativa.

Observando-se os dados da atividade de redução do acetileno (ARA), na tabela 4, verifica-se que os nódulos da variedade *P. aborigineus* apresentaram maior atividade que os nódulos da variedade Puebla-152, demonstrando maior eficiência já que a mesma variedade apresentou menor número de nódulos, de maneira significativa, que a variedade Puebla-152. Com relação as estirpes, observa-se pela Tabela 5, que não houve

diferença significativa entre as estirpes com marcador Kan⁺ e entre as mesmas estirpes com marcadores diferentes, porém observa-se diferença significativa entre as estirpes com marcador Gus⁺, sendo a estirpe F98-5Gus⁺ de maior atividade e a estirpe CM-01Gus⁺ de menor atividade.

TABELA 3 - Análise do efeito dos fatores variedades, estirpes e interação entre eles nas variáveis número de nódulos, atividade de redução do acetileno, nitrogênio total da parte aérea, peso da matéria seca da parte aérea e eficiência relativa ao peso da matéria seca da parte aérea através da aplicação do teste F.

FATORES	PROB. > F *				
	N. Nódulos	ARA ⁺	N Total PA	Mat Sec PA	Eficiên.(ER)
VARIEDADES	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001	0,00001
ESTIRPES	0,01744	0,01526	0,59880	0,27775	0,07856
VAR X EST	0,12141	0,33913	0,46157	0,89176	0,70420

* Se (PROB. > F) > 0,10 efeito não significativo.

⁺ ARA - atividade de redução do acetileno.

A eficiência relativa da fixação biológica do nitrogênio quanto ao peso de matéria seca da parte aérea das diferentes interações simbióticas estão no Gráfico 3. Observa-se que entre as estirpes com marcador Gus⁺, a CM-255 apresentou maior eficiência em interação com todas as variedades e que esta estirpe apresentou eficiência

maior que todas as outras estirpes (Tabela 5). Observa-se, também, que houve diferença significativa entre as variedades, e que a variedade Puebla-152 apresentou maior eficiência em interação com todas as estirpes (Tabela 4).

TABELA 4 - Interações simbióticas das diferentes variedades de feijão com as estirpes de *Rhizobium* ssp. 1- Médias de 32 observações.**

VARIEDADES	NODULAÇÃO ¹		PARTE AÉREA ¹		
	N. Nódulos (pl)	ARA ⁺ ($\mu\text{M C}_2\text{H}_4/\text{pl.h}$)	M. Seca P.A. (g/pl)	N. Total P.A. (mg/pl)	eficiência (E.R.) (%)
G12873	89 d	4,09 c	0,8 d	16,9 d	22 c
P.aborigineus	210 c	20,03 b	1,6 c	47,1 c	37 b
Puebla-152	363 b	13,89 b	3,7 b	104,8 b	57 a
Cargamanto	988 a	28,96 a	5,9 a	172,8 a	44 b
C.V. %	34,4	61,0	30,8	32,3	30,9
D.M.S. (5%)	93	6,77	0,6	18,1	8

** Médias seguidas pela mesma letra no sentido vertical não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.

* E.R.- $[\text{M. Seca P.A.}(+I) \times 100] / \text{M. Seca P.A.}(+N)$.

⁺ARA - Atividade de redução do acetileno.

TABELA 5 - Interações simbióticas das diferentes estirpes de *Rhizobium* ssp com as variedades de feijão. 1- Médias de 16 observações.**

ESTIRPES	NODULAÇÃO ¹		PARTE AÉREA ¹		
	N. Nódulos (pl)	ARA ⁺ (μ M C ₂ H ₄ /pl.h)	M.Seca P.A. (g/pl)	N Total P.A. (mg/pl)	ficiência (E.R.) (%)
F98.5Gus ⁺	448 a	23,11 a	3,0 a	86,9 a	40 ab
CM-01Gus ⁺	333 a	11,21 b	2,5 a	74,7 a	31 b
CM-255Gus ⁺	343 a	12,66 ab	3,3 a	96,0 a	45 a
CNPAF512Gus ⁺	397 a	16,62 ab	2,8 a	80,5 a	38 ab
F98.5Kan ⁺	484 a	17,92 ab	3,1 a	84,3 a	42 ab
CM-01Kan ⁺	478 a	20,92 ab	3,2 a	86,2 a	42 ab
CM-255Kan ⁺	403 a	12,96 ab	3,3 a	87,6 a	42 ab
CNPAF512Kan ⁺	457 a	18,53 ab	3,0 a	87,2 a	41 ab
C.V. %	34,4	61,0	30,8	32,3	30,9
D.M.S. (5%)	155	11,32	1,0	30,2	13

** Médias seguidas pela mesma letra no sentido vertical não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.

*E.R.- $[M. \text{Seca P.A. (+I)} \times 100] / M. \text{Seca P.A. (+N)}$.

⁺ARA - Atividade de redução do acetileno.

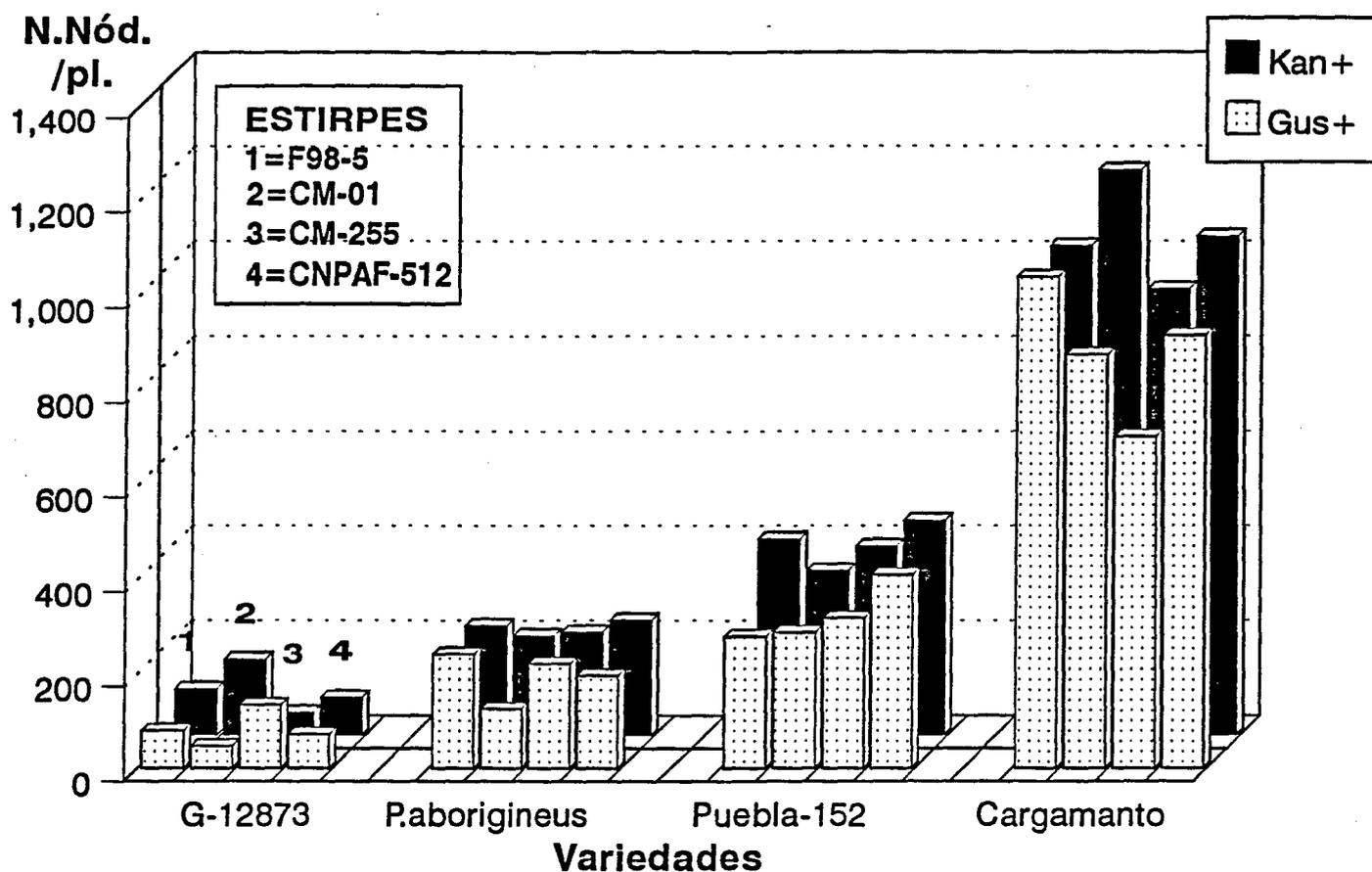


GRÁFICO 2 - Número de nódulos da interação simbiótica entre as estirpes de *Rhizobium* spp. Kan⁺ e Gus⁺ com variedades de feijão de diferentes centros de origem.

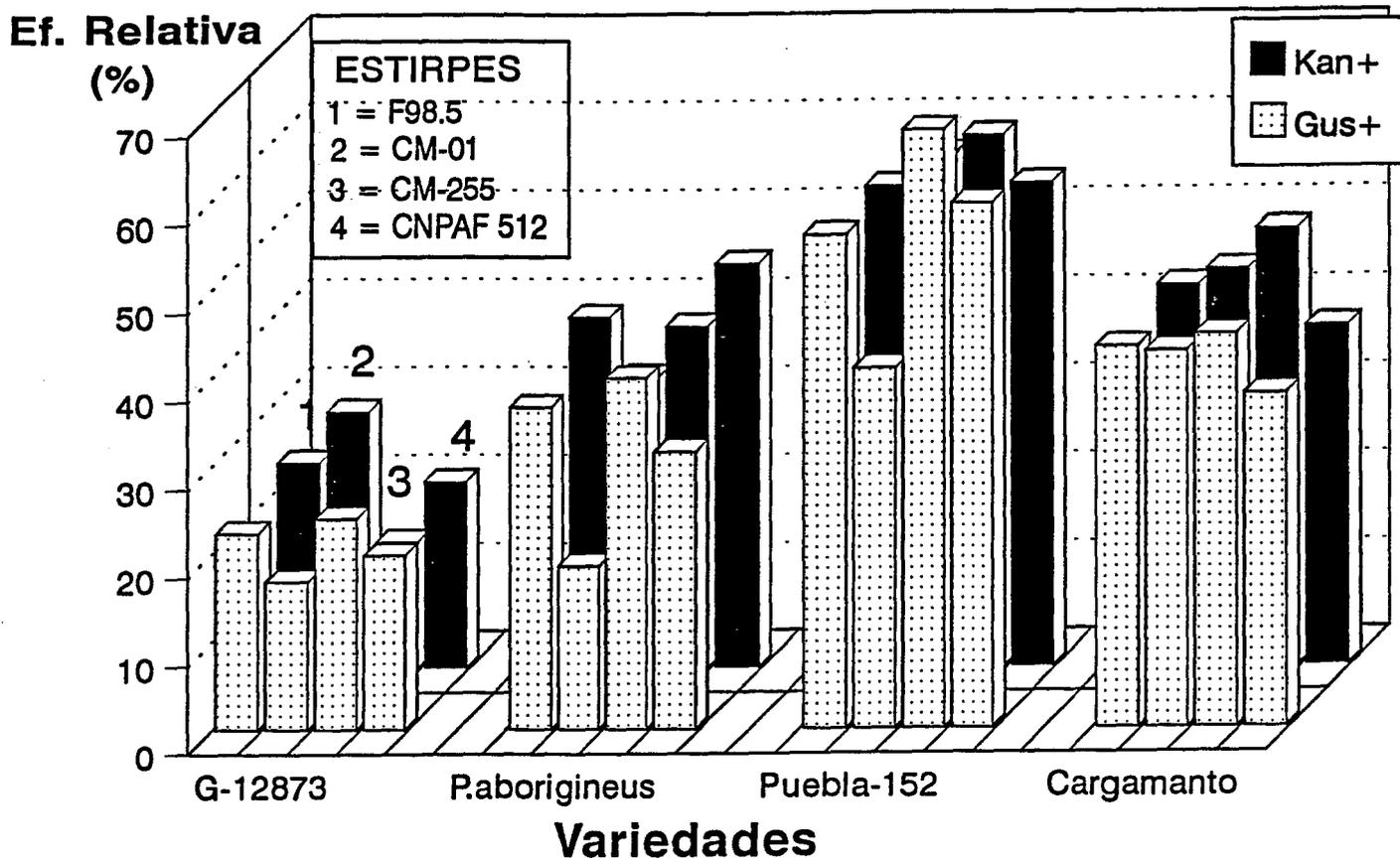


GRÁFICO 3 - Eficiência relativa do peso seco da parte aérea, da interação simbiótica entre as estirpes de *Rhizobium* spp. Kan⁺ e Gus⁺ com variedades de feijão de diferentes centros de origem.

Observando-se as Tabelas 4 e 5, pode-se notar que as variedades domesticadas, Cargamanto e Puebla-152, apresentaram maior eficiência na interação simbiótica com relação a todas variáveis analisadas e que a estirpe CM-01Gus⁺, foi a que apresentou resultados mais baixos com todas as variáveis analisadas, sendo significativo apenas com as variáveis atividade de redução do acetileno (ARA) e eficiência relativa da fixação biológica do nitrogênio quanto ao peso de matéria seca da parte aérea, além de apresentar os maiores contrastes, quando observa-se as estirpes com marcadores Gus⁺ e Kan⁺.

4.3 - Eficiência simbiótica da estirpe CM-255 Gus⁺ no solo.

4.3.1 - Eficiência simbiótica em solo natural.

Neste experimento utilizou-se solo com histórico de cultivo anterior de feijão, da região de Cunha S.P., o qual apresentou pH 4,5. Analisou-se o comportamento da estirpe CM-255 Gus⁺, introduzida na forma de inóculo tratando-se as sementes, frente as estirpes nativas do solo e também apenas o comportamento das estirpes nativas. Tanto a estirpe introduzida como as nativas foram interagidas com as variedades de feijão Carioca-80, Serro Azul, Negro Argel e Jalo EEP558.

A análise estatística demonstrou que os fatores Tratamento e Variedades apresentaram diferenças significativas em relação as variáveis número de nódulos e peso da matéria seca da parte aérea e que a interação entre eles apenas apresentou efeito significativo para a variável número de nódulos (Tabela 6). Sendo assim, podemos observar pelos dados da Tabela 7, que a variedade Serro Azul foi a que, de maneira significativa, menos nódulos desenvolveu e que o tratamento inoculado apresentou significativamente mais nódulos que o tratamento sem a inoculação.

TABELA 6 - Análise do efeito dos fatores tratamento, variedades e interação entre eles nas variáveis número de nódulos e peso da matéria seca da parte aérea através da aplicação do teste F.

FATORES	PROB. > F *	
	N. Nódulos	M. Seca P.A.
TRATAMENTO	0,00001	0,05448
VARIÉDADES	0,00003	0,00001
TRAT X VAR	0,00009	0,50520

* Se (PROB. > F) > 0,10 efeito não significativo.

TABELA 7 - Número de nódulos desenvolvidos pelas variedades de feijão e nos diferentes tratamentos. 1- Médias de 10 observações. 2- Médias de 20 observações.*

VARIETADES	N. Nódulos (vs) ¹
CARIOCA-80	21 a
SERRO AZUL	4 b
NEGRO ARGEL	20 a
JALO EEP558	31a

C.V. % - 49,7

D.M.S. (5%) - 12

TRATAMENTO	N. Nódulos (vs) ²
Inoculado	34 a
Controle	5 b

C.V. % - 49,7

D.M.S. (5%) - 6

* Médias seguidas pela mesma letra no sentido vertical não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.

Sendo a acidez dos solos um dos principais fatores inibidores da interação simbiótica rizóbio-leguminosa, desde os primeiros estádios desta, que compreende a colonização das raízes, reconhecimento do rizóbio na superfície da raiz e o encurvamento dos pêlos radiculares (FRANCO, 1981), observou-se o desenvolvimento de um pequeno número de nódulos neste solo. Este número só foi alterado com a inoculação da estirpe CM-255Gus⁺, responsável direta pelo aumento, comprovada pela identificação dos nódulos e demonstrado na Tabela 8, o que confirmou sua tolerância à acidez do solo (DENARDIN, 1991) maior que as estirpes nativas e o efeito prejudicial da acidez do solo na interação das estirpes nativas com as diferentes variedades de feijão. Estes resultados concordam com trabalho feito por Frey e Blum (1994). Neste trabalho, os autores encontraram mais de 60% dos nódulos, desenvolvidos em condições ácidas, ocupados pela estirpe de *Rhizobium tropici* CIAT 899 (Tipo II).

TABELA 8 - Número de nódulos por vaso desenvolvidos pelas diferentes variedades em interação simbiótica com as estirpes nativas (controle) e quando feito a inoculação da estirpe CM-255Gus⁺ e identificação dos nódulos nos tratamentos com inoculação da estirpe CM-255Gus⁺. 1- Médias de 5 repetições.*

VARIEDADES	TRATAMENTO ¹		IDENT. DOS NÓDULOS ¹	
	Controle	+Inoculação	Nód. Azul (%)	Nód. Branco (%)
CARIOCA-80	6 Ab	37 Ba	99,4	0,6
SERRO AZUL	2 Aa	5 Ca	100,0	0,0
NEGRO ARGEL	6 Ab	34 Ba	98,7	1,3
JALO EEP558	4 Ab	58 Aa	94,4	5,6

C.V. % - 49,7 D.M.S. (5%) - 16 para médias obtidas entre as variedades

D.M.S. (5%) - 12 para médias obtidas entre os tratamentos

* Médias seguidas pela mesma letra no sentido vertical não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.

Na Tabela 8 pode-se observar que a variedade que menos se identificou com a estirpe introduzida foi a Serro Azul, pois foi a que menos nódulos desenvolveu, de maneira significativa, quando feito a inoculação e que a variedade Jalo EEP558 foi mais suscetível a interação simbiótica com a estirpe introduzida, desenvolvendo o maior número de nódulos, confirmados pela atividade da *B*-glucuronidase.

Observa-se também que a única variedade que não respondeu à inoculação foi a Serro Azul (Tabela 8). Provavelmente deve estar ocorrendo resistência à nodulação tanto das estirpes nativas quanto da inoculada.

A variável matéria seca da parte aérea apresentou diferença significativa apenas para o fator Variedades, como mostra a Tabela 9, neste caso a variedade Serro Azul apresentou o menor peso.

TABELA 9 - Matéria seca da parte aérea de plantas das diferentes variedades de feijão.

1- Médias de 15 observações.*

VARIEDADE	Matéria Seca P.A (g) ¹
CARIOCA-80	0,71 a
SERRO AZUL	0,39 b
NEGRO ARGEL	0,60 a
JALO EEP558	0,74 a

C.V. % - 24,4 D.M.S. (5%) - 0,14

* Médias seguidas pela mesma letra no sentido vertical não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.

4.3.2 - Eficiência simbiótica em solo adubado.

Dos aspectos relevantes ao sucesso da interação simbiótica, o desenvolvimento do nódulo é a condição básica para seu alcance. Frente às variadas condições do solo, como acidez, temperatura, umidade, presença ou não de estirpes nativas de rizóbio, já discutidas neste trabalho, que interferem no processo do desenvolvimento dos nódulos, a identificação da estirpe que alcança o desenvolvimento do maior número de nódulos, é um forte indicativo da tolerância desta estirpe às condições adversas do solo.

Neste experimento, analisou-se a interação simbiótica, *Rhizobium*-feijoeiro, no solo, em condições naturais, pH = 4,5 e com utilização de corretivos, pH = 5,4. Embora a alteração alcançada do pH tenha sido pequena, observa-se na Tabela 10 diferença significativa nos resultados das variáveis número de nódulos, nitrogênio total da parte aérea e matéria seca da parte aérea resultantes da interação entre as duas condições. A condição de solo com pH = 5,4 apresentou os melhores resultados. A maioria das estirpes de rizóbio encontradas no solo são sensíveis à pH baixo, quando fez-se a correção, proporcionou-se melhores condições para interação destas estirpes com o feijoeiro.

Os dados da Tabela 11 mostram diferenças significativas entre as variedades para as variáveis número de nódulos, nitrogênio total da parte aérea, matéria seca da parte aérea e eficiência relativa a matéria seca da parte aérea. Nestes dados, pode-se observar que a variedade Carioca-80 foi a que apresentou a maior eficiência relativa (112%), acima do tratamento com nitrogênio.

TABELA 10 - Efeito do fator Calagem (CaCO_2) nas variáveis número de nódulos, nitrogênio total da parte aérea e matéria seca da parte aérea, obtidas da interação de todas as variedades com as estirpes nativas e também com a introduzida. 1-Médias de 50 observações. 2 - Médias de 75 observações.*

CALAGEM	N. Nódulos (vs) ¹	Matéria Seca P.A (g/vs) ²	N Total P.A. (mg/vs) ²
0	74 b	1,19 b	49,4 b
4 ton/ha	110 a	1,34 a	54,0 a
C.V. %	32,4	20,0	16,2
D.M.S. (5%)	12	0,08	2,7

* Médias seguidas pela mesma letra no sentido vertical não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.

Tendo como referência o desenvolvimento dos nódulos, a Tabela 12 mostra o efeito significativo da interação dos fatores Calagem e Variedades. Pode-se observar na Tabela 12, que as estirpes de rizóbio apresentaram maior interação com todas as variedades, nas condições do solo onde o pH estava mais elevado, desenvolvendo maior número de nódulos, indicando a condição restritiva do solo natural no desenvolvimento dos nódulos. Nesta interação, só não houve resposta significativa à calagem nas variedades Carioca-80 e Serro Azul.

TABELA 11 - Número de nódulos, nitrogênio total da parte aérea, matéria seca da parte aérea e eficiência relativa a matéria seca da parte aérea obtidos das interações simbióticas das estirpes de rizóbio nativa e introduzida com as diferentes variedades de feijão. 1- Médias de 20 observações. 2- Médias de 30 observações.**

VARIETADES	N. Nódulos (vs) ¹	Matéria Seca P.A. (g/vs) ²	N Total P.A. (mg/vs) ²	Eficiência (E.R)* (%) ¹
Carioca-80	87 bc	1,14 b	49,6 bc	112 a
Serro Azul	46 d	0,99 b	42,7 d	95 ab
Negro Argel	108 b	1,09 b	48,8 c	96 ab
Jalo EEP558	156 a	1,51 a	55,2 b	83 b
Rajadão	65 cd	1,58 a	62,3 a	87 b
C.V. %	32,4	20,0	16,2	21,0
D.M.S. (5%)	26	0,18	5,9	17

** Médias seguidas pela mesma letra no sentido vertical não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.

*E.R.- $[M. \text{ Seca P.A. (+I)} \times 100] / M. \text{ Seca P.A. (+N)}$.

TABELA 12 - Número de nódulos por vaso, obtidos das interações simbióticas das estirpes nativas e introduzida com as diferentes variedades de feijão, em condições de solo natural e com calagem (CaCO_2). 1- Médias de 10 observações.*

CALAGEM	VARIEDADES ¹				
	Carioca-80	Serro Azul	Negro Argel	Jalo EEP558	Rajadão
0	81 Abc	38 Ad	84 Bb	123 Ba	46 Bcd
4 ton/ha	92 Ac	53 Ad	132 Ab	189 Aa	84 Acd

C.V. % - 32,4 D.M.S. (5%) - 27 para médias obtidas entre calagem.

D.M.S. (5%) - 37 para médias obtidas entre variedades.

* Médias seguidas pela mesma letra no sentido vertical não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.

A Tabela 12 mostra que houve diferença na nodulação das variedades, nas duas condições de pH do solo e que ocorreu maior desenvolvimento de nódulos com as variedades Jalo EEP558 e Negro Argel e menor desenvolvimento na variedade Serro Azul. Diferenças varietais para a nodulação, em condições de acidez, também foram encontradas por VARGAS & GRAHAM (1988). Estas diferenças podem ser explicadas pela ocorrência de um bloqueio, ou produção insuficiente de flavonóides pelas raízes do hospedeiro em condições de acidez, acarretando uma inibição dos genes da nodulação do rizóbio e esse bloqueio seria variável de acordo com a variedade,

A análise estatística mostrou diferença significativa entre os efeitos dos tratamentos nas variáveis número de nódulos, nitrogênio total da parte aérea e matéria seca da parte aérea (Tabela 13) e também significativo a interação entre os fatores Tratamento e Variedades para as variáveis número de nódulos e nitrogênio total da parte aérea (Tabelas 14 e 15). Na Tabela 13, observa-se que o número de nódulos foi significativamente maior no tratamento com inoculação.

TABELA 13 - Efeito do fator Tratamento nas variáveis número de nódulos, nitrogênio total da parte aérea e matéria seca da parte aérea, obtidas da interação de todas as variedades com as estirpes nativas e também com a introduzida. 1 - Médias de 50 observações.*

TRATAMENTO	N. Nódulos (vs) ¹	Matéria Seca P.A. (g/vs) ¹	N Total P.A. (mg/vs) ¹
Controle	68 b	1,18 b	37,2 c
+Inoculação	116 a	1,26 ab	43,9 b
+Nitrogênio	---	1,34 a	74,0 a
C.V. %	32,4	20,0	16,2
D.M.S. (5%)	12	0,12	3,9

* Médias seguidas pela mesma letra no sentido vertical não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.

TABELA 14 - Número de nódulos por vaso, obtidos das interações simbióticas das estirpes nativas, controle, e introduzida com as diferentes variedades de feijão. 1- Médias de 10 observações.*

TRATAMENTO	VARIEDADES ¹				
	Carioca-80	Serro Azul	Negro Argel	Jalo EEP558	Rajadão
Controle	91 Aab	17 Bc	77 Bb	125 Ba	31 Bc
+Inoculação	82 Ac	74 Ac	139 Ab	187 Aa	98 Ac

C.V. % - 32,4 D.M.S. (5%) - 27 para médias obtidas entre os tratamentos.

D.M.S. (5%) - 37 para médias obtidas entre as variedades.

* Médias seguidas pela mesma letra no sentido vertical não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.

TABELA 15 - Nitrogênio total da parte aérea, por vaso, obtido das plantas das diferentes variedades de feijão entre os diferentes tratamentos. 1- Médias de 10 observações.*

TRATAMENTO	VARIEDADES ¹				
	Carioca-80	Serro Azul	Negro Argel	Jalo EEP558	Rajadão
Controle	39,1 Bab	31,5 Bb	35,7 Bab	35,5 Bab	44,0 Ba
+Inoculação	43,4 Bab	39,0 Bb	42,2 Bab	43,8 Bab	51,3 Ba
+Nitrogênio	66,4 Abc	57,5 Ac	68,4 Ab	86,3 Aa	91,6 Aa

C.V. % - 16,2 D.M.S. (5%) - 8,9 para médias obtidas entre os tratamentos.

D.M.S (5%) - 10,3 para médias obtidas entre as variedades.

* Médias seguidas pela mesma letra no sentido vertical não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.

O aumento do número de nódulos com a inoculação só não é observado com a variedade Carioca-80 (Tabela 14). Na Tabela 14, observa-se que a variedade Carioca-80 apresentou maior interação com as estirpes nativas, não respondendo a inoculação, embora com a inoculação tenha apresentado a maioria dos nódulos colonizados pela estirpe introduzida, como mostra a Tabela 16. Por outro lado, a variedade Jalo EEP558, apresentou o maior número de nódulos em interação com as estirpes nativas e também quando feita a inoculação, tendo nesta última situação 77,5 % dos nódulos ocupados pela estirpe introduzida (Tabela 16).

Embora não significativo, os dados da Tabela 15 mostram um aumento do teor do nitrogênio total em todas as variedades, quando o solo foi inoculado. As condições nas quais desenvolveu-se o trabalho, não foram direcionadas para uma análise criteriosa com relação ao desenvolvimento da parte aérea, pois para isto, o tamanho dos vasos e o tempo de plantio deveriam ser maior, o que também justifica os dados referentes a matéria seca da parte aérea não terem sido diferentes entre os tratamentos controle e com inoculação, na Tabela 13.

Os dados da Tabela 16 mostram que a identificação dos nódulos das interações quando feita a inoculação mostrou a maioria dos nódulos de todas as variedades colonizados pela estirpe CM-255Gus⁺. A análise estatística não mostrou diferença significativa entre a porcentagem de nódulos azuis da interação da estirpe marcada com as diferentes variedades em condições de solo natural e corrigido, porém demonstrou diferença significativa entre as variedades, como mostra a Tabela 16. Nesta, observa-se que a variedade Jalo EEP558 apresentou a menor porcentagem de nódulos identificados com a cor azul.

A capacidade elevada de nodulação da estirpe introduzida pode ser avaliada com as variedades Jalo EEP558, Carioca-80 e Negro Argel, pois estas variedades apresentaram elevado número de nódulos no tratamento sem inoculação, demonstrando

suscetibilidade a interação simbiótica com as estirpes nativas e no tratamento onde foi feita a inoculação, tiveram a maioria dos nódulos identificados com a cor azul (Tabela 16).

O Gráfico 4 mostra que a alteração na relação da capacidade de nodulação entre as estirpes nativas e a introduzida, nas duas condições de pH do solo, apresentou-se semelhante nas variedades Carioca-80, Jalo EEP558 e Rajadão, ou seja, pela identificação dos nódulos, observa-se um aumento da nodulação pelas estirpes nativas no solo corrigido. Já com as variedades Serro Azul e Negro Argel, a estirpe introduzida teve maior nodulação, mesmo com o solo corrigido, indicando maior habilidade de nodulação com estas variedades, já que em condições de solo com pH corrigido, as estirpes nativas apresentam maior habilidade de nodulação (FREY & BLUM, 1994).

Em todas as condições de solo: sem inoculação, com inoculação, sem adubação, com adubação, com pH natural e com pH corrigido, as variedades de melhor e pior desempenho na interação simbiótica, no desenvolvimento dos nódulos e atividade de redução do acetileno, foram Jalo EEP558 e Serro Azul, respectivamente (Gráfico 5).

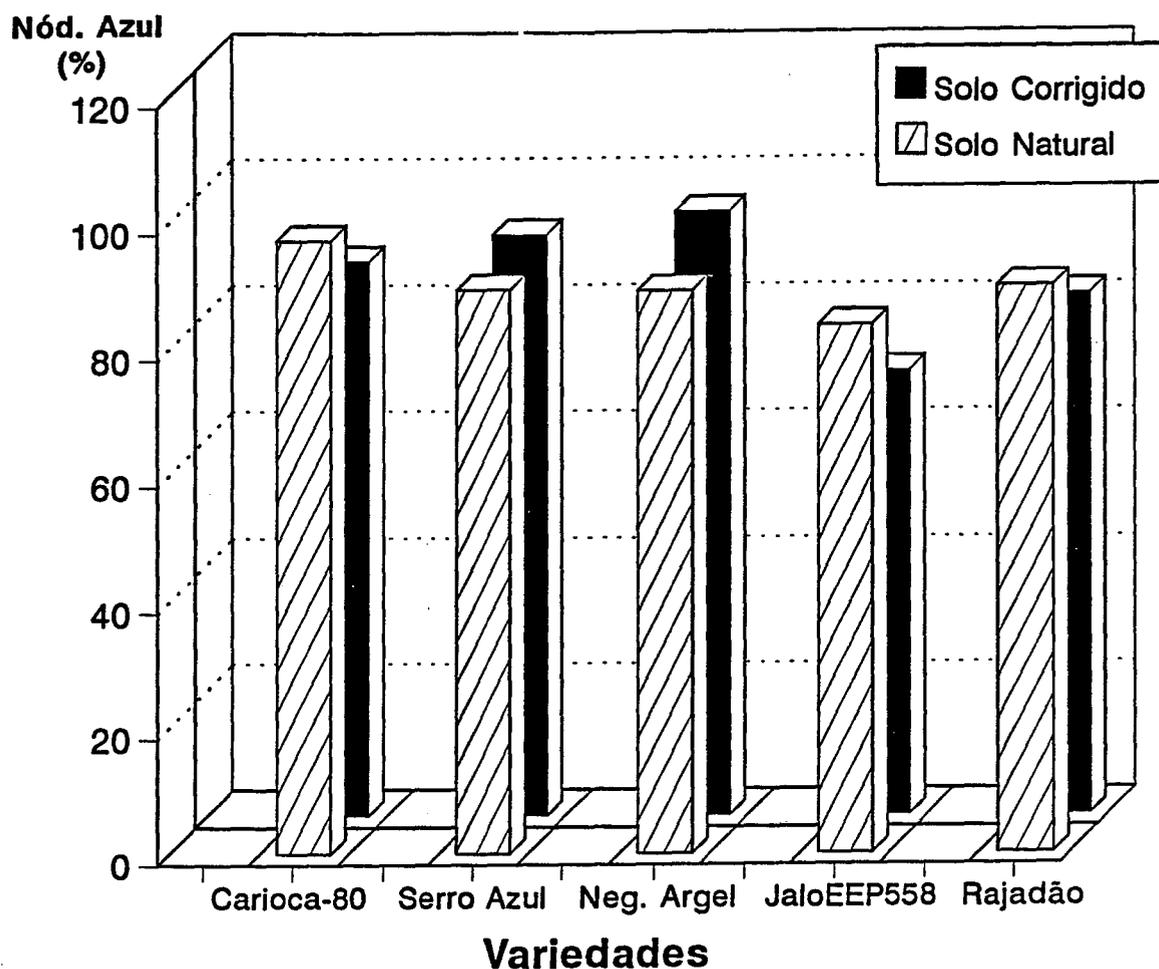
TABELA 16 - Porcentagem de nódulos identificados com a cor azul, desenvolvidos pelas diferentes variedades quando inoculado a estirpe CM-255Gus⁺.

1- Médias de 10 observações.*

VARIEDADES	Nódulo Azul ¹ (%)
Carioca-80	92,9 a
Serro Azul	91,5 a
Negro Argel	92,9 a
Jalo EEP558	77,5 b
Rajadão	87,7 ab

C.V % - 9,2 D.M.S. (5%) - 10,4

* Médias seguidas pela mesma letra no sentido vertical não diferem significativamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5%.



VARIEDADES	SOLO	
	Natural	Corrigido
Carioca-80	97,2	87,9
Serro Azul	89,4	92,1
Negro Argel	89,2	95,7
Jalo EEP558	83,6	70,3
Rajadão	89,7	82,4

GRÁFICO 4 - Identificação dos nódulos desenvolvidos pela interação das diferentes variedades de feijão com a estirpe introduzida CM-255Gus⁺, em solo natural e corrigido.

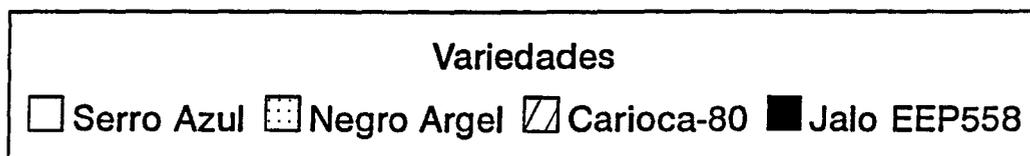
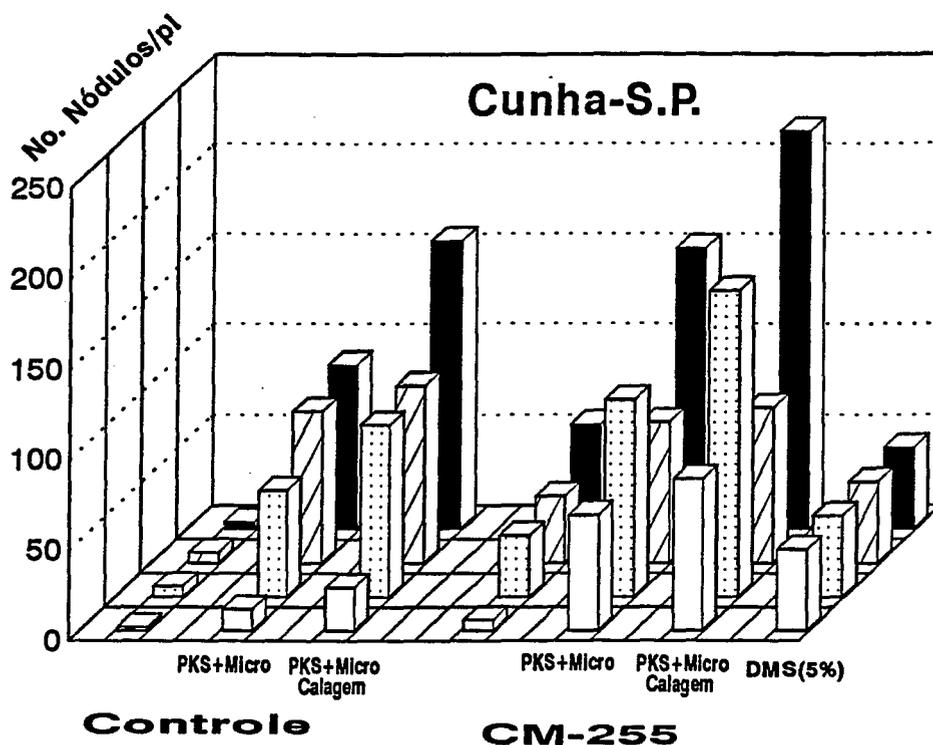


GRÁFICO 5 - Número de nódulos desenvolvidos nas interações simbióticas das estirpes de *Rhizobium* ssp. nativas e introduzida, com as diferentes variedades de feijão, em condições de solo natural, adubado e com calagem.

5 - CONCLUSÕES.

- A - A estirpe CM-255 de *Rhizobium tropici* tem elevado potencial de desenvolvimento de nódulos na presença de estirpes nativas, especialmente em solos ácidos, e o manejo da inoculação aumenta o número de nódulos desenvolvidos pela interação simbiótica rizóbio-feijoeiro.
- B - As variedades de feijão domesticadas apresentam maior nodulação, matéria seca da parte aérea, nitrogênio total e eficiência relativa da fixação biológica do nitrogênio quanto a matéria seca da parte aérea, do que as variedades selvagens, quando em interação simbiótica com rizóbio. A variedade Carioca-80 não responde a inoculação da estirpe CM-255, porém apresenta elevada interação simbiótica com as estirpes nativas da região e a variedade Jalo EEP558 nodula bem tanto com as estirpes nativas como com a inoculada. A variedade Serro Azul apresenta baixa suscetibilidade à interação simbiótica tanto com as estirpes nativas quanto com a introduzida.
- C - A calagem e adubação do solo são condições essenciais para maximização da interação simbiótica rizóbio-feijoeiro na região de Cunha, seja com as estirpes nativas ou com estirpes introduzidas.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- ALLOS, H.F. & BARTHOLOMEW, W.V. Effect of available nitrogen on symbiotic fixation. *Soil Science Society of America Proceedings*, Ann Arbor, 19:182-184, 1955.
- AMARGER, N. Evaluation of competition in *Rhizobium* ssp. In: KLUG, M.J. & REDDY, C.A. eds. *Current perspectives in microbial ecology*. Washington, D.C., American Society of Microbiology, 1984. p. 300-305.
- AMARGER, N. & LOBREAU, J.P. Quantitative study of nodulation competitiveness in *Rhizobium* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 44:583-588, 1982.
- ANDRADE, D.S. & HAMAKAWA, P.J. Estimativa do número de células viáveis de rizóbio no solo e em inoculantes por infecção em plantas. In: HUNGRIA, M. & ARAUJO, R.S. eds. *Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola*. Brasília D.F. EMBRAPA, 1994 p. 63-94.
- BEATTIE, G.A.; CLAYTON, M.K.; HANDELSMAN, J. Quantitative comparison of the laboratory and field competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*. *Applied Environmental Microbiology*, Baltimore, 55:2755-2761, 1989.
- BEEBE, S.E. & CORRALES, M.P. Breeding for disease resistance. In: SCHOONHOVEN, A. & VOYSEST, O. eds. *Common beans research for crop improvement*. Colombia, 1991. CAB international, p.561-562.
- BEYNON, J.L. & JOSEY, D.P. Demonstration of heterogeneity in a natural population of *Rhizobium phaseoli* using variation intrinsic antibiotic resistance. *Journal of General Microbiology*, Reading, 118:437-442, 1980

- BLISS, F.A. & BROWN, J.W.S. Breeding common bean for improved quantity and quality of seed protein. In: JANICK, J. ed. **Plant breeding reviews**. Westport AVI, 1983. V. 1, p. 59-102.
- BONETTI, R., MONTANHEIRO, M.N.S., SAITO, S.M.T. The effects of phosphate and soil moisture on the nodulation and growth of *Phaseolus vulgaris* L. **Journal of Agricultural Science, Cambridge**, 103:95-102, 1984.
- BROCKWELL, J., DUDMAN, W.F., GIBSON, A.H., HELY, F.W., ROBINSON, A.C. An integrated programme for the improvement of legume inoculant strains. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF SOIL SCIENCE, 9., Sidney, 1968. **Anais**. V. 2, p. 103-114.
- BROCKWELL, J.; HOLLIDAY, R.A.; DAOUD, D.M.; MATERON, L.A. Symbiotic characteristics of a *Rhizobium*-specific annual medic, *Medicago rigidula* (L) All. **Soil Biology and Biochemistry, Oxford**, 20:593-600, 1988.
- BROWN, C.M. & DILWORTH, M.J. Ammonia assimilation by *Rhizobium* cultures and bacterioids. **Journal Genetic Microbiology** 122:61-67, 1975.
- BUERKET, A., CASSMAN, K.G., PIEDRA, C. DE LA, MUNNS, D.N. Soil acidity and liming effects on stand, nodulation and yield of common bean. **Agronomy Journal, Madison**, 82:749-754, 1990.
- BUSHBY, H.V.A. Ecology. In: BROUGHTON, W.J. ed. **Nitrogen fixation**. Oxford, Clarendon, 1982. V. 2, p. 35-75.
- CANTER CREMERS, H.C.J., SPAINK, H.P., WIFJES, A.H.M., PEES, E., WIJFFELMAN, C.A., OKKER, R.J.H., LUGTENBERG, B.J.J. Additional nodulation genes on the sym plasmid of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. **Plant Molecular Biology, The Hague**, 13:163-174, 1989.
- CARADUS, J.R. Distinguishing between grass and legume species for efficiency of phosphorus use. **New Zealand Journal of Agricultural Researcher, Wellington**, 23:75-81, 1980.

- CARDONA, C. Insects and other invertebrate bean pests in Latin America. In: SCHWARTZ, H.F. & PASTOR CORRALES, M.A. eds. **Bean production problems in tropics**. Second edition. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CIAT, 1989. p. 505-570.
- CHAUDRY, G.R.; TORANZOS, G.A.; BHATTI, A.R. Novel method for monitoring genetically engineered microorganisms in the environment. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, **55**:1301-1304, 1989.
- DELGADO, S.A., BONET, A., GEPTS, P. The wild relative of *Phaseolus vulgaris* in Middle America. In: Gepts, P.H. ed. **Genetic resources of Phaseolus beans**. Dordrecht, Kluwer, 1988. p. 163-184.
- DELLA COLETTA FILHO, H. Avaliação da fixação biológica do nitrogênio em genótipos de feijoeiro. Piracicaba, 1993. p.72. (Mestrado - Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP).
- DEMAAGD, R.A., SPAINK, H.P., PEES, I., MULDER, I.H.M., WIFJES, A., WIJFFELMAN, C.A., OKKER, R.J.H., LUGTENBERG, B.J.J. Localization and symbiotic function of a region the *Rhizobium leguminosarum sym* plasmid pRL1J1 responsible for a secreted flavonoid-inducible 50-kilodalton protein. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, **171**:1151-1157, 1989.
- DENARDIN, N.D. Seleção de estirpes de *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* tolerantes a fatores de acidez e resistentes a antibióticos. Piracicaba, 1991. p.89. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- DOWNIE, J.L., HOMBRICHER, G., MAQ-S., KNIGHT, C.D., WELLS, B., JOHNSTON, A.W.B. Cloned nodulation genes of *Rhizobium leguminosarum* determine host-range specificity. **Molecular and General Genetics**, Berlin, **190**:359-365, 1983.

- DRAHOS, D.J.; HEMMING, B.C.; MCPHERSON, S. Tracking recombinant organisms in the environment: *B*-Galactosidase as a selectable non-antibiotic marker for fluorescent pseudomonads. *Bio Technology*, New York, 4:439-444, 1986.
- ERDMAN, L.W. New developments in legume inoculation. *Soil Science Society of American Journal*, Madison, 8:213-215, 1943.
- FRANCO, A.A. Acidity factors limiting nodulation, nitrogen fixation and growth of *Phaseolus vulgaris* L. Davis, 1981. 143p. (Ph. D- University of California).
- FRANCO, A.A. & DOBEREINER, J. Interferência do cálcio e nitrogênio na fixação simbiótica do nitrogênio por duas variedades de *Phaseolus vulgaris* L. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Rio de Janeiro, 3:223-227, 1968.
- FRANCO, A.A. & MUNNS, D.N. Acidity and aluminum restraints on nodulation, nitrogen fixation and growth of *Phaseolus vulgaris* L. in solution culture. *Soil Science Society of American Journal*, Madison, 46:296-301, 1982.
- FRANCO, A.A., PEREIRA, J.C., NEYRA, C.A. Seasonal patterns of nitrate reductase and nitrogenase activities in *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology*, Rockville, 63:421-424, 1979.
- FRANCO, A.A. & VICENT, J.M. Competition amongst rhizobial strains for the colonization and nodulation of two tropical legumes. *Plant and Soil*, The Hague, 45:27-48, 1976.
- FREIRE, J.R.J. & VIDOR, C. Fixação de nitrogênio pela simbiose *R. japonicum*-Soja. In: MIYASAKA, J. ed. *A soja no Brasil*. Campinas, 1978.
- FREY, S.D. & BLUM, L.K. Effect of pH on competition for nodule occupancy by type I and type II strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. *Plant and Soil*, The Hague, 163:157-164, 1994.
- GRAHAM, P.H. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L.; a review. *Field Crops Research*, Amsterdam, 4:93-112, 1981.

- GRAHAM, P.H., OCAMPO, G., RUIZ, L.D., DUQUE, A. Survival of *Rhizobium phaseoli* in contact with chemical seed protectants. CALI, CIAT, 1979. p. 625-627.
- GRAHAM, P.H. & HALLIDAY, J. Inoculation and nitrogen fixation in the genus *Phaseolus*. In: VINCENT, J.M. ed. *Exploiting the legume-Rhizobium in tropical agriculture*. Honolulu, University of Hawai. College of Tropical Agriculture, 1977. p. 313-324. (mix. publ., 145)
- GRAHAM, P.H. & ROSAS, J.C. Phosphorus fertilization and symbiotic fixation in common bean. *Agronomy Journal*, Madison, 71:925-926, 1979.
- HARDY, R.W.F., HOSTEN, R.D., JACKSON, E.K., BURNS, R.C. The acetilene ethylene assay for nitrogen fixation: laboratory and field evaluations. *Plant Physiology*, Rockville, 43:1185-1207, 1968.
- HILL, I.R. & GRAY, T.R.G. Application of the fluorescent-antibody technique to an ecological study of bacteria in soil. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, 93:1888-1896, 1967.
- HILTNER, L. Über neuere erfahrungen und probleme auf dem gebiet der bodenbakteriologie und unter besonderer berucksichtigung der grundungug und brache. *Arb. Dtsch. Landwirt. Ges.* 98:59-78, 1904.
- HOLBEN, W.E.; JANSSON, J.K.; CHELM, B.K.; TIEDJE, J.M. DNA probe method for the detection of specific microorganisms on the soil bacterial community. *Applied and Environmental Microbiology*, Baltimore, 54:703-711, 1988.
- HUNGRIA, M. Efeitos das temperaturas elevadas nos passos iniciais da infecção e nodulação de feijoeiro. In: *Reunião Nacional de Pesquisa de Feijão*, 4., 1993. Resumos. Londrina, IAPAR, p. 222.
- HUNGRIA, M. & RUSCHEL, A.P. Atividade da nitrogenase e evolução do hidrogênio pelos nódulos de *Phaseolus vulgaris*. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, 11:269-274, 1987.

- JOHNSTON, A.W.B. & BERINGER, J.E. Mixed inoculation with effective and ineffective strains of *Rhizobium leguminosarum*. **Journal of Applied Bacteriology**, Reading, **49**:375-380, 1976.
- KAPLAN, L. What is the origin of the common bean? **Economic Botany**, New York, **35**:240-254, 1981.
- KUCEY, R.M.N. & HYNES, M.F. Populations of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* and *viciae* in fields of bean or pea in rotation with nonlegumes. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, **35**:661-667, 1989.
- LALANDE, R., BIGWANEZA, P.C., ANTOUN, H. Symbiotic effectiveness of strain of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* isolated from soils of Rwanda. **Plant and Soil**, The Hague, **121**:41-46, 1990.
- LEVY, S.B. & MARSHALL, B.M. Genetic transfer in the natural environment. In: SUSSMAN, M.; COLLINS, C.H.; SKINNER, F.A.; STEWART-TULL, D.E. eds. **The release of genetically-engineered micro-organisms**. New York, Academic Press, 1988. p.61-76.
- LONG, S.R. Genetics of *Rhizobium* nodulation. In: KOSUGE, T. & NESTER, E.W. eds. **Plant microbe interactions**. New York, Academic Press, 1984. V. 1. p. 265-306.
- LYNCH, D.L. & SEARS, O.H. The effect of inoculation upon yields of soybeans on treated and untreated soils. **Soil Science Society of America Proceedings**, Ann Arbor, **16**:214-216, 1952.
- MALAVOLTA, E. **Nutrição e adubação**. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FEIJÃO, 1., Campinas, 1971. **Anais**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 1972. p.209-242.
- MANIATIS, T.; SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. **Molecular cloning**. A Laboratory Manual. Col Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1982.

- MARTINEZ, E., ROMERO, D., PALACIOS, R. The *Rhizobium* genome. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, 9:59-93, 1990.
- MARTINEZ, E., ROMERO, D., SEGOVIA, L., MERCANTE, F.M., FRANCO, A.A., GRAHAM, P., PARDO, M.A. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. tress. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, 41:417-426, 1991.
- MOAWAD, H.A.; ELLIS, W.R.; SCHMIDT, E.L. Rhizosphere response as a factor in competition among three serogroups of indigenous *Rhizobium japonicum* for nodulation of field-grown soybeans. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, 47:607-612, 1984.
- NEVES, M.C.P. Interdependência fisiológica entre os componentes do sistema simbiótico *Rhizobium*-leguminosas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, 5:79-92, 1981.
- NUTMAN, P.S. The influence of the legumes in the root nodule symbiosis. **Biology Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, Cambridge, 31:109-151, 1956.
- NUTMAN, P.S. Some observations on root-hair infection by nodule bacteria. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, 10:250-263, 1959.
- OBUKOWICZ, M.G.; PERLAK, F.J.; KUSANO-KRETZMER, K.; MAYER, E.J.; BOLTEN, S.L.; WATRUD, L.S. Tn5-mediated integration of the delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* into the chromosome of root-colonizing pseudomonads. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, 168:982-989, 1986.
- OGRAM, A.; SAYLER, G.S.; BARKAY, T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, 7:57-66, 1987.

- PARKINSON, J.L. & ALLEN, S.E. A wet oxidation procedure suitable for the determination of nitrogen and mineral nutrients in biological material. **Communication in Soil Science and Plant Analysis**, New York, 6(1):1-11, 1975.
- PATE, J.S. & DART, P.J. The influence of inoculum strains and lime of application of ammonium nitrate on symbiotic response. **Pant and Soil**, The Hague, 15:329-345, 1961.
- PENA-CABRIALES, J.J. & ALEXANDER, M. Growth of *Rhizobium* in unamended soil. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, 47:81-84, 1983.
- PEREIRA, P.A.A., ARAUJO, R.S., ROCHA, R.E.M., STEINMETZ, S. Capacidade de genótipos de feijoeiro de fixar nitrogênio atmosférico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, 19(7):811-815, 1984.
- RATTRAY, E.A.S.; PROSSER, J.I.; KILLHAM, K.; GLOVER, L.A. Luminescence-based nonextractive technique for in situ detection of *Escherichia coli* in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, 56:3368-3374, 1990.
- RICE, W.A. & OLSEN, P.E. Inoculation of alfalfa seed for increase yield on moderately acid soil. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, 63:541-545, 1983.
- ROBERT, F.M. & SCHMIDT, E.L. Population changes and persistence of *Rhizobium phaseoli* in soil and rhizospheres. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, 45:550-556, 1983.
- ROBERTS, G.P., LEPS, W.T., SILVER, L.E., BRILL, W.J. Use of two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis to identify and classify *Rhizobium* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, 39:414-422, 1980.
- ROBERTS, G.P. & SCHMIDT, E.L. Somatic serogroups among 55 strains of *Rhizobium phaseoli*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, 31:519-523, 1985.

- ROSZAC, D.B. & COLWELL, R.R. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiology Reviews*, Washington, 51:365-379, 1987.
- ROUATT, J.W. & KATZNELSON, H. A study of the bacteria on the root surface and in the rhizosphere of crop plants. *Journal of Applied Bacteriology*, Reading, 24:164-171, 1961.
- RUSCHEL, A.P. & SAITO, S.M.T. Efeito da inoculação de *Rhizobium*, nitrogênio e matéria orgânica na fixação de nitrogênio em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, 1:21-24, 1977.
- RUSCHEL, A.P., SAITO, S.M.T., TULMANN NETO, A. Eficiência da inoculação de *Rhizobium* em *Phaseolus vulgaris* L. I- Efeito de fontes de nitrogênio e variedades. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Campinas, 3:13-17, 1979.
- SAITO, S.M.T. Avaliação em campo da capacidade de fixação simbiótica de estirpes de *Rhizobium phaseoli*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, 17(7):999-1006, 1982.
- SAITO, S.M.T. & FREITAS, J.R. Eficiência e especificidade hospedeira de *Rhizobium phaseoli* em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). "O Solo", Piracicaba, 1-2:71-75, 1982.
- SAITO, S.M.T. & RUSCHEL, A.P. Capacidade competitiva e de sobrevivência no solo de uma estirpe de *Rhizobium phaseoli* usada como inoculante. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 32:888-892, 1980.
- SAITO, S.M.T. & RUSCHEL, A.P. Influência da calagem, adubação fosfatada e micronutriente na nodulação natural do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). *Anais da E.S.A. "Luiz de Queiroz"*. 35:545-556, 1978.
- SCHOLLA, M.H., MOOREFIELD, J.A., ELKAN, G.H. DNA homology between species of the rhizobia. *Systematic and Applied Microbiology*, Stuttgart, 13:288-294, 1990.

- SIMON, R., PRIEFER, V., PIHLER, A. A broad host-range mobilisation system for in vivo genetic engineering: Transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. **Biological Technology** 1:784-791, 1983.
- SINGH, S.P. Patterns of variation in cultivated common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Economic Botany**, New York, 43(1):39-57, 1989.
- STACKEBRANDT, E. Phylogeny and phylogenetic classification of prokaryotes. In: SHELEIFER, K.H. & STACKEBRANDT, E. eds. **Evolution of prokaryotes**, London, Academic Press, 1985. p. 309-334.
- STOTZKY, G. Gene transfer among bacteria in soil. In: LEVY, S.B. & MILLER, R.V. eds. **Gene transfer in the environment**. New York, McGraw-Hill, 1989. p.165-222.
- STREIT, W., KOSCH, K., WERNER, D. Nodulation competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* and *Rhizobium tropici* strains measured by glucuronidase (GUS) gene fusions. **Biological Fertil. Soils** 14:140-144, 1992.
- SURIN, B.P. & DOWNIE, J.A. *Rhizobium leguminosarum* genes required for expression and transfer of host specific nodulation. **Plant Molecular Biology**, The Hague, 12:19-29, 1989.
- TAYLOR, R.W., WILLIAMS, M.L., SISTANI, K.R. Nitrogen fixation by soybean-*Bradyrhizobium* combinations under acidity, low P and high Al stress. **Plant and Soil**, The Hague, 131:293-300, 1991.
- TSAI, S.M., BONETTI, R., AGBALA, S.M., ROSSETTO, R. Minimizing the effect of mineral nitrogen on biological nitrogen fixation in common bean by increasing nutrient levels. **Plant and Soil**, The Hague, 152:131-138, 1993.
- TUZIMURA, K. & WATANABE, I. Different growth and survival of *Rhizobium* species in the rhizosphere of various plants in different sorts of soil. **Soil Science and Plant Nutrition**, Tokyo, 12:15-22, 1966.

- VAN BERKUM, P., NAVARRO, R.B., VARGAS, A.A.T. Classification of the uptake hydrogenase-positive (Hup⁺) bean rhizobia as *Rhizobium tropici*. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, 60:554-561, 1994.
- VARGAS, A.A.T. Tolerance of beans (*Phaseolus vulgaris* L.) and *Rhizobium leguminosarum* *bv. phaseoli* to low pH. Minnesota 1987. p.123 (PhD - University of Minnesota).
- VARGAS, A.A.T, ATHAYDE, J.T., SILVEIRA, J.S.M. Inoculação com rizóbios, adubação com macro e micronutrientes, e parcelamento do N mineral aplicados no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*, L.). **Energia Nuclear e Agricultura**, Piracicaba, 11(1):3-14, 1990.
- VARGAS, A. A. T. & GRAHAM, P.H. *Phaseolus vulgaris* variedade and *Rhizobium* strain variation in acid-pH tolerance and nodulation under acid conditions. **Field Crops Research**, Amsterdam, 19:91-101, 1988.
- VICENT, J.M. **Manual for the practical study of root nodule bacteria**. Oxford, 1970. p.164.
- VINCENT, J.M. Principles of strain selection. In: INTERNATIONAL GRASS CONGRESS, 7., 1956. **Proceedings**. v. 2, p.179-189.
- WALLACE, D.H. Physiological genetics of plant maturity, adaptation, and yield. **Plant Breeding Reviews**, Portland, 3:21-167, 1985.
- WILLETTS, N. & WILKINS, B. Processing of plasmid DNA during bacterial conjugation. **Microbiological Reviews**, Washington, 48:24-41, 1984.
- WILSON, K.J., SESSITSCH, A., CORBO, J.C., GILLER, K.E., AKKERMANS, A.D.L. e JEFFERSON, R.A. *B*-glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other Gram-negative bacteria. **Microbiology**, London, 142:1691-1705, 1995.

YOUNG, J.P.W. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In: STACEY, G.; BURRIS, H.R.; EVANS, H.J. eds. **Biological nitrogen fixation**. New York, Chapman & Hall, 1991. p. 104-151.

ZAAT, S.A.J., WIJFFELMAN, C.A., MULDER, I.H.M., VAN BRUSSEL, A.A.N., LUGTENBERG, B.J.J. Root exudates of various host plants of *Rhizobium leguminosarum* contain different sets of inducers of *Rhizobium* nodulation genes. **Plant Physiology**, Rockville, 86:1298-1303, 1988.

ZEVENHUIZEN, L.P.T.M. & BERTOCCHIO, C. Polysaccharide production by *Rhizobium phaseoli* and the typing of their excreted anionic polysaccharides. **FEMS Microbiological Letters**, Amsterdam, 65:211-218, 1989.

APÊNDICE.

APÊNDICE 1 - COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE CULTURA.

MEIO DE CULTURA YM.(VICENT, 1970)

K ₂ HPO ₄ (Sol. 5%)-----	5 ml.
MgSO ₄ .7H ₂ O (Sol. 2%)-----	5 ml.
CaCl ₂ .2H ₂ O (Sol. 2%)-----	5 ml.
NaCl (Sol. 1%)-----	5 ml.
FeCl ₃ (Sol. 0,1%)-----	5 ml.
Manitol -----	5 g.
Extrato de levedura -----	0,2 g.
Agar -----	8 g.
Água destilada -----	500 ml.

MEIO DE CULTURA LB.(MANIATIS et al., 1982)

Bacto-triptona -----	5 g.
Extrato de levedura -----	2,5 g.
NaCl -----	2,5 g.
Agar -----	8 g.
Água destilada -----	500 ml.

MEIO DE CULTURA MODIFICADO DE BROWN & DILWORTH.(1975)

MgSO ₄ .7H ₂ O -----	0,25 g.
CaCl ₂ .2H ₂ O -----	0,02 g.
NaCl -----	0,2 g.
KH ₂ PO ₄ -----	0,36 g.
K ₂ HPO ₄ -----	1,4 g.
FeCl ₃ -----	6,6 mg.
EDTA -----	0,15 mg.
Tiamina.HCl -----	1 mg.
Pantotenato de Ca -----	2 mg.
Biotina -----	0,25 mg.
Água destilada -----	1000 ml.

APÊNDICE 2 - COMPOSIÇÃO DA SOLUÇÃO NUTRITIVA.

SOLUÇÃO NUTRITIVA DE HOAGLAND.

Solução Estoque	Concentração (M)	ml/litro solução nutritiva
MgSO ₄ .7H ₂ O -----	1 -----	0,5
K ₂ SO ₄ -----	0,25 -----	1
K ₂ HPO ₄ -----	1 -----	0,4
HCl -----	1* -----	- 0,4
CaSO ₄ .2H ₂ O ^a -----		
Micronutrientes ^b -----		-- 1
Fe-EDTA ^c -----		-- 1

^a 0,17 gramas/litro

^b A solução estoque de micronutrientes contém: ácido bórico, 2,86 g/l;

cloreto de manganês II tetraidratado, 1,81 g/l; sulfato de cobre II pentaidratado, 0,08 g/l; sulfato de zinco heptaidratado, 0,22 g/l; ácido molibdico, 0,02 g/l.

^c Ferro complexado com ácido etilenodiamino tetracético (EDTA), com 24,9 g de sulfato de ferro II heptaidratado.

* Concentração 1 Normal.

A forma de nitrogênio acrescentada, quando necessário, foi NH₄NO₃.

APÊNDICE 3 - SOLUÇÃO PARA IDENTIFICAÇÃO DOS NÓDULOS.

Reagente	Concentração
Na-PO ₄ (tampão pH 7,0)-----	50 mM.
EDTA -----	1 mM.
Triton X-100 -----	0,1 %.
SDS -----	0,05 %.
Sarcosyl -----	0,1 %.
IPTG* -----	100 ug/ml.
X-gluc* -----	125 ug/ml.

*Solução estoque: - IPTG, 40 mg em 1 ml de água destilada. Filtrar em

"Millipore" 0,2 um.

- X-gluc, 50 mg em 1 ml de N,N-dimetilformamida. Não precisa filtrar.

Reagentes sensíveis a luz e alta temperatura, adicionar momentos antes de sua utilização.