

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

VARIABILIDADE DE ISOLADOS DE ESTIRPES DE *Bradyrhizobium*
spp RECOMENDADAS PARA A CULTURA DA SOJA

FABÍOLA GOMES DE CARVALHO
Engenheira-Agrônoma (UFRPE)
Mestre em Agronomia (UFRPE)

Tese apresentada como um dos requisitos para obtenção
do Grau de Doutor em Ciência do Solo

Porto Alegre (RS), Maio de 2003

FABÍOLA GOMES DE CARVALHO
Engenheira-Agrônoma - UFRPE
Mestre em Agronomia - UFRPE

TESE

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

DOUTOR EM CIÊNCIA DO SOLO

Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em:
Pela Banca Examinadora

Homologado em:
Por

PEDRO ALBERTO SELBACH
Orientador-PPG-Ciência do Solo

CARLOS ALBERTO BISSANI
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Ciência do Solo

ENILSON LUIZ SACCOL DE SÁ
PPG-Microbiologia Agrícola e do Ambiente - UFRGS

LUCIANO KAYSER VARGAS
FEPAGRO

ZAÍDA INÊS ANTONIOLLI
PPG-Ciência do Solo - UFSM

GILMAR ARDUINO B. MARODIN
Diretor da Faculdade de Agronomia

Dedico este trabalho a duas pessoas mais do que especiais em minha vida:

a minha mãe pelos bons exemplos que me transmitiu, pela torcida e boas vibrações que me renovaram as forças para alcançar mais esta conquista profissional;

a você Apolino meu marido querido, amigo e companheiro de todos os momentos, obrigado pelo estímulo e paciência durante a realização deste trabalho

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as oportunidades de aprender a cada dia novas lições de viver e saber.

Ao Prof. Pedro Alberto Selbach, pela orientação, confiança, amizade e apoio recebidos durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Enilson Luiz Saccol de Sá pela amizade e contribuições a esta pesquisa.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pela possibilidade de realização do curso.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao corpo docente da Pós-Graduação em Ciência do Solo e da Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, pelos conhecimentos transmitidos.

À Eliane Bangel, chefe do Laboratório de Microbiologia do MIRCEN – FEPAGRO, pela liberação das instalações do laboratório durante a análise de caracterização genética, pelo estímulo e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia do MIRCEN – FEPAGRO: Luciano Kayser, Gilmário e Jorge pelo apoio e amizade recebidos.

À pesquisadora do MIRCEN – FEPAGRO Dra. Andréia Mara Rotta de Oliveira pela amizade, estímulo e preciosa ajuda na realização das análises genotípicas deste trabalho.

Aos funcionários da UFRGS Jader, Denise, Maria do Carmo e Adão pela ajuda dispensada, e especialmente ao José (Zé) pela ajuda na condução dos experimentos em casa de vegetação.

iv

Aos colegas do PPG - Ciência do Solo da UFRGS pelo convívio fraterno durante todo o curso.

Aos amigos que fazem parte do Laboratório de Microbiologia do Solo da UFRGS: Antônia, Christine, César Crispim, José Antônio, Márcio e Rosângela pelo convívio alegre durante a realização deste trabalho.

Aos amigos Adriana Giongo e Mariel Bizarro pela ajuda, amizade e palavras de apoio.

A todos os meus amigos que sempre acreditaram em mim e torceram mesmo de longe para a realização deste trabalho.

Muito obrigado.

v

**VARIABILIDADE DE ISOLADOS DE ESTIRPES DE *Bradyrhizobium* spp
RECOMENDADAS PARA A CULTURA DA SOJA⁽¹⁾**

Autor: Fabíola Gomes de Carvalho
Orientador: Prof. Pedro Alberto Selbach

RESUMO

A produção da soja em escala comercial tem sido viabilizada técnica e economicamente, entre outros fatores, devido a fixação biológica do N₂ por estirpes de *Bradyrhizobium* que podem suprir a demanda de nitrogênio desta leguminosa. No entanto, a variabilidade existente nas estirpes de *Bradyrhizobium* spp recomendadas para inoculação da soja tem comprometido o processo simbiótico. Variantes espontâneos isolados a partir das estirpes de *B. japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) e *B. elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019) foram avaliados quanto ao desempenho simbiótico (eficiência, nodulação em diferentes hospedeiros e competitividade), indução de clorose foliar em diferentes hospedeiros, morfologia colonial, habilidade de metabolização de carboidratos e tolerância à salinidade em diferentes temperaturas de incubação. Nas etapas de eficiência simbiótica e competitividade foi usada a cultivar de soja BR-16 e na avaliação da nodulação e indução de clorose foliar foram usados os seguintes hospedeiros: soja (*Glycine max*) (cultivares Clark e Peking), caupi (*Vigna unguiculata*) e guandu (*Cajanus cajan*). A caracterização genotípica foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (PCR), com os oligonucleotídeos iniciadores BOX A 1-R, ERIC e RP01. Os resultados obtidos demonstraram que variantes e estirpes originais diferem quanto a características fenotípicas, e que diferenças nos perfis eletroforéticos de DNA analisados através da amplificação com os oligonucleotídeos iniciadores testados, evidenciaram a variabilidade genética presente entre as estirpes originais e os variantes selecionados. A cultivar de soja Clark, assim como caupi e guandu foram susceptíveis à rizobiotoxina produzida por estirpes e variantes de *B. elkanii*. Embora não se tenha verificado diferenças na nodulação em diferentes hospedeiros quando variantes ou estirpes de *B. japonicum* e *B. elkanii* foram inoculados em soja, caupi e guandu, foi observado uma simbiose eficiente para a soja (cultivares BR 16, Clark e Peking). A partir da variabilidade existente nas estirpes SEMIA 587, SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 5080 foram selecionados variantes eficientes e competitivos quanto à fixação de N₂ em soja.

(1) Tese de Doutorado em Ciência do Solo, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (104p.), maio, 2003.

Author: Fabíola Gomes de Carvalho
Adviser: Prof. Pedro Alberto Selbach

ABSTRACT

The commercial scale of soybean production has been made possible, technically and economically, among other factors, due to biological N₂ fixation with *Bradyrhizobium* strains that can supply the N demand of soybean. Otherwise, the symbiotic process of nitrogen fixation has been compromised due to the high variability among *Bradyrhizobium* spp strains. Spontaneous mutants isolated from *B. japonicum* (SEMIA 5079 and SEMIA 5080) and *B. elkanii* (SEMIA 587 and SEMIA 5019) strains were evaluated concerning symbiotic performance (efficiency, nodules formation in different host plants, competitiveness), foliar chlorosis induction to different host plants, colonies morphology, ability of carbohydrates metabolization and tolerance to the salinity in different incubation temperatures. The soybean cultivar BR-16 was used for testing symbiotic efficiency and competitiveness of original strains and spontaneous mutants. The soybean cultivars Clark and Peking, *Vigna unguiculata* and *Cajanus cajan* were used for testing nodules formation and foliar chlorosis induction. The genetic characterization was determined through the polymerase chain reaction (PCR) using the oligonucleotides BOX A 1-R, ERIC and RP01. The results showed that the spontaneous mutants and the original strains are different based on phenotypic characteristics and genetic variability through DNA amplification with specific oligonucleotides. The soybean cultivar Clark, *V. unguiculata* and *Cajanus cajan* were susceptible to rhizobitoxine produced by spontaneous mutants and original strains of *B. elkanii*. Although it was not observed differences in nodules formation when soybean, *V. unguiculata* and *Cajanus cajan* were inoculated with the spontaneous mutants and the original strains of *B. japonicum* and *B. elkanii*, it was observed a higher symbiosis efficiency in soybean (cultivars BR-16, Clark and Peking). It was possible to select efficient and competitive spontaneous mutants related to N₂ fixation in soybean due to the variability occurrence in strains SEMIA 587, SEMIA 5019, SEMIA 5079 and SEMIA 5080.

(1) Doctorate Thesis in Soil Science, Agronomy Faculty, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (104p.) - may, 2003.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1 A soja como planta hospedeira	03
2.1.1 Origem e dispersão da soja	03
2.1.2 Taxonomia e descrição botânica da espécie <i>Glycine max</i>	04
2.1.3 Características gerais da espécie <i>Glycine max</i>	05
2.2 O gênero <i>Bradyrhizobium</i> nodulador da soja	06
2.2.1 Taxonomia do microsimbionte	06
2.2.2 Características gerais do gênero <i>Bradyrhizobium</i>	08
2.3 Ocorrência de variantes ou derivados em estirpes de rizóbios e bradirrizóbios	09
2.3.1 Alteração de características simbióticas em variantes de rizóbios e bradirrizóbios	10
2.3.1.1 Eficiência simbiótica	11
2.3.1.2 Especificidade hospedeira	13
2.3.1.3 Competitividade nodular	18
2.4 Variabilidade genética em estirpes de rizóbios adaptadas aos solos	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Linhagens bacterianas	24
3.2 Local da pesquisa	24
3.3 Obtenção dos variantes de <i>Bradyrhizobium</i> spp	24
3.4 Seleção dos variantes de <i>Bradyrhizobium</i> spp	27
3.4.1 Detecção da atividade da hidrogenase pelo método de redução do azul de metileno	27
3.4.2 Eficiência simbiótica dos variantes selecionados	28
3.5 Nodulação e indução de clorose foliar em diferentes hospedeiros inoculados com variantes e estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> spp	29
3.6 Capacidade competitiva dos variantes de <i>Bradyrhizobium</i> spp	30
3.7 Caracterização dos variantes de <i>Bradyrhizobium</i> spp	31
3.7.1 Caracterização morfológica e alteração do pH do meio de cultura	31
3.7.2 Caracterização fisiológica e bioquímica	32
viii	
3.7.2.1 Tolerância à salinidade em temperaturas de incubação de 28°C e 35°C.....	32
3.7.2.2 Crescimento em diferentes fontes de carbono	32

3.7.3 Caracterização genética	33
3.7.3.1 Extração do DNA genômico	33
3.7.3.2 Perfis de amplificação com oligonucleotídeos iniciadores	35
3.7.3.3 Géis para análise de fragmentos amplificados por PCR	37
3.7.2.4 Análise de relacionamento genético	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Detecção da atividade da hidrogenase em variantes de <i>Bradyrhizobium</i> spp	38
4.2 Eficiência simbiótica dos variantes de <i>Bradyrhizobium</i> spp	41
4.3 Especificidade hospedeira de variantes e estirpes de <i>B. japonicum</i> e <i>B. elkanii</i>	49
4.4 Indução de clorose foliar em diferentes leguminosas inoculadas com estirpes e variantes de <i>Bradyrhizobium</i> produtoras de rizobiotoxina	59
4.5 Competitividade de estirpes e variantes de <i>Bradyrhizobium</i> spp.....	61
4.6 Caracterização morfológica e alteração do pH do meio de cultura de estirpes originais e variantes de <i>Bradyrhizobium</i> spp	70
4.7 Avaliação da tolerância de estirpes originais e variantes de <i>Bradyrhizobium</i> spp à salinidade e diferentes temperaturas de incubação	72
4.8 Capacidade de utilização de diferentes fontes de carbono por estirpes originais e variantes de <i>Bradyrhizobium</i> spp	76
4.9 Caracterização genética de estirpes e variantes de <i>B. japonicum</i> e <i>B. elkanii</i>	78
4.9.1 Amplificação com o oligonucleotídeo iniciador BOX A 1-R ...	78
4.9.2 Amplificação com o oligonucleotídeo iniciador ERIC	80
4.9.3 Análise conjunta dos perfis eletroforéticos com os oligonucleotídeos iniciadores ERIC e BOX A 1-R	83
4.9.4 Amplificação com o oligonucleotídeo iniciador RP01	84
5. CONCLUSÕES	88
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	89

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Relação das estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> spp utilizadas nos experimentos	25
2 Composição da mistura (master mix) para as reações de PCR para cada oligonucleotídeo iniciador	35
3 Programa dos ciclos para o oligonucleotídeo iniciador utilizado nas reações de amplificação dos DNA genômicos de estirpes e variantes de <i>Bradyrhizobium</i> spp	36
4 Expressão do fenótipo hidrogenase (hup) em variantes isolados das estirpes de <i>B. japonicum</i> (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) e <i>B. elkanii</i> (SEMIA 587 e SEMIA 5019)	39
5 Avaliação da nodulação (número e peso de nódulos secos) e da produção de matéria seca da parte aérea de soja (<i>Glycine max</i>) cultivar BR 16, inoculada com a estirpe SEMIA 5079 e seus variantes, aos 35 dias após o plantio	41
6 Avaliação da nodulação (número e peso de nódulos secos) e da produção de matéria seca da parte aérea de soja (<i>Glycine max</i>) cultivar BR 16, inoculada com a estirpe SEMIA 5080 e seus variantes, aos 35 dias após o plantio	43
7 Avaliação da nodulação (número e peso de nódulos secos) e da produção de matéria seca da parte aérea de soja (<i>Glycine max</i>) cultivar BR 16, inoculada com a estirpe SEMIA 587 e seus variantes, aos 35 dias após o plantio	44
8 Avaliação da nodulação (número e peso de nódulos secos) e da produção de matéria seca da parte aérea de soja (<i>Glycine max</i>) cultivar BR 16, inoculada com a estirpe SEMIA 5019 e seus variantes, aos 35 dias após o plantio	46
9 Avaliação da nodulação (número e peso de nódulos secos) e da produção de matéria seca da parte aérea de soja (<i>Glycine max</i>) cultivar Clark, inoculada com estirpes e variantes de <i>Bradyrhizobium</i> spp, aos 35 dias após o plantio	50
10 Avaliação da nodulação (número e peso de nódulos secos) e da produção de matéria seca da parte aérea soja (<i>Glycine max</i>) cultivar Peking, inoculada com estirpes e variantes de <i>Bradyrhizobium</i> spp, aos 35 dias após o plantio	51
11 Avaliação da nodulação (número e peso de nódulos secos) e da produção de matéria seca da parte aérea em caupi (<i>Vigna unguiculata</i>) cultivar IPA 206, inoculado com estirpes e variantes de <i>Bradyrhizobium</i> spp, aos 35 dias após o plantio	55
12 Avaliação da nodulação (número e peso de nódulos secos) e da produção de matéria seca da parte aérea em guandu (<i>Cajanus cajan</i>), inoculado com estirpes e variantes de <i>Bradyrhizobium</i> spp aos 35 dias após o plantio	56
x	
13 Avaliação dos sintomas de clorose foliar em <i>Glycine max</i> (cultivares Clark e Peking), <i>Vigna unguiculata</i> (cultivar IPA 206) e <i>Cajanus cajan</i> , inoculados com estirpes e variantes de <i>Bradyrhizobium</i> spp,	

	aos 35 dias após o plantio	59
14	Avaliação da nodulação (número e peso de nódulos secos) e da produção de matéria seca da parte aérea de soja (<i>Glycine max</i>) cultivar BR 16, inoculada com a estirpe SEMIA 5019 e/ou variantes de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> , a partir da adição de inóculos individuais ou mistos, aos 35 dias após o plantio	62
15	Avaliação da nodulação (número e peso de nódulos secos) e da produção de matéria seca da parte aérea de soja (<i>Glycine max</i>) cultivar BR 16, inoculada com estirpes e/ou variantes de <i>Bradyrhizobium elkanii</i> , a partir da adição de inóculos individuais ou mistos, aos 35 dias após o plantio	66
16	Caracterização morfológica das estirpes de <i>B. japonicum</i> (SEMIA 5079 e SEMIA 5080), <i>B. elkanii</i> (SEMIA 587 e SEMIA 5019) e variantes	71
17	Tolerância de estirpes de <i>B. japonicum</i> (SEMIA 5079 e SEMIA 5080), <i>B. elkanii</i> (SEMIA 587 e SEMIA 5019) e variantes a diferentes níveis de NaCl e temperaturas de incubação (28 e 35°C), medida através do diâmetro colonial	73
18	Habilidade para utilização de diferentes fontes de carboidratos em meio WC por estirpes e variantes de <i>B. japonicum</i> e <i>B. elkanii</i>	76

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Resultado da análise de expressão da hidrogenase “in vitro” em culturas selecionadas a partir do isolamento de nódulos das estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 (<i>B. japonicum</i>) SEMIA 587 e SEMIA 5019 (<i>B. elkanii</i>)	38
2 Índices de eficiência relativa dos tratamentos inoculados com estirpes originais e variantes de <i>B. japonicum</i> em relação ao N total acumulado em soja (<i>Glycine max</i>) cultivar BR 16, aos 35 dias após o plantio	47
3 Índices de eficiência relativa dos tratamentos inoculados com estirpes originais e variantes de <i>B. elkanii</i> em relação ao N total acumulado em soja (<i>Glycine max</i>) cultivar BR 16, aos 35 dias após o plantio	48
4 Índices de eficiência relativa dos tratamentos inoculados com estirpes e variantes de <i>B. japonicum</i> e <i>B. elkanii</i> em relação a produção de matéria seca de soja (<i>Glycine max</i>) cultivar Clark, aos 35 dias após o plantio	52
5 Índices de eficiência relativa dos tratamentos inoculados com estirpes e variantes de <i>B. japonicum</i> e <i>B. elkanii</i> em relação a produção de matéria seca de soja (<i>Glycine max</i>) cultivar Peking, aos 35 dias após o plantio	52
6 Índices de eficiência relativa dos tratamentos inoculados com estirpes e variantes de <i>B. japonicum</i> e <i>B. elkanii</i> em relação à produção de matéria seca de caupi (<i>Vigna unguiculata</i>) cultivar IPA 206, aos 35 dias após o plantio	57
7 Índices de eficiência relativa dos tratamentos inoculados com estirpes e variantes de <i>B. japonicum</i> e <i>B. elkanii</i> em relação à produção de matéria seca de guandu (<i>Cajanus cajan</i>), aos 35 dias após o plantio	58
8 Índices de eficiência relativa dos tratamentos inoculados com variantes de <i>B. japonicum</i> e/ou a estirpe SEMIA 5019, em relação ao N total acumulado em soja (<i>Glycine max</i>) cultivar BR 16, aos 35 dias após o plantio	63
9 Porcentagem de ocupação nodular dos tratamentos inoculados com variantes de <i>B. japonicum</i> e a estirpe SEMIA 5019, isolados e em mistura (1:1)	65
10 Índices de eficiência relativa dos tratamentos inoculados com estirpes e/ou variantes de <i>Bradyrhizobium elkanii</i> , em relação ao N total acumulado em soja (<i>Glycine max</i>) cultivar BR 16, aos 35 dias após o plantio	67
11 Porcentagem de ocupação nodular dos tratamentos inoculados com variantes e estirpes de <i>B. elkanii</i> , isolados e em mistura (1:1)	68
xii	
12 Crescimento da estirpe SEMIA 5080 e seus variantes 1B, 3B e 4B em meio YMA suplementado com 2,0% (A) e 5,0% (B) de NaCl sob temperatura de incubação de 28°C	75

13	Perfil eletroforético dos produtos de amplificação do DNA de estirpes e variantes de <i>Bradyrhizobium</i> spp pelo oligonucleotídeo iniciador BOX A 1-R	78
14	Dendrograma de estirpes e variantes de <i>Bradyrhizobium</i> spp, construído pelo método UPGMA e o coeficiente de Jaccard, baseado nos perfis eletroforéticos dos produtos de amplificação com o oligonucleotídeo iniciador BOX A 1-R	79
15	Perfil eletroforético dos produtos de amplificação do DNA de estirpes e variantes de <i>Bradyrhizobium</i> spp pelo oligonucleotídeo iniciador ERIC	81
16	Dendrograma de estirpes e variantes de <i>Bradyrhizobium</i> spp, construído pelo método UPGMA e o coeficiente de Jaccard, baseado nos perfis eletroforéticos dos produtos de amplificação com o oligonucleotídeo iniciador ERIC	81
17	Dendrograma de estirpes e variantes de <i>Bradyrhizobium</i> spp, construído pelo método UPGMA e o coeficiente de Jaccard, baseado nos perfis eletroforéticos dos produtos de amplificação com os oligonucleotídeos iniciadores BOX A 1-R + ERIC 1-R, ERIC-2	83
18	Perfil eletroforético dos produtos de amplificação do DNA de estirpes e variantes de <i>Bradyrhizobium</i> spp pelo oligonucleotídeo iniciador RP01	85
19	Dendrograma de estirpes e variantes de <i>Bradyrhizobium</i> spp, construído pelo método UPGMA e o coeficiente de Jaccard, baseado nos perfis eletroforéticos dos produtos de amplificação com o oligonucleotídeo iniciador RP01	85

2. REVISÃO DE LITERATURA

A soja como planta hospedeira

2.1.1 Origem e dispersão da soja

A soja é uma das mais antigas plantas cultivadas do mundo, havendo relatos na literatura sobre o seu aparecimento há mais de cinco mil anos (Hymowitz, 1970). Com base na distribuição da espécie Glycine soja, provável ancestral da soja atualmente cultivada, o centro de origem desta cultura seria o Leste da Ásia, sendo hoje considerado como o seu centro genético primário a região Central da China e a Manchúria como o seu centro genético secundário (Costa, 1996).

O cultivo da soja permaneceu restrito ao Oriente até o final do século XV e início do século XVI, quando então foi introduzida na Europa, porém somente a partir do início do século XX, com a transferência de germoplasma básico do Oriente, é que houve de fato a expansão da soja no Ocidente, tendo a sua exploração comercial começado pelos Estados Unidos (Costa, 1996). O fornecimento dos núcleos genéticos básicos para testes e seleção de variedades melhor adaptadas ao Ocidente tornou esta leguminosa a mais importante oleaginosa sob cultivo extensivo em produção no mundo (Hymowitz, 1970).

A introdução da soja na América do Sul é datada do final do século XIX, e no Brasil desde 1882 já existiam relatos sobre o cultivo da espécie Soja hispida no Estado da Bahia (D'utra, 1882, apud Vargas & Hungria, 1997). A partir de 1892 foram iniciados os primeiros testes de adaptação com a cultura no Instituto Agrônomo de Campinas, cujas pesquisas foram responsáveis posteriormente pela “tropicalização da soja” (Freire & Verneti, 1999), cabendo também ao IAC o pioneirismo em pesquisas sobre isolamento e seleção de estirpes de rizóbio no Brasil (Hungria et al., 1994).

No Brasil a produção da soja em escala comercial foi impulsionada inicialmente no Estado do Rio Grande do Sul na década de 40, com o estabelecimento do programa oficial de incentivo à triticultura, por ser a soja a melhor alternativa para sucessão do trigo no período do verão (Magalhães, 1981). A partir de 1950, a área plantada com soja continuou a se

expandir no país com a inclusão dos Estados de Santa Catarina e Paraná e, após se estabelecer na região Sul, a soja se disseminou para outras regiões do território nacional. Durante a década de 70, devido a programas de incentivos e desenvolvimento de novas técnicas de cultivo a soja se estabeleceu na Região do Planalto Central Brasileiro como cultura dominante (Vargas & Hungria, 1997). Atualmente, a soja é cultivada em uma área de 15 milhões de hectares, sendo responsável por uma produção de mais de 40 milhões de toneladas de grãos, o que torna o Brasil o segundo maior produtor mundial (IBGE, 2001).

No Brasil a transição da soja de lavoura doméstica ao cultivo comercial tornou-se possível graças ao trabalho pioneiro de pesquisadores que, através do melhoramento genético das variedades melhor adaptadas às novas condições edafoclimáticas de cultivo em conjunto com programas de seleção de estirpes de rizóbio eficientes na fixação de nitrogênio atmosférico, contribuíram para a sua expansão ao nível nacional. Atualmente, a soja é uma das culturas que apresenta maior relevância no cenário agrícola mundial, não apenas pelo valor bruto de seus grãos, mas sobretudo pelo valor dos produtos agregados a sua produção (Embrapa, 2002)

Taxonomia e descrição botânica da espécie Glycine max

De acordo com Herman (1962) apud Boddey (1995) a atual classificação sistemática da soja é a seguinte:

Reino: Plantae; Sub-reino: Cormobionta; Divisão: Spermatophyta; Subdivisão: Angiospermae; Classe: Dicotyledoneae; Sub-classe: Archichlamyidae; Ordem: Rosales; Subordem: Leguminosinae; Família: Leguminosae; Subfamília: Papilionaceae (Fabaceae); Tribo: Phaseoleae; Subtribo: Phaseolinae (Glyciniae); Gênero: Glycine; Subgênero: Glycine subg. Soja (Moench); Espécie: Glycine max (L.) Merril.

Embora na usual classificação sistemática a soja seja classificada como pertencente à família Leguminosae, alguns taxonomistas a classificam como pertencente à família Fabaceae, adotando a proposta sugerida por Delorit & Gunn (1986) apud Hungria et al. (1994), que subdivide a família Leguminosae, criando a subfamília Fabaceae na qual a soja estaria incluída.

A espécie Glycine max destaca-se dentro do gênero Glycine, devido a sua importância econômica e elevado valor nutricional. Na descrição botânica geral a espécie Glycine max é uma planta herbácea anual, que apresenta caule ereto, ramificado e piloso, normalmente com a altura variando de 30 a 150 cm. As folhas primárias são unifolioladas e opostas e as demais folhas são trifolioladas e pinadas. Apresenta pequenas flores reunidas em cachos

curtos com coloração branca, rosada ou violácea, que uma vez polinizadas originam vagens oblongadas e pilosas, com uma a cinco sementes. As sementes são lisas, ovóides ou globosas, possuindo hilo quase sempre castanho, mas cuja coloração varia de acordo com a variedade. O sistema radicular tem forma de raiz pivotante com numerosas raízes laterais (Gomes, 1990).

2.1.3 Características gerais da espécie *Glycine max*

A soja apresenta duas fases de desenvolvimento: a fase vegetativa, com cinco estádios, e a fase reprodutiva, com oito estádios. A completa maturação da soja pode variar de 75 dias para as variedades precoces e 200 dias para as variedades tardias (Hungria et al., 1997). No Brasil, a soja é classificada em quatro grupos de maturação: precoce, semiprecoce, tardia e semitardia e, dependendo da região onde a soja é cultivada, uma quinta classificação pode ser incluída, a de média maturação (Embrapa, 1993).

A necessidade total de água na cultura da soja varia entre 450 e 800mm, dependendo das condições climáticas, do manejo da cultura e da duração do ciclo (Embrapa, 2002). Embora esta leguminosa seja considerada como tolerante ao estresse hídrico, é nos períodos de germinação-emergência e floração-enchimento dos grãos que a disponibilidade de água torna-se extremamente importante para o seu desenvolvimento. Na fase da germinação-emergência, o teor de água no solo deve ficar na faixa de 50-85% do total máximo de água disponível, pois tanto o excesso quanto o déficit de água são prejudiciais à obtenção de uma boa uniformidade na população de plantas e o estabelecimento da simbiose Bradyrhizobium/leguminosa (Embrapa, 2002).

O desenvolvimento da soja ocorre em uma ampla faixa de temperatura (20-30°C). Entretanto, tem sido relatado que temperaturas elevadas ocasionam distúrbios sobre a floração e a maturação, enquanto que as temperaturas mais baixas reduzem ou paralisam o crescimento vegetativo (Embrapa, 2002).

A adaptação de diferentes cultivares a determinadas regiões climáticas depende, além das exigências hídricas e térmicas, de sua exigência fotoperiódica. A soja é considerada uma planta de dias curtos. Assim, em função dessa característica, é determinada a faixa de adaptabilidade de uma cultivar, sendo a sensibilidade ao fotoperíodo uma característica variável entre cultivares (Vargas & Hungria, 1997).

Dentre os elementos mais exigidos para a nutrição da soja estão o nitrogênio e o potássio, seguidos dos elementos cálcio, magnésio, fósforo e enxofre. Para suprir a alta demanda de nitrogênio, tão necessário para constituição e reservatório de proteínas nos grãos, a soja

recorre às formas do elemento disponíveis no solo. Como nos solos do Brasil os teores deste elemento são baixos, e sendo a prática da utilização de adubos nitrogenados inviável economicamente para complementar o N fornecido pelo solo, a reposição via associação simbiótica com bactérias que apresentam capacidade de fixação do N₂ atmosférico tornou-se a forma usual e econômica de fornecimento deste elemento para a soja (Embrapa, 2002).

2.2 O gênero *Bradyrhizobium nodulador da soja*

2.2.1 Taxonomia do microssimbionte

As bactérias que fixam nitrogênio atmosférico através de nódulos em raízes de leguminosas foram em princípio enquadradas no gênero *Rhizobium* sendo a denominação das espécies pertencentes a este gênero baseada essencialmente, na interação seletiva do hospedeiro, de acordo com os chamados grupos de inoculação cruzada (Fred et al., 1932 apud Bangel, 2000). A partir do reconhecimento dos grupos de inoculação cruzada, as bactérias responsáveis pela nodulação da soja foram classificadas como *Rhizobium japonicum*. Devido às limitações do método da infecção em plantas e às diferenças existentes nas espécies pertencentes a este gênero, tornou-se claro que os rizóbios consistiam em um grupo de bactérias bastante diverso, o que levou posteriormente a sua divisão em dois grupos, um de crescimento rápido e outro de crescimento lento, embora a divisão do gênero *Rhizobium* em duas classes, de acordo com o tempo de geração, já houvesse sido sugerida por Lohnis & Hansen (1921) apud Santos (1998).

Jordan (1982) ao reclassificar algumas espécies de rizóbios, baseando-se em características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e genéticas para diferenciá-las, separou as que apresentavam crescimento lento em um novo gênero denominado *Bradyrhizobium*. Entre as espécies reclassificadas por Jordan (1982) estava a espécie *R. japonicum*.

Na década de 80 e início da década de 90, vários trabalhos começaram a demonstrar que existia grande variabilidade genética e fisiológica entre as estirpes de *B. japonicum* (Hollis et al., 1981; Stanley et al., 1985; Minamisawa et al., 1990). Inicialmente, estudos desenvolvidos por Hollis et al. (1981) com diversas espécies de *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* e *Agrobacterium* usando técnicas de hibridização de DNA-DNA, demonstraram que as estirpes de *B. japonicum* poderiam ser divididas em dois grupos principais de homologia de DNA. Stanley et al. (1985) observaram através da hibridização do gene *nifDH* e de sequências homólogas dos genes *nod*, que as estirpes de *B. japonicum* apresentavam dois genótipos distintos, denominados sTI e sTII. A confirmação que as estirpes de *B. japonicum* de fato era composta por diferentes espécies, veio através de trabalhos posteriores envolvendo a hibridização do DNA com o gene *hup* (van Berkum, 1990), sequenciamento dos genes *nifDK* e *nifE* (Minamisawa, 1990; Minamisawa et al., 1992) e análises de

sequenciamento do 16S rRNA (Young et al., 1991; Rumjanek et al., 1993). Entretanto, nem todas as estirpes estudadas se enquadravam totalmente nos dois grupos propostos, havendo então um grupamento intermediário entre estes, o qual foi denominado genótipo misto (Minamisawa, 1989).

As diferenças genéticas inicialmente demonstradas por Hollis et al. (1981) na espécie *B. japonicum*, originaram novos estudos buscando correlacionar características fenotípicas e genéticas relatadas nos grupos I e II nesta espécie (Huber et al., 1984; Kuykendall et al., 1988; Minamisawa, 1990; Minamisawa & Fukai, 1991). Os resultados obtidos nestes estudos levaram Kuykendall et al. (1992), a sugerirem a subdivisão de *B. japonicum* em duas espécies: *B. japonicum*, com as estirpes do grupo I (I e Ia) e *B. elkanii*, com as estirpes do grupo II, sendo esta nova nomenclatura aceita e validada pelo International Journal of Systematic Bacteriology a partir de 1993. Recentemente, uma nova espécie de *Bradyrhizobium* que nodula *Glycine max* e *Glycine soja* foi isolada na República Popular da China por Xu et al. (1995), sendo proposto o nome de *B. liaoningense* para a sua nomenclatura, e indicada como estirpe padrão para a espécie a estirpe ESG 2281.

Embora os estudos mostrando diferenças entre estirpes de *B. japonicum* tenham sido iniciados nos Estados Unidos na década de 80, poucas análises semelhantes foram realizadas, até recentemente, com as estirpes "brasileiras", ou seja, as estirpes que foram ou são utilizadas em estudos de inoculantes no Brasil (Boddey, 1995).

Em um trabalho realizado por Rumjanek et al. (1993) baseado na análise de alguns parâmetros, como assimilação da amônia pela glutamina sintetase (GS) *in vitro* e hibridização com a sequência 16S rRNA, as duas principais estirpes de *B. japonicum* (SEMIA 5019 e a SEMIA 587) recomendadas comercialmente para inoculantes, foram definidas como membros da espécie *B. elkanii*. Lunge (1993) através de um estudo com onze oligonucleotídeos iniciadores arbitrários e análise de RAPD, observou que algumas estirpes "brasileiras" diferenciavam-se, embora não tenha sido feita nenhuma correlação com a divisão em genótipos ou espécies. Análises posteriores utilizando técnicas de PCR (Sato, 1999) e características fenotípicas (Lemos, 1994; Bodey & Hungria, 1995) constataram a existência de dois agrupamentos envolvendo as quatro estirpes "brasileiras" o primeiro formado pelas estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 e o segundo formado pelas estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019. Atualmente as estirpes de bradirrizóbios que nodulam a soja e que são recomendadas para produção de inoculantes no Brasil, são classificadas como *B. japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) e *B. elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019) (Bangel, 2000).

2.2.2 Características gerais do gênero *Bradyrhizobium*

As bactérias pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* se caracterizam por apresentar crescimento lento, com tempo de geração de 7 a 13 horas e alcalinização do meio de cultivo levedura-manitol, contendo azul de bromotimol como indicador de pH. Os bradirrizóbios são predominantemente aeróbios e quimiorganotróficos, também não esporulam, são Gram-negativos e possuem a forma de bastonete, com tamanho variável de 0,5-0,9 x 1,2-3,0 μm , sendo a sua mobilidade dada por um flagelo polar ou subpolar. Grânulos de poli- β -hidroxibutirato são encontrados com frequência no interior das células. A temperatura ótima para o seu crescimento ocorre entre 25 e 30°C e em meio de cultivo levedura-manitol apresentam colônias brancas, circulares, convexas e opacas, raramente translúcidas, tendendo a ser granulares na textura, seu tamanho não excede a um milímetro de

diâmetro para um período de incubação de 5 a 7 dias. As bactérias pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* são capazes de induzir a nodulação em leguminosas tropicais e temperadas (Somasegran & Hobben, 1994; Holt et al., 1994).

2.3 Ocorrência de variantes ou derivados em estirpes de rizóbios e bradirrizóbios

A ocorrência de mutações espontâneas nas estirpes das coleções de culturas de rizóbios e bradirrizóbios, tem representado um problema potencial para a manutenção e indicação de estirpes para estudos de taxonomia e fabricação de inoculantes, uma vez que estas mutações podem alterar importantes características genéticas e fisiológicas, interferindo inclusive com a eficiência simbiótica das estirpes (Mullen & Wollum II, 1989).

O manuseio das culturas matrizes seja através de subcultivos, processos de preservação ou estocagem durante períodos prolongados, pode resultar em culturas com características distintas da estirpe original (Meyer & Pueppke, 1980; Sato, 1995). Mullen & Wollum II, (1989) observaram que a estirpe USDA 110 de B. japonicum, após ter sido submetida aos processos de isolamento e manutenção originou um variante pouco efetivo, caracterizado por formar colônias diferentes, sem produção de exopolissacarídeos.

Flores et al. (1988), observaram que após o cultivo da estirpe CFN 285 de Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli por um ano em laboratório livre de quaisquer fatores de estresse, aproximadamente 35% do total de células apresentaram diferenças morfológicas quando comparadas às culturas originais. Observações semelhantes foram relatadas por Lemos et al. (1994), quando isolaram variantes em estirpes de Rhizobium leguminosarum bv phaseoli (SEMIA 476) e R. leguminosarum bv viciae (SEMIA 335) que apresentaram diferenças quanto à morfologia colonial e perfis isoenzimáticos.

Segundo Pinto et al. (1998), a alta variabilidade genética verificada em estirpes capazes de nodular feijoeiro ocorre devido a reiteraões (recombinações e/ou deleções) de certos elementos no genoma. Assim, estirpes de Rhizobium spp poderiam ser consideradas como coleções heterogêneas de organismos similares, mas não idênticos, podendo comprometer a sua utilização em inoculantes comerciais (Pinto et al., 1998).

Processos de preservação de culturas como a liofilização, podem gerar a perda ou afetar a constituição do material que se encontra mais externo a parede celular dos microrganismos (Sato, 1995). Rhougley (1976), observou que o aparecimento de variantes coloniais em culturas liofilizadas de Bradyrhizobium específicas para Vigna unguiculata e Lupinus albus, estava diretamente correlacionado a perda de eficiência e atraso no início da formação de nódulos.

O aparecimento de variantes na estirpe de B. elkanii SEMIA 587 foi observado por Sato (1995), após o uso de meios de suspensão durante o processo de liofilização. Segundo a

autora a liofilização provavelmente facilitou a seleção de variantes, uma vez que alguns dos isolados diferiram quanto à fermentação de carboidratos, resistência a antibióticos e fixação de nitrogênio, sem contudo apresentar variações quanto as suas características antigênicas e perfil da isoenzima α -esterase.

Ao analisarem culturas de *Bradyrhizobium sp.*, Herridge & Rougley (1975) observaram a presença de dois a três tipos coloniais, em 12 das 17 culturas de *Bradyrhizobium sp.* analisadas. A presença de dois ou mais variantes em culturas de *B. japonicum* foi considerada por Sylvester-Bradley et al. (1989) como um fenômeno comum nestes microrganismos.

2.3.1 Alteração de características simbióticas em variantes de rizóbios e bradirrizóbios

Em geral ao serem comparados às estirpes parentais, os variantes, apresentam alteração de importantes características simbióticas, que envolve desde a perda de infectividade (Kuykendall & Elkan, 1976) a alterações na eficiência e potencial de competição por sítios nodulares (Mullen & Wollum II, 1989). Desta forma, acredita-se que estirpes do mesmo sorogruppo de reação ou variantes genéticos da mesma estirpe poderiam estar fazendo parte de um mesmo material biológico, condicionando uma menor expressão na fixação do nitrogênio (eficiência em fixar N_2 e capacidade competitiva) (Meyer & Pueppke, 1980; Kozusny-Andreani, 1997).

2.3.1.1 Eficiência simbiótica

Diversos autores tentaram correlacionar diferentes parâmetros fenotípicos a características simbióticas, com a finalidade de identificar alguma característica ou fator que estivesse envolvido com a alteração da eficiência simbiótica de variantes e derivados, porém os resultados foram muito contraditórios (Eaglesham et al., 1987; Mullen & Wollum II, 1989; Fuhrmann, 1990; Vasilas & Fuhrmann, 1993).

Kozusny-Andreani (1992) ao isolar variantes da estirpe de *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 6158, incapazes de metabolizar carboidratos, observou que alguns variantes apresentaram diferenças no perfil eletroforético de LPS e das isoenzimas α e β -esterase, diferindo também quanto à capacidade simbiótica.

Kuykendall & Elkan (1976) observaram que a estirpe de *B. japonicum* 3I1b110 continha pelo menos quatro tipos de colônias, duas das quais apresentaram pouco crescimento em

meio contendo manitol como fonte de carbono e que os dois tipos de variantes coloniais crescidos neste meio nodularam Glycine max ineficientemente, e por terem estes tipos coloniais se tornado dominantes pela utilização do manitol no meio de cultivo foram repassados e distribuídos durante cinco anos. Contudo, Mathis et al. (1986) estudando características metabólicas na estirpe de B. japonicum USDA 110, isolaram um derivado capaz de metabolizar manitol (MN-110) que demonstrou ser simbioticamente eficiente. Assim, os resultados conflitantes entre os trabalhos desenvolvidos por Kuykendall & Elkan (1976) e Mathis et al. (1986), servem para enfatizar que a utilização de determinada fonte de carbono ou a observação da morfologia colonial não devem ser tomadas individualmente como indicadores de eficiência simbiótica entre variantes.

Ao avaliar a eficiência simbiótica de variantes de Bradyrhizobium isolados das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 em duas cultivares de soja (IAS 5 e Jacuí 7), Kober (1997) observou que, os variantes 587-P7 e 5019-P, que possuíam colônias pequenas e com pouca goma, foram mais competitivos, apresentando uma alta eficiência relativa na fixação de N₂ em relação à testemunha nitrogenada nas duas cultivares de soja estudadas.

Há indicações que a produção de rizobiotoxina em conjunto com a ausência da enzima hidrogenase esteja relacionada à inferioridade simbiótica, com menor fixação de N₂ e menores concentrações de clorofila e proteína nas folhas (Teaney III & Fuhrmann, 1992; Vasilas & Fuhrmann, 1993).

Minamisawa (1989) ao estudar a expressão da hidrogenase e produção de rizobiotoxina por estirpes de *Bradyrhizobium* noduladoras da soja, observou que estirpes produtoras e não produtoras de rizobiotoxina se diferenciavam quanto à morfologia colonial, sendo sugerido pelo autor que a quantidade e/ou a composição dos polissacarídeos celulares estaria relacionada com a produção de rizobiotoxina nas diferentes espécies de *Bradyrhizobium* estudadas.

Fuhrmann (1990) observou que o sintoma de clorose foliar e o menor acúmulo de N-total em soja, estavam relacionados às colônias grandes e mucóides presentes em estirpes de *B. japonicum* pertencentes aos sorogrupos 31, 46, 76, 94, 130. Entretanto, Eaglesham et al. (1987) já haviam constatado que os sintomas de clorose foliar em ervilhaca, estavam associados às bactérias isoladas desta leguminosa, que apresentavam colônias pequenas e opacas.

Variantes de rizóbio que apresentaram colônias grandes e gomosas ou pequenas e secas, parecem não apresentar um padrão coerente de resposta a fixação de nitrogênio, impossibilitando assim se traçar qualquer relação entre morfologia colonial e efetividade simbiótica (Sá, 1987; Basit et al., 1991).

*A identificação de sistemas enzimáticos no microsimbionte que gerem uma maior eficiência à associação simbiótica rizóbio/leguminosa é citada como estratégia para seleção de estirpes mais eficientes, por exemplo: a presença do complexo enzimático hidrogenase está relacionada a uma maior eficiência simbiótica em estirpes do grupo I (*B. japonicum*), uma vez que indivíduos que apresentam o fenótipo hup⁺ (hidrogenase positiva), apresentam um*

melhor aproveitamento energético na redução de N₂ atmosférico durante o processo de fixação simbiótica, sendo capazes de reciclar os íons hidrogênio liberados e, assim recuperar parte da energia perdida (Fuhrmann, 1993). Minamisawa (1989) observou que o fenótipo hup⁺, restrito ao grupo I, é consistente com a presença de genes estruturais hup. Segundo o autor, a ausência dos genes estruturais nas estirpes do grupo II (B. elkanii) tem sido relacionada à ineficiência simbiótica neste grupo de bradirrizóbios.

Em sistemas simbióticos eficientes tem sido observada uma porcentagem mais elevada de nitrogênio transportado na seiva do xilema sob a forma de ureídos (Hungria & Neves, 1986; Neves et al., 1985). Estirpes de rizóbio que contém hidrogenases são capazes de produzir seiva contendo uma maior fração destes solutos nitrogenados, o que tem resultado numa maior produção de grãos (Neves, 1982 apud Neves & Rumjanek, 1992). Existe a possibilidade de que o hidrogênio possa, de alguma forma, modificar as vias de assimilação da amônia presentes na célula vegetal (Neves, 1982 apud Neves & Rumjanek, 1992).

2.3.1.2 Especificidade hospedeira

A especificidade hospedeira é representada pela habilidade de uma estirpe de rizóbio em induzir a nodulação e/ou fixar N₂ quando associada a cultivares ou espécies do hospedeiro específico, sendo por isso uma importante característica a ser considerada em programas de seleção de novas estirpes (Peres et al., 1993).

O mecanismo de reconhecimento entre macro e microsimbionte obedece a um complexo conjunto de informações genéticas, entre a planta e bactéria (Perret et al., 2000). De acordo com Cardoso & Freitas (1992) os rizóbios seriam, na realidade, parasitas extremamente refinados, que através de uma evolução conjunta com o hospedeiro transformaram o processo parasitário em simbiótico, causando muito mais benefícios do que danos. Tal afirmação se baseia no fato de que vários genes necessários para parasitismo e amplitude de hospedeiros em *Rhizobium* são similares àqueles presentes em *Agrobacterium*, uma bactéria patogênica em plantas, também classificada na família *Rhizobiacea* (Perret et al., 2000).

A formação dos nódulos ocorre em várias etapas, envolvendo mudanças fisiológicas e morfológicas tanto na célula hospedeira como na bactéria. As mudanças na bactéria visam principalmente, o recebimento de fontes de carbono da planta hospedeira e no hospedeiro as modificações têm como objetivo a assimilação da amônia produzida pelas bactérias (bacteróides) (Neves & Rumjanek, 1996).

Diversos eventos pré-infecção antecedem a formação do nódulo, incluindo estímulo ao rizóbio, ativação dos genes de nodulação, adesão da bactéria a sítios específicos da superfície radicular e a troca de sinais moleculares entre o hospedeiro e a bactéria. A partir da troca de sinais é que serão desencadeadas a indução ou repressão dos genes envolvidos na nodulação, podendo estes sinais também atuar sobre a atividade dos produtos destes genes (Long, 2001).

Inicialmente, o rizóbio é quimiostaticamente atraído para a rizosfera por compostos (aminoácidos ou açúcares) exsudados pela leguminosa. Em seguida, ocorre uma interação química específica entre a bactéria e a planta hospedeira, mediada pela produção de flavonóides (Caetano-Anoles et al., 1988). Os flavonóides (complexos fenólicos) são indutores potentes e a presença de diversos indutores em baixas concentrações pode resultar numa resposta sinérgica da expressão dos genes envolvidos na nodulação, resultando na biossíntese e secreção dos fatores Nod pelo rizóbio (Long, 2001). Uma considerável especificidade tem sido relatada nesta interação, por exemplo, luteolina é o principal flavonóide de *Sinorhizobium meliloti* ao passo que naringenina e genisteína são necessários para *Bradyrhizobium japonicum* (Hungria et al., 1994).

A especificidade entre parceiros compatíveis teoricamente minimizaria as chances de infecção por patógenos e formação de associações inefetivas que seriam prejudiciais a ambos simbioses (Perret et al., 2000). Contudo, Yuen et al. (1995) *apud* Vargas & Hungria (1997), relataram que moléculas liberadas por não-hospedeiros, também são capazes de induzir os genes *nod*, por exemplo, duas xantonas presentes em *Haploclathra* spp, induziram genes de nodulação em *B. japonicum*. Porém, conforme afirmado por Vargas & Hungria (1997), atualmente só existem especulações sobre o significado ecológico da indução dos genes de nodulação por não hospedeiros.

A interação dos flavonóides com o produto do gene *nodD*, resulta na indução da expressão dos genes envolvidos na nodulação (Schalaman et al., 1998). Os genes induzidos passam a sintetizar proteínas que são responsáveis pela síntese de oligossacarídeos lipoquitínicos (LCO) ou fatores Nod (Carlson et al., 1993). Estes fatores Nod quando liberados em baixas concentrações ($<10^{-9}$) pela bactéria e, sendo reconhecidos pelas células da raiz, desencadearão uma série de alterações tais como: deformação e encurvamento de pêlos radiculares, divisão de células do córtex da raiz, e formação de um cordão de infecção, que permitirá a entrada de bactérias e posterior desenvolvimento do nódulo (Hungria et al., 1994).

A composição química dos fatores Nod varia com o microssimbionte, mas via de regra apresenta uma molécula central de N-acetilglucosamina com ligações do tipo β -1,4 e diferentes radicais acoplados (Geremia et al., 1994). Embora, os fatores Nod nas diversas espécies de rizóbio tenham a mesma estrutura, a atuação enzimática dos diversos genes de especificidade através da adição de diferentes radicais à molécula básica do LCO, torna o sinal molecular (fator Nod) específico para cada hospedeiro (John et al., 1993).

De acordo com Stacey et al. (1994) a especificidade hospedeira em *B. japonicum* estaria relacionada, pelo menos em parte, a presença do radical 2-O-metilfucose na estrutura básica do LCO nesta espécie. Ainda que se tenham informações sobre a influência das substituições no fator

Nod, nenhuma correlação exata poder ser feita entre o tipo de LCO produzido pelo rizóbio e a planta que ele nodula (Perret et al., 2000). Por exemplo: *Rhizobium etli* e *R. loti* têm o mesmo fator Nod, mas nodulam com espécies distintas de feijoeiro (Cardenas et al., 1995), o mesmo sendo observado com dois biovars de *R. leguminosarum* que embora tenham o mesmo fator Nod também nodulam com espécies diferentes (Orgambide et al., 1995). Outro exemplo interessante que pode ser citado é a nodulação de feijoeiro com *R. tropici* e *R. etli*, porém neste caso existem diferentes tipos de fator Nod (Poupot et al., 1993). Contudo, cada vez mais se acredita que tal especificidade esteja relacionada a um conjunto de fatores e não a um único fator (Vargas & Hungria, 1997).

Minamisawa et al. (1997) constataram que *B. japonicum* nodula preferencialmente com *Glycine max* e *B. elkanii* com *Macroptilium atropurpureum*, contudo os autores observaram que, ao serem usados diferentes exsudados de sementes e flavonóides (isoflavonas, genisteína e daidzeína) como indutores dos genes *nod*, não houve alteração nos perfis de metabolitos dos fatores *nod* analisados, sendo sugerido pelos autores que a dupla via sinalizadora mediada pelos flavonóides do hospedeiro e fatores *nod* das bactérias testadas não estariam envolvidos na especificidade hospedeira de *B. japonicum* e *B. elkanii*.

As proteínas NodD possuem comprovada habilidade para reconhecer diferentes indutores, contudo estas proteínas não são as únicas determinantes da especificidade hospedeira que uma estirpe possui, uma vez que em várias etapas do processo de infecção são requisitados componentes adicionais da parede celular (EPS e LPS) e, em alguns casos a secreção de proteínas específicas também se faz necessária para que ocorra um completo processo de infecção e formação dos nódulos (Denarié et al., 1996 *apud* Hadri et al., 1998).

*A função dos polissacarídeos no processo ainda não está bem elucidada, mas acredita-se que participem no momento da invasão dos nódulos (Forsberg & Carlson, 1998). Em Rhizobium trifolii e R. leguminosarum, tem sido sugerido que a presença de um ou mais glicoconjugados (EPS) na superfície celular em conjunto com outros fatores possam contribuir para a especificidade hospedeira (Hollingsworth et al., 1989). Mutantes de R. meliloti incapazes de sintetizar succinoglicano (EPS I) demonstraram habilidade para o encurvamento de pêlos radiculares e desenvolvimento de nódulos em Medicago sativa, contudo os nódulos formados foram ineficientes, sendo sugerido pelos autores que a presença de succinoglicano funcionaria como uma molécula chave ou sinal para iniciar a abertura dos sítios de infecção radicular (Finan et al., 1985 e Leig et al., 1985 *apud* Perret et al., 2000). Diebold & Noel (1989) observaram que em estirpes de R. leguminosarum a produção de um exopolissacarídeo ácido esteve diretamente associada à nodulação de alfafa, trevo e ervilha, embora em feijão a formação dos nódulos não foi dependente da síntese deste exopolissacarídeo.*

Alterações na produção ou na estrutura dos lipopolissacarídeos extracelulares (LPS) em bactérias pertencentes aos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, pode influenciar diretamente a etapa de reconhecimento entre a bactéria e a planta hospedeira (Hadri et al., 1998). Stacey et al. (1982), observaram que mutantes de *B. japonicum* incapazes de nodular soja, apresentaram perfil de LPS

alterado, sendo a perda de infectividade observada nestes mutantes, atribuída exclusivamente à composição alterada dos LPS, uma vez que a produção de exopolissacarídeos e polissacarídeos capsulares foi semelhante à estirpe original, conforme sugerido por Puvanesarajah et al. (1987).

Noel et al. (1986) observaram que mutantes Tn5 induzidos de *R. leguminosarum bv phaseoli*, foram capazes de provocar deformações nos pêlos radiculares e de estimular a divisão celular, contudo foram pouco eficientes na invasão dos tecidos radiculares provocando na maioria das vezes um cordão de infecção abortivo.

Cava et al. (1989) obtiveram mutantes de *R. leguminosarum* da estirpe CE3 com síntese de LPS alterada, utilizando a técnica recombinação recíproca, a presença do LPS tipo I não pode ser detectada em nenhum dos mutantes obtidos através da coloração com prata, em SDS-PAGE com técnicas de “immunobloting” ou utilização de soro policlonal e que todas as mutações, exceto uma a lps-21, induziram a formação de nódulos brancos inefetivos, que não apresentavam atividade de nitrogenase. Contudo, Puvanesarajah et al., (1987) observaram que em variantes de *B. japonicum* a perda da cadeia do polissacarídeo-O, não capacitava a bactéria a formar nódulos nas plantas hospedeiras.

Assim, baseado nos diversos estudos envolvidos com a especificidade hospedeira de rizóbios e bradirrizóbios, torna-se evidente que um alto grau de especificidade em relação ao hospedeiro parece ser a exceção e não a regra (Neves & Rumjanek, 1996). A escolha de estirpes que apresentem baixa especificidade é recomendável, uma vez que a variabilidade genética entre as cultivares de leguminosas tem sido apontada como uma das causas que afetam a eficiência fixadora de N₂ das estirpes durante a simbiose (Peres, 1979).

Lopes et al. (1976) relataram que estirpes de *Rhizobium* podem apresentar potencial simbiótico bastante variado dependendo da leguminosa hospedeira com a qual estiverem associados. Também tem sido relatado que, para alguns genótipos de soja a interação entre os alelos recessivos rj1rj1 e as estirpes de *B. japonicum* resulta na expressão do fenótipo de não nodulação (Caldwell, 1966 *apud* Vargas & Hungria, 1997). Em soja tem sido constatado um efeito acentuado da interação entre cultivares e estirpes de *Bradyrhizobium* sp usadas em inoculantes no Brasil (Vargas & Hungria, 1997).

Na década de 70 com a expansão da cultura da soja na região do Cerrado brasileiro, a cultivar de soja IAC-2 passou a ser recomendada para o plantio nesta área. Porém, a alta especificidade hospedeira desta cultivar dificultou o estabelecimento de uma simbiose eficiente. Assim, foram pesquisadas novas estirpes que apresentassem capacidade de nodular a cultivar de soja IAC-2 e bom potencial de competição com a população de rizóbios naturalizada nos solos, sendo selecionadas duas variantes: a CPAC 7 (SEMIA 5080), obtida após subcultivos da

estirpe SEMIA 586 (CB 1809), e a variante CPAC-15 (SEMIA 5079) isolada de campo de cerrado, sendo considerada uma mutante natural da SEMIA 566 (BR 40) (Boddey, 1995).

Utilizando a cultivar de soja IAC-2, Peres & Vidor (1980) observaram que houve redução parcial da nodulação desta cultivar quando inoculada com as estirpes SEMIA 586 (CB 1809) e SEMIA 5039. Nishi (1995), ao trabalhar com esta mesma cultivar IAC-2 inoculada com as estirpes SEMIA 5080 e SEMIA 586, observou que esta cultivar restringiu parcialmente à nodulação quando qualquer uma das estirpes foi inoculada e como consequência houve menor acúmulo de N-total na parte aérea. Kober (1997) observou que o variante 5080-G, isolado da estirpe de *B. japonicum* SEMIA 5080, quando inoculado na cultivar de soja Jacuí-7 teve seu desempenho simbiótico afetado devido à restrição à nodulação desta cultivar. Contudo, quando este variante foi inoculado na cultivar de soja IAS-5, apresentou média para acúmulo de N-total na parte aérea equivalente à testemunha nitrogenada.

2.3.1.3 Competitividade nodular

A competitividade nodular é considerada como a capacidade de uma determinada estirpe estar presente na maioria dos nódulos do hospedeiro, ainda que represente a minoria numérica na população de bactérias que fizeram contato com as raízes (Araújo, 1994) ou, de acordo com Hungria et al (1994), a competitividade poderia ser definida como a relação entre o número de bactérias de uma determinada estirpe no inóculo e a proporção de nódulos que essa estirpe consegue ocupar nas raízes da planta hospedeira.

Na complexa interação entre rizóbios e leguminosas, a competição por sítios de infecção envolve várias características inerentes à leguminosa e ao rizóbio, tais como: a influência do hospedeiro no processo de infecção; a concentração de células de rizóbio presentes no inóculo ou próximas à semente; a taxa relativa de crescimento das estirpes competitivas; o estado fisiológico do rizóbio na hora da inoculação; variáveis ambientais (temperatura, umidade, pressão de oxigênio) e nível nutricional da planta hospedeira (Trinick, 1982; Vargas et al., 1994). Embora alguns destes fatores possam afetar diretamente a competitividade, em sua maioria o efeito é direcionado sobre a persistência e sobrevivência das estirpes inoculadas, influenciando somente indiretamente as interações competitivas (Sadowsky, 2000).

A forma como uma estirpe pode utilizar um composto presente na rizosfera que não seja facilmente utilizado por outras estirpes pode se constituir em uma vantagem para seu crescimento e, conseqüentemente, para sua competitividade. As rizopinas são compostos derivados de inositol, sendo sintetizados e catabolizados por aproximadamente 10% das estirpes de *Rhizobium*. Os genes necessários ao seu catabolismo (*moc*) e síntese (*mos*) estão ligados a plasmídeos simbióticos. A

capacidade de utilização das rizopinas como fonte de carbono pode significar uma vantagem competitiva sobre outros microrganismos presentes na rizosfera. Em *Sinorhizobium meliloti*, estirpes que catabolizam rizopinas (Moc^+) foram dominantes na ocupância nodular sobre estirpes mutantes (Moc^-). Assim, a utilização de estirpes com fenótipo Mos^+/Moc^+ poderia se tornar uma boa estratégia para aumentar a competitividade em estirpes utilizadas em inoculantes (Heinrich et al., 1999).

De acordo com Weaver & Frederick (1974) a maior ocorrência de uma estirpe nos nódulos, quando em mistura com estirpe de capacidade semelhante, pode ser favorecida por diferenças em concentrações de células entre as duas estirpes presentes no inoculante ou na rizosfera, tendo os autores afirmado que as células bacterianas do inoculante devem apresentar uma vantagem numérica pelo menos 1000 vezes maior do que o número de bactérias existentes no solo, para que sejam formados 50% dos nódulos pela estirpe inoculada.

Peres & Vidor (1980) estudando o efeito de diferentes concentrações entre duas estirpes competitivas (BR 29 e BR 96), observaram uma maior taxa de ocupação nodular proporcionada pela estirpe presente em maior concentração no inóculo. Assim, segundo Vidor et al. (1979), poderia haver uma atuação seletiva sobre uma determinada estirpe de rizóbio, fazendo com que a estirpe menos sensível apresente maior oportunidade de infecção da superfície radicular do hospedeiro e, como consequência, haveria uma maior porcentagem de nódulos formados pela estirpe que se encontrava em maior concentração no inoculante.

A velocidade para o início da nodulação pode interferir na competitividade entre estirpes co-inoculadas, sendo atribuída uma menor taxa de ocupação nodular para as estirpes que apresentem menor velocidade para iniciar a nodulação (Mcderermott & Graham, 1989). Em *B. japonicum*, variações observadas na capacidade competitiva de estirpes não têm sido correlacionadas à velocidade de início da nodulação, uma vez que foi demonstrado que estirpes competitivas (USDA 110 e USDA 1028) apresentaram a mesma velocidade de nodulação que outras estirpes menos competitivas (Smith & Wollum II, 1989).

A taxa de adesão bacteriana ao sistema radicular do hospedeiro pode garantir vantagem competitiva de uma estirpe em relação à outra (Vésper & Bauer, 1985). A adsorção do rizóbio às raízes do hospedeiro tem sido relatada em *B. japonicum* (Lodeiro & Favelukes, 1999), *Rhizobium etli* e *Sinorhizobium meliloti* (Diaz et al., 1989 *apud* Lodeiro et al., 2000), tendo sido atribuída à presença de lecitinas radiculares que atuam no reconhecimento do rizóbio, interagindo com os polissacarídeos da superfície celular bacteriana e conferindo ao processo de adesão alguma especificidade (Havelson & Stacey, 1986).

A inclusão das lecitinas entre os determinantes de especificidade hospedeira se baseia no estudo desenvolvido por Diaz et al. (1989), onde plantas de trevo transgênicas para o gene lecitina, puderam nodular com *R. leguminosarum* bv *viciae*, espécie de rizóbio que normalmente não nodula trevo. Um outro exemplo do envolvimento de lecitinas no processo de adesão se refere a trifolina, uma lecitina sintetizada por diversas leguminosas que poderia estar envolvida no processo de reconhecimento e aderência de *R. leguminosarum* bv *trifolii* em trevo, tendo o mecanismo proposto para esta interação resultado provavelmente da aglutinação entre proteína e bactéria, formando sítios receptores para a infecção (Freire, 1992). Embora existam evidências do envolvimento das lecitinas no processo de adesão, sua síntese, segundo Ho et al. (1990), tem origem bacteriana e não vegetal, como se pensava em princípio. Os autores se baseiam em estudos onde foi possível observar que uma

lecitina constituída de sacarídeos de D-galactose e lactose, denominada de Bj38, foi sintetizada apenas por *B. japonicum*.

Apesar da mobilidade e da quimiotaxia não serem consideradas essenciais à nodulação (Caetano-Anolles et al., 1988), tem sido observado que mutantes não móveis tem sua habilidade competitiva reduzida, conforme pode ser observado por Liu et al. (1989) em relação a um mutante não móvel Tn7 de *B. japonicum* que demonstrou menor competição nodular em relação à estirpe parental. Células rizobianas muitas vezes movem-se sobre a superfície radicular do hospedeiro antes da adesão e, esta mobilidade pode influenciar sobre a habilidade competitiva de determinada estirpe.

De acordo com Sadowsky (2000) alterações ou deleções de genes controladores de características da superfície celular influenciam a habilidade competitiva de nodulação. Bhagwat & Keister (1991) observaram a perda da capacidade competitiva em mutantes de *B. japonicum* deficientes na produção de exopolissacarídeos e lipopolissacarídeos, contudo após a inserção de genes necessários à síntese dos polissacarídeos, foi restaurada a capacidade competitiva e de nodulação, tornando-os semelhantes à estirpe parental.

A partir dos estudos realizados com variantes de estirpes noduladoras de soja do sorogrupo SEMIA 566 (Boddey & Hungria 1994) foi constatado que diferenças na capacidade competitiva estariam relacionadas com a habilidade de alterar as proteínas da membrana em resposta ao estímulo das raízes (Scotti et al., 1993).

Nishi et al. (1996), ao analisarem os parâmetros relacionados aos fenótipos radiculares em soja inoculada com a estirpe SEMIA 566 e sua variante CPAC 15 (SEMIA 5079), verificaram que existiam diferenças quanto ao número de pêlos radiculares, o que, segundo os autores, poderia estar relacionado a uma maior capacidade competitiva das estirpes.

A competição por sítios de infecção também pode ser influenciada pela presença de outras estirpes através da produção de compostos tóxicos a outras espécies ou estirpes específicas de rizóbio (De Antoni et al., 1981).

Genes que codificam a produção de fatores antibióticos tem sido responsáveis por conferir aumentos de competitividade (Triplett & Sadowsky, 1992). Embora genes equivalentes não tenham sido encontrados em bradiritizóbios, genes codificadores de antibióticos, como a trifolitoxina, presentes em *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* tem demonstrado aumentar a competitividade de *R. etli* e provavelmente em outros rizóbios do solo (Triplett & Barta, 1987) .

A produção de bacteriocinas tem sido apontada como determinante da maior competitividade de uma estirpe em relação à outra. Estudos com o uso de estirpes isogênicas têm mostrado a vantagem competitiva das estirpes produtoras de bacteriocina sobre estirpes sensíveis. Hudgson et al. (1985) observaram que a estirpe CB 782 de *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* produtora de bacteriolisina, quando co-inoculada com estirpes sensíveis a esta toxina, resultou em maiores percentuais de ocupação nos nódulos pela estirpe CB 782. Os autores sugerem que a produção de bacteriolisina por uma estirpe de rizóbio poderia torná-la mais competitiva por sítios de infecção em relação às estirpes sensíveis.

A produção de rizobiotoxina [2-amino-4-(2-amino-3-hidropropoxi)-*trans*-but-3-ác. enólico] por estirpes do grupo II (*B. elkanii*) em soja induz a clorose em folhas novas de cultivares sensíveis, prejudicando o crescimento das plantas (Minamisawa, 1989; Fuhrmann, 1990). Means et al. (1961) estudando a competição entre estirpes de *B. japonicum* produtoras de rizobiotoxina (USDA 76 e USDA 94),

quando inoculadas nas cultivares de soja Lee e Hawkeye, observaram que a estirpe USDA 76 quando co-inoculada com estirpes não produtoras de rizobiotoxina foi mais competitiva, não importando a sua proporção no inóculo, uma vez que a presença de 1,1% desta estirpe no inoculante foi responsável por 85% de ocupação nodular. Esses resultados reforçam a hipótese sugerida por Minamisawa (1990), de que a produção dessa toxina seria vantajosa para a sobrevivência das estirpes produtoras, auxiliando-as na competição com outros microrganismos do solo.

2.4 Variabilidade genética em estirpes de rizóbios adaptadas aos solos

Quando a soja foi introduzida no país, os solos brasileiros não possuíam estirpes de Bradyrhizobium capazes de realizar simbiose eficiente com a cultura (Freire, 1977). Contudo, após um criterioso trabalho de seleção de estirpes iniciado na década de 60, chegou-se a atual recomendação de estirpes para produção de inoculantes para soja, que é composta das seguintes estirpes SEMIA 5079, SEMIA 5080, SEMIA 587 e SEMIA 5019 (Bangel, 2000).

Apesar da indicação das estirpes para inoculação ser baseada em estudos de seleção de estirpes de comprovada eficiência fixadora de nitrogênio, de permanência no solo e resistência a fatores limitantes, tem-se observado que o cultivo sucessivo de soja inoculada numa mesma área levou ao estabelecimento de populações de rizóbios que nem sempre são as mais eficientes quanto à capacidade de fixação de N₂, mas que podem ser altamente competitivas dificultando a introdução de estirpes mais eficientes, ainda que estas estejam presente em maior quantidade (Vargas et al., 1992).

Alguns trabalhos realizados nos últimos anos no Brasil, têm demonstrado que a adaptação aos solos influenciada pelos fatores bióticos e abióticos do ambiente, pode implicar em grandes alterações das características fisiológicas, bioquímicas e genéticas entre as estirpes de rizóbio, o que na maioria dos casos provoca um grande distanciamento genético das estirpes parentais (Ferreira, 1999).

Em um trabalho conduzido por Nishi et al. (1996) com a estirpe parental SEMIA 566 e sua variante CPAC 15 (SEMIA 5079), adaptada aos solos dos cerrados, foram observadas diferenças nas características *in vitro* (morfologia de colônias, resistência intrínseca a antibióticos, síntese de ácido indol acético e expressão da hidrogenase), assim como nas características *in vivo* (restrição à nodulação em soja e toxidez em plantas de soja e alfafa resultante da produção de rizobiotoxina). Além de ser observado pelos autores que a adaptação da variante CPAC 15 resultou em grandes diferenças genéticas em relação à sua estirpe parental SEMIA 566.

A partir dos estudos realizados com variantes do sorogrupo SEMIA 566 (Boddey & Hungria, 1995) foi constatado que diferenças na capacidade competitiva estariam relacionadas com a habilidade de alterar as proteínas da membrana da bactéria em resposta ao estímulo das raízes (Scotti et al., 1993). Com a adaptação, estirpes do sorogrupo SEMIA 566 teriam reduzido a produção de rizobiotoxina e ácido indol acético, os quais de acordo com Boddey & Hungria (1994) também poderiam estar ligados à maior competitividade.

A elevada diversidade genética dentro da população de rizóbios a campo, tem sido atribuída à rápida reprodução, variações e mutações, e também devido aos processos naturais de transferência genética (Freire, 1992). Em regiões tropicais, fatores edafoclimáticos tais como altas temperaturas, acidez e toxidez por íons alumínio podem favorecer arranjos genômicos, causando assim a variabilidade genética presente nas estirpes que persistem no solo (Soberón-Chaves et al., 1986).

Mecanismos de transferência genética horizontal também têm sido relatados entre espécies de *Mesorhizobium*, onde uma espécie não simbiótica, que persistiu no solo na ausência do hospedeiro foi capaz de adquirir genes simbióticos transferidos por uma estirpe de *M. loti* introduzida no solo. O mecanismo sugerido neste caso foi à troca de material genético possivelmente mediada por fagos que agiram seletivamente nesta população, transferindo o material genético (fragmentos de DNA cromossomal) para a célula receptora (estirpe não simbiótica). E assim é postulado que a transferência de DNA nesta população de *Mesorhizobium* pode trazer vantagem competitiva na presença do hospedeiro e que a expansão do genoma bacteriano pode auxiliar a espécie na adaptação a novos ambientes Sullivan et al. (1996). A transferência de genes de nodulação e fixação localizados em cromossomos também foi confirmada em testes de laboratório por Sullivan & Ronnson (1998).

De acordo com Hungria et al. (1994) manipulações de genótipos de soja contendo o gene recessivo *rj1*, que resulta no fenótipo de “não nodulação”, poderiam permitir a exclusão das estirpes indígenas (naturalizadas) de *B. japonicum* menos eficientes, mas aceitando estirpes selecionadas ou desenvolvidas especialmente para nodular com esses genótipos. Usar respostas de incompatibilidade entre estirpes pode permitir o controle da especificidade hospedeira da soja, tendo em vista a dificuldade de introduzir estirpes geneticamente melhoradas em solos com população estabelecida.

Neste contexto, usar a variabilidade genética existente em estirpes que já possuem características desejáveis para a produção de inoculantes como as estirpes SEMIA 587, SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 5080, consiste numa ferramenta auxiliar no processo de seleção de novas estirpes que possam competir com a população de bradirizóbios naturalizada nos solos cultivados e fixar eficientemente o N_2 na cultura da soja.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens bacterianas

As estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* utilizadas em ensaios *in vitro* e *in vivo* ao longo da pesquisa (Tabela 1), foram cedidas pelo Centro de Recursos Microbiológicos (MIRCEN) - Fundação de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul (FEPAGRO).

3.2 Local da pesquisa

Os experimentos com plantas foram conduzidos em casa de vegetação e câmara de crescimento localizadas no Campus da Faculdade de Agronomia da UFRGS. Os testes *in vitro* foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Solo da UFRGS, com exceção da caracterização genética que foi desenvolvida no Laboratório de Microbiologia do MIRCEN - FEPAGRO.

Obtenção dos variantes de *Bradyrhizobium* spp

Para a obtenção de variantes, foi realizado um experimento a partir da inoculação da cultivar de soja BR-16 com as estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019 (B. elkanii) e SEMIA 5079 e SEMIA 5080 (B. japonicum), atualmente recomendadas para fabricação de inoculantes para soja.

A cultivar comercial de soja BR-16 foi utilizada neste experimento por apresentar amplo espectro de nodulação (Ferreira, 1999).

TABELA 1. Relação das estirpes de *Bradyrhizobium* spp utilizadas nos experimentos

Estirpe (SEMIA)*	Sinonímias	Principais características/Origens
587	BR 96	Isolada pelo IPAGRO, RS em 1967. Eficiente e competitiva (Peres, 1979), recomendada comercialmente de 1968 a 1975 e de 1979 até o momento
5019	29W, BR 29	Isolada da linhagem IAC-70-559, pela Embrapa-CNPAB, RJ. Considerada com alta (Peres, 1979) a média eficiência (Neves et al., 1985), sendo recomendada comercialmente de 1979 até o momento
5079	CPAC 15	Isolada pela Embrapa-CPAC, DF. Eficiente (Vargas et al., 1992), recomendada comercialmente a partir de 1992
5080	CPAC 7	Isolada pela Embrapa-CPAC, DF. Subcultura da CB1809. Competitiva (Vargas et al., 1992), recomendada comercialmente a partir de 1992
5052	USDA 6	Estirpe padrão da espécie <i>Bradyrhizobium japonicum</i> . Isolada nos EUA
5087	USDA 76	Estirpe padrão da espécie <i>Bradyrhizobium elkanii</i> . Isolada nos EUA
5032	USDA 110	Estirpe de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> . Isolada nos EUA, pelo Niftal (Hawai)

* Denominação de referência da coleção de culturas do MIRCEN - FEPAGRO

As sementes foram previamente desinfestadas através da imersão em álcool durante 3 minutos e em solução de hipoclorito de sódio comercial (0,3%) durante 2 minutos, sendo em seguida lavadas repetidas vezes em água destilada esterilizada. Inicialmente, foi realizada uma pré-germinação e após 4 dias procedeu-se o transplante, colocando-se 4 plântulas por vaso. Aos sete dias após o transplante foi efetuado o desbaste, deixando-se duas plantas por vaso.

Neste experimento foram utilizados vasos de Leonard autoclavados por 2 horas, a 120°C e 1 atmosfera de pressão, tendo como substrato areia e carvão vegetal moído na proporção de 3:1. As estirpes SEMIA 587, SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 5080 foram crescidas em meio extrato de levedura manitol (Vincent, 1970) com pH ajustado para 6,8 por um período de 72 horas, a 28°C, sob agitação de 120 rpm. Para verificação da pureza dos isolados, foram utilizados os meios YMA + azul de bromotimol ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Vincent, 1970) e Peptona glicose ágar com Púrpura de bromocresol (PGA-BCP) (Somasegaran & Hoben, 1994). Depois de certificada a pureza do inoculante, foram aplicados 1,0 mL do inóculo por planta, contendo 10^9 células viáveis, sendo esta quantidade estimada de acordo com a metodologia descrita por Vincent (1970).

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, obedecendo ao delineamento inteiramente casualizado, com 3 repetições.

De acordo com o tratamento, as parcelas constituídas por cada vaso receberam solução nutritiva de Norris (Vincent, 1970) isenta de nitrogênio, autoclavada e com pH ajustado para 6,0. Além dos tratamentos inoculados havia tratamentos controle sem inoculação: testemunha sem adição de nitrogênio e testemunha nitrogenada (2,14 g de N/vaso na forma de NH_4NO_3 , quantidade esta calculada tomando-se como base que aos 35 dias após o plantio, a cada 15g de tecido vegetal da soja existe um teor de 5% de N. A solução de NH_4NO_3 foi parcelada aos 15 e 30 dias após o plantio).

A colheita foi realizada aos 35 dias após o plantio, coletando-se as raízes das plantas. Os nódulos foram separados das raízes, contados, classificados, pesados e em seguida acondicionados em recipientes contendo sílica gel para conservação e armazenamento objetivando o posterior isolamento.

3.4 Seleção dos variantes de *Bradyrhizobium* spp

A seleção dos variantes de *Bradyrhizobium* spp foi baseada em parâmetros relacionados à eficiência simbiótica. Inicialmente, foi realizada uma pré-seleção dos

variantes, baseada na expressão do fenótipo hidrogenase positiva. Posteriormente, dez variantes de cada uma das quatro estirpes SEMIA recomendadas para inoculação da soja, foram inoculados na cultivar de soja BR-16 com a finalidade de serem avaliados quanto à eficiência simbiótica.

3.4.1 Detecção da atividade da hidrogenase pelo método de redução do azul de metileno

Para a expressão da hidrogenase in vitro foi utilizado o método descrito por Hauglang et al. (1983), com algumas modificações. A escolha deste parâmetro como critério inicial para identificar os variantes baseia-se no fato de que a presença da enzima hidrogenase em bradirrizóbios noduladores de soja, seja um indicativo de eficiência simbiótica, uma vez que a expressão do fenótipo hup⁺ tem sido relacionada a um melhor aproveitamento energético na redução de N₂ atmosférico durante o processo de fixação simbiótica (Fuhrmann, 1993).

Para cada um dos tratamentos inoculados (SEMIA 587, SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 5080) foram selecionados ao acaso 30 nódulos, os quais foram desinfestados superficialmente através da imersão em álcool durante 3 minutos e em solução de hipoclorito de sódio comercial (0,3%) durante 2 minutos e lavados repetidas vezes em água destilada esterilizada. Em seguida, cada nódulo foi transferido para tubo de ensaio contendo 10 mL de solução salina esterilizada (0,85% de NaCl), macerado com o auxílio de bastão de vidro esterilizado, e a suspensão de cada tubo de ensaio agitada em vórtex por 1 minuto. Aliquotas de 10 µL das suspensões foram inoculadas em triplicata em placas contendo meio YMA + vermelho congo (25 µg mL⁻¹) com pH ajustado para 6,8 (Vincent, 1970) e incubadas em estufa a 28°C até o crescimento das culturas. Colônias morfológicamente distintas foram selecionadas e então inoculadas em novas placas com meio YMA + vermelho congo.

Após a confirmação da pureza (Item 3.3) e persistência das características morfológicas dos isolados, estes foram inoculados em meio líquido extrato de levedura-triptona (TY) (Beringer, 1972) e incubados sob agitação de 120 rpm com temperatura controlada (28°C). Após 72 horas, foram transferidos para placas com meio sólido 10 µL da suspensão com leitura em espectrofotômetro (DO 540 nm) de 0,05. As placas foram incubadas em estufa a 28°C por 72 horas e de cada placa foram feitas “cópias” pressionando-se discos de papel de filtro esterilizado sobre o crescimento bacteriano, de forma semelhante a um carimbo. Em seguida o papel de filtro foi transferido para uma placa contendo solução de azul de metileno (Postgate et al., 1982 apud Haugland et al., 1983) e logo depois de incubado em dessecador com atmosfera contendo 10% de H₂. O período de 15 minutos foi suficiente para detectar a formação da coloração branca resultante da redução do corante azul de metileno, sendo esta observação interpretada como indicativo da atividade enzimática da hidrogenase nas culturas de Bradyrhizobium testadas.

3.4.2 Eficiência simbiótica dos variantes selecionados

Os variantes que demonstraram expressão da hidrogenase positiva foram submetidos a um novo experimento com a cultivar de soja BR-16, visando comprovar o seu potencial simbiótico. Foram testados neste experimento 10

variantes de cada uma das estirpes de *B. japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) e *B. elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019), além dos tratamentos controle sem inoculação (testemunhas sem e com adição de nitrogênio).

A eficiência dos variantes selecionados foi avaliada sob condições axênicas em casa de vegetação de forma semelhante ao experimento descrito no Item 3.3. A colheita foi realizada aos 35 dias após o plantio, coletando-se a parte aérea e as raízes das plantas. A avaliação da nodulação, assim como o procedimento de conservação dos nódulos foram de acordo com a descrição do Item 3.3. A parte aérea foi submetida a secagem em estufa a 60°C e uma vez seca foi pesada, sendo em seguida moída para realização da determinação química do teor de nitrogênio total segundo o método semicro Kjeldahl (Tedesco et al., 1995).

Os resultados obtidos foram analisados no programa estatístico SANEST, e submetidos à análise de variância com teste de F, utilizando-se o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade para comparação entre médias de tratamentos.

O índice de efetividade simbiótica (Efra) dos variantes foi calculado, através da fórmula abaixo, conforme descrito por Brockwell et al. (1966) *apud* Sá (2001). Com base nos índices de efetividade simbiótica (Efra) foram selecionados os variantes mais promissores utilizados nas próximas etapas do trabalho.

$$\text{Efra} = \frac{\text{Ntotal fixado} - \text{Ntotal T S/N}}{\text{Ntotal T C/N} - \text{Ntotal T S/N}} \times 100$$

onde: Ntotal fixado = Nitrogênio total do tratamento

Ntotal T S/N = Nitrogênio total da testemunha sem nitrogênio

Ntotal T C/N = Nitrogênio total da testemunha nitrogenada

3.5 Nodulação e indução de clorose foliar em diferentes hospedeiros inoculados com variantes e estirpes de *Bradyrhizobium* spp

Neste experimento os variantes selecionados de cada grupo (*B. japonicum* e *B. elkanii*) e suas respectivas estirpes originais foram testados quanto à habilidade de nodular os seguintes hospedeiros: cultivares de soja Clark e Peking, *Vigna unguiculata* (cultivar IPA 206) e *Cajanus cajan*. Os variantes e estirpes originais também foram investigados quanto à produção de rizobiotoxina, avaliada através do nível de indução de clorose foliar na cultivar de soja Clark, que é uma cultivar sensível a esta toxina (Devine et al., 1983). Para a avaliação do nível de indução de clorose foliar foi atribuída a seguinte escala de notas: 0 (ausência de sintomas), 1 clorose leve e (2) clorose acentuada. Nesta avaliação, foram incluídas as estirpes

SEMIA 5032 (*B. japonicum*), que não produz rizobiotoxina, representando o controle negativo da avaliação, e a estirpe SEMIA 5087 (*B. elkanii*) usada como controle positivo devido à sua reconhecida capacidade de indução de clorose foliar em cultivares de soja sensíveis a esta toxina (Teaney III & Fuhrmann, 1992). Além dos tratamentos inoculados havia tratamentos controle sem inoculação: testemunha sem adição de nitrogênio e testemunha nitrogenada.

O experimento foi realizado sob condições controladas em câmara de crescimento a 26°C com regime de luminosidade de 13h/11h (dia/noite), utilizando-se copos plásticos e bandejas de alumínio como suporte e reservatório de solução nutritiva. O substrato utilizado foi areia e carvão vegetal moído na proporção de 3:1 autoclavado por 2 horas, a 120°C e 1 atmosfera de pressão.

Os tratamentos em triplicata receberam solução nutritiva de Norris isenta de nitrogênio, esterilizada e com pH ajustado para 6,0. A colheita foi realizada aos 35 dias sendo os nódulos classificados quanto ao número, tamanho e disposição no sistema radicular. Também foram determinados o peso dos nódulos secos e a produção de matéria seca na parte aérea. Os resultados obtidos foram analisados no programa estatístico SANEST, e submetidos à análise de variância com teste de F, utilizando-se o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade para comparação entre médias de tratamentos.

3.6 Capacidade competitiva dos variantes de *Bradyrhizobium spp*

Os variantes mais promissores de cada grupo (B. japonicum e B. elkanii) foram testados isoladamente e em combinações a partir da adição de inóculos mistos contendo 10^9 células mL^{-1} com a finalidade de serem observadas a persistência das características simbióticas e avaliação do efeito proporcionado pela co-inoculação sobre a fixação simbiótica.

A avaliação da capacidade competitiva foi realizada sob as condições axênicas descritas no Item 2, diferindo apenas quanto à inoculação, uma vez que neste experimento foram adicionados inóculos mistos (1/1; v/v) contendo 10^9 células mL^{-1} com combinações entre os variantes e uma estirpe comprovadamente mais competitiva (SEMIA 587 ou SEMIA 5019), pertencente a um grupo sorológico diferente do variante testado. O substrato utilizado para os vasos de Leonard foi composto de areia e vermiculita na proporção de 2:1.

A colheita e as determinações foram realizadas conforme o experimento descrito no Item 3.4.2, sendo incluído entre os parâmetros avaliados a tipificação dos nódulos, realizada através de soroaglutinação, segundo a técnica descrita por Lemos (1994).

Os anti-soros das estirpes SEMIA 587, SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 5080 foram cedidos pelo Laboratório de Microbiologia do MIRCEN - FEPAGRO sendo utilizados os títulos superiores à 1:800.

Para cada tratamento foram tomados ao acaso 40 nódulos, e, no caso de baixa nodulação, foram utilizados todos os nódulos do tratamento. Inicialmente, cada nódulo seco foi transferido para um tubo de ensaio contendo solução salina

esterilizada (0,85% de NaCl), reidratado e macerado com o auxílio de um bastão de vidro esterilizado, sendo essa suspensão incubada (banho maria) a 100°C durante 1 hora para inativação dos antígenos flagelares. Após a incubação, foram acrescentados 80µL do corante cristal violeta (0,05% em etanol) a cada 2 mL da suspensão nodular.

A reação de aglutinação foi realizada em placas de microtitulação em poliestireno com poços em “U” e a cada poço da placa foram adicionados 50 µL da suspensão nodular e 50 µL do antissoro diluído a 1:50 em solução salina esterilizada. As placas foram homogeneizadas por agitação durante 5 minutos sendo mantidas em repouso à temperatura ambiente durante 24 horas. Após este período, a partir da exposição das placas através de luz transmitida foram realizadas as leituras da presença (+) ou ausência (-) de aglutinação.

3.7 Caracterização dos variantes de *Bradyrhizobium* spp

3.7.1 Caracterização morfológica e alteração do pH do meio de cultura

A avaliação da morfologia das colônias e formação de goma foi feita a partir da inoculação de 10^6 células mL^{-1} em meio de cultivo levedura-manitol ágar (YMA) + vermelho congo ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$), com pH ajustado para 6,8 por um período de 2 a 5 dias, sendo realizada de acordo com Vincent (1970) e Araújo (1994). Como padrão para a análise morfológica das colônias foram utilizados os critérios propostos por Fuhrmann (1990), a saber: grande e mucóide (LM), grande e aquosa (LW) e pequena e seca (SD), respectivamente, para colônias >1mm de diâmetro, produtoras de muco, convexas e uniformemente translúcidas para opacas; colônias >1mm de diâmetro, formadoras de áreas de crescimento fluído, aquoso, colônias achatadas e translúcidas e colônias <1mm de diâmetro, secas, levemente convexas e translúcidas tendendo a opacas.

Nos estudos da reação do crescimento bacteriano em meio de cultura com modificação do pH, devido à excreção de compostos ácidos ou alcalinos, foi utilizado meio YMA + azul de bromotimol ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) com pH ajustado para 6,8.

Caracterização fisiológica e bioquímica

3.7.2.1 Tolerância à salinidade em temperaturas de incubação de 28°C e 35°C

Durante a fase de caracterização fenotípica, foram realizados testes para avaliar o grau de tolerância à salinidade e temperaturas de incubação nas estirpes originais de B. japonicum, B. elkanii e seus variantes.

O experimento obedeceu ao delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições e seguiu o arranjo fatorial 8 X 2, com 8 concentrações de NaCl variáveis de 0 a 7,0% e duas temperaturas de incubação (28 e 35°C). Inicialmente as bactérias foram inoculadas em meio líquido extrato de levedura-triptona (TY) (Beringer, 1972) e incubadas sob agitação de 120 rpm com temperatura controlada (28°C). Após 72 horas, alíquotas de 10 µL das suspensões bacterianas (10^6 células mL⁻¹), foram transferidas para placas contendo meio YMA (Vincent, 1970) com diferentes concentrações de NaCl, sendo então incubadas sob diferentes temperaturas.

As avaliações foram feitas após um período de 2 a 5 dias, onde o crescimento dos variantes foi estimado pela mensuração do diâmetro (mm) das colônias.

3.7.2.2 Crescimento em diferentes fontes de carbono

A metodologia utilizada para avaliar a habilidade dos variantes e estirpes originais em utilizar diferentes carboidratos como fonte de carbono foi a descrita por Kozusny-Andreani (1992), com algumas modificações.

Os variantes e as estirpes originais foram inoculados em meio líquido extrato de levedura-manitol (Vincent, 1970) e incubados sob agitação de 120 rpm com temperatura controlada (28°C) por um período de 72 horas. Uma vez confirmada a pureza das culturas, estas foram transferidas em triplicatas (10µL) para placas com meio de cultura WC (Wood & Cooper, 1985) modificado, contendo uma das seguintes fontes de carbono: arabinose, galactose, sacarose e manitol como testemunha. Os açúcares foram esterilizados por filtração e adicionados ao meio de WC autoclavado a uma concentração final de 0,1%. Como indicador da capacidade de metabolização de carboidratos foi adicionado 2,3,5-trifeniltetrazólio na concentração de 50 mg L⁻¹, segundo a metodologia descrita por Kozusny-Andreani (1992).

A incubação das bactérias foi realizada com temperatura controlada (28°C) por período de 7 a 8 dias sendo feita à avaliação a partir da observação da presença de colônias vermelhas ou brancas, sendo as colônias vermelhas representativas de indivíduos incapazes de utilizar uma determinada fonte de carbono e as colônias brancas referentes ao crescimento resultante da habilidade de utilização do carboidrato.

3.7.3 Caracterização genética

Os variantes e as estirpes originais foram avaliados a partir dos métodos relacionados com a reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando diferentes oligonucleotídeos iniciadores, como BOX A 1-R, que possui uma sequência repetitiva intergênica do cromossomo da bactéria gram negativa *Streptococcus pneumoniae* (Martin et al., 1992), ERIC (ERIC 1R + ERIC 2) que possuem sequências repetitivas intergênicas de enterobactérias (de Brujin, 1992) ou o RP01 que apresenta uma sequência específica para uma região conservada do promotor do gene *nifHDK* (Richardson et al., 1995).

Com a finalidade de se comparar os perfis eletroforéticos obtidos por variantes e estirpes originais, foram incluídas as estirpes padrão de referência usadas em estudos de classificação das espécies *B. japonicum* (SEMIA 5052 = USDA 6) e *B. elkanii* (SEMIA 5087 = USDA 76).

3.7.3.1 Extração de DNA genômico

Para que os variantes de *Bradyrhizobium* fossem avaliados a partir dos métodos relacionados com a PCR, inicialmente foi extraído o DNA genômico de cada amostra de acordo com o protocolo adaptado de Ausubel et al. (1987). A extração do DNA de variantes e estirpes de *Bradyrhizobium* spp foi realizada a partir de uma cultura de células crescidas em 15 mL de meio YM (5g L⁻¹ de manitol) a 28°C sob agitação de 120 rpm durante 72 horas. Após esse período, foram transferidos para tubos de microcentrifuga com capacidade para 1,5mL, limpos e esterilizados, 1000µL da suspensão bacteriana que foram centrifugados (12000 rpm, 10 min a 4°C), sendo o sedimentado lavado com solução salina (NaCl a 0,85%) para a remoção de polissacarídeos extracelulares e de possíveis partes residuais do meio de cultivo. Uma vez descartado o sobrenadante, o precipitado foi ressuspendido em 500µL de tampão TE 50/20 (TrisHCl 50 mM pH 8,0; EDTA Na₂ 20 mM pH 8,0; TrisHCL 1m pH 8,0), 1µL de proteinase K (20 mg mL⁻¹), 10µL de lisozima (10 mg mL⁻¹) e 30µL de sarcosil (10%) sendo as amostras incubadas a 37°C durante 12 - 15 horas. Depois da incubação foram adicionados às amostras 100µL de uma solução de NaCl 5M com homogeneização feita por um pulso em vórtex. A seguir foram acrescentados 80µL de CTAB/NaCl (10% de CTAB em 0,7M de NaCl), seguido de agitação em vórtex e incubação a 65°C por 10 minutos. A cada amostra, foram adicionados e misturados por inversão dos tubos, 700µL de clorofórmio / álcool isoamílico (24:1), seguido por uma centrifugação por 15 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi cuidadosamente coletado e transferido para um tubo novo e esterilizado, sendo mais uma vez realizada a etapa de adição da mistura clorofórmio/álcool isoamílico. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e, ao material restante, foram acrescentados 700µL de clorofórmio homogeneizados por um pulso de vórtex e posterior centrifugação de 15 minutos a 13000 rpm. O sobrenadante foi coletado, transferido para novos tubos de microcentrifuga com adição 1µL de RNase (10mg mL⁻¹) e incubação a 37°C por 60 minutos.

Para precipitação do DNA, foram adicionados 2 volumes (1000µL) de etanol 100% + 0,2 volumes (100µL) de acetato de sódio (3M a pH 5,2), e, em seguida, procedida uma nova incubação das amostras a -20°C em freezer durante 2 horas. Após centrifugação (13000 rpm por 15 minutos), o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 1mL de etanol 70% e centrifugado por 10 minutos (13000 rpm). Descartado o sobrenadante, os tubos foram secos à temperatura ambiente e

o DNA, depois de seco, ressuspendido em 50 μ L de água ultrapura, sendo assim conservado sob temperatura de -20°C .

A quantificação do DNA extraído foi obtida tomando-se alíquotas de DNA estoque e diluindo-as em água (5 μ L de DNA + 995 μ L de água ultrapura), sendo a leitura feita em espectrofotômetro a 260 nm. Para o cálculo da concentração das amostras considerou-se que uma unidade de densidade ótica (DO) é equivalente a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Sambrook et al., 1989). A pureza do DNA também foi avaliada em espectrofotômetro pelas relações 260/280 e 260/230 nm.

As amostras foram corridas em gel de agarose a 1,0% com tampão TBE (0,5X) (89 mM de TRIS-base; 89 mM de ácido bórico; 2 mM de EDTA; pH 8,0) para verificação da presença e quantidade dos DNAs, sendo a fotodocumentação computadorizada realizada através do sistema EDAS 120- Kodak.

Perfis de amplificação com oligonucleotídeos iniciadores

Os variantes e suas respectivas estirpes originais foram caracterizados pela PCR com a utilização do oligonucleotídeo iniciador RP01 (5' – AATTTTCAAGCGTCGTGCCA – 3').

Por apresentar uma sequência específica de uma região conservada do promotor do gene nifHDK, o oligonucleotídeo iniciador RP01 tem sido indicado para caracterização de variantes de *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii* (Kozusny-Andreani, 1997).

As reações para amplificação dos DNAs genômicos com este oligonucleotídeo iniciador foram realizadas de acordo com Richardson et al. (1995) (Tabela 2).

TABELA 2. Composição da mistura (master mix) para as reações de PCR para cada oligonucleotídeo iniciador

Componentes	Oligonucleotídeos iniciadores		
	BOX A 1-R	ERIC1-R + ERIC-2	RP01
Tampão 10x - Gibco BRL	1x*	1x*	1x*
MgCl ₂ (50mM) - Gibco BRL	1,5 mM	2,0 mM	1,5 mM
dNTP's (10mM) - Pharmacia	100 μM	100 μM	100 μM
Taq Polimerase (5U/ μL) – Gibco BRL	1U	1U	1U
BSA (0,85mg mL ⁻¹)	0,85 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$	-	-
DMSO	-	1,5 μL	1,5 μL
Primer – Gibco BRL	1 μM	1 μM	0,5 μM
H ₂ O Milli Q	**	**	**

* Tampão 10x (200 mM Tris-HCl, pH 8,4; 500 mM KCl)

** Água ultrapura em quantidade necessária para completar o volume de 25 μL da reação

Os DNAs dos diversos variantes também foram comparados pela técnica de PCR, baseada nas sequências repetidas de ERIC-PCR e BOX-PCR.

Na reação de amplificação com primers dirigidos, ERIC-PCR e BOX-PCR, apresentam as seguintes sequências: 3'-CACTTAGGGGTCCTCCTCGAATGTA-5'

(ERIC1R), 5'- AAGTAAGTGAAGTGGGTGAGCG-3' (ERIC2) e 5'- CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3' (BOX A 1-R).

A reação de amplificação com o oligonucleotídeo iniciador BOX A 1-R foi realizada de acordo com o protocolo de Martin et al. (1992) com algumas modificações (Tabela 2) sendo a reação de amplificação com o oligonucleotídeo iniciador ERIC (ERIC 1R + ERIC 2) realizada de acordo com o protocolo adaptado de Brujin (1992) (Tabela 2).

Para as amplificações dos DNAs foi utilizado como controle negativo das reações Água ultrapura. A concentração de DNA genômico usada nas amplificações variou de 20 a 50 ng μ L.

As condições de amplificação empregadas para a programação do termociclador com os diferentes oligonucleotídeos iniciadores testados encontram-se descritas na Tabela 3.

TABELA 3. Programa dos ciclos para o oligonucleotídeo iniciador utilizado nas reações de amplificação dos DNA genômicos de estirpes e variantes de *Bradyrhizobium spp*

Ciclo	Nº de vezes	Oligonucleotídeo iniciador		
		BOX A 1-R	ERIC1-R + ERIC-2	RP01
1º	1	1 X 95°C (6 min)	1 X 95°C (7 min)	1 X 94°C (1 min)
2º	35	90°C (30 seg)	94°C (1 min)	94°C (1 min)
		35 X 52°C (1 min) 65°C (8 min)	30 X 52°C (1 min) 65°C (8 min)	35 X 51°C (1 min) 72°C (2 min)
3º	1	1 X 65°C (16 min)	1 X 65°C (16 min)	1 X 72°C (5 min)
4º	1	4°C (até desligar)	4°C (até desligar)	4°C (até desligar)

3.7.3.3 Géis para análise de fragmentos amplificados por PCR

A separação dos fragmentos amplificados pela PCR com os oligonucleotídeos iniciadores BOX A 1-R, ERIC e RP01 foi realizada em géis de agarose (1,5%) em cuba horizontal com tampão TBE (0,5X). Como padrão de peso molecular foi usado 1 kb DNA ladder (Gibco-BRL). A eletroforese foi conduzida a uma voltagem constante de 80V durante três horas e o gel corado durante 20 minutos em solução de brometo de etídio (5 μ g mL⁻¹). A visualização dos fragmentos foi realizada através de transluminador com luz ultravioleta e fotodocumentação computadorizada realizada através do sistema EDAS 120- Kodak.

3.7.2.4 Análises de relacionamento genético

As análises realizadas para estimar o relacionamento genético (filogenético) entre as estirpes originais e os seus respectivos variantes utilizaram como informação

básica as matrizes de presença (1) e ausência (0), constituídas a partir do perfil de bandas obtido pela revelação dos géis de agarose para os oligonucleotídeos iniciadores utilizados. Os agrupamentos foram realizados segundo o método de agrupamento UPGMA – Unweighted pair group with arithmetic mean (Nei, 1987) e coeficiente de Jaccard (Legendre & Legendre, 1983) para o cálculo da matriz de similaridade, sendo o programa NTSYS – Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (Rohlf & Slice, 1992) utilizado para o cálculo de similaridade e elaboração dos dendrogramas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Detecção da atividade da hidrogenase em variantes de *Bradyrhizobium* spp

O resultado desta análise revelou a presença do fenótipo hup^+ em variantes isolados das estirpes de *B. japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) e *B. elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019) (Figura 1).

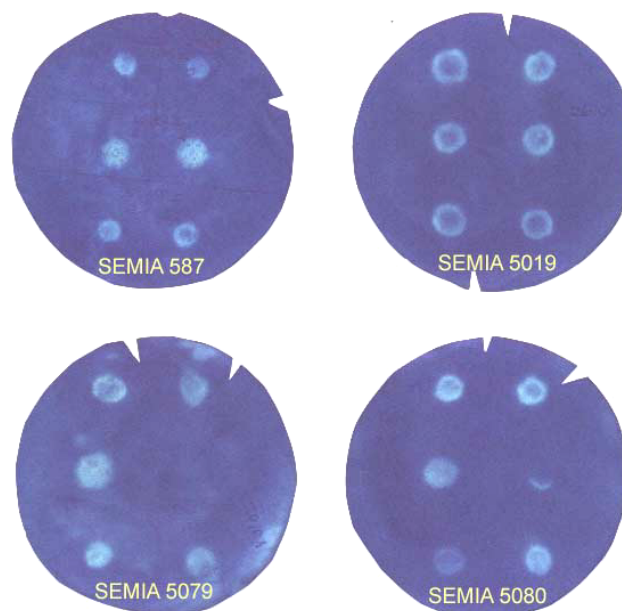


FIGURA 1. Resultado da análise de expressão da hidrogenase “in vitro” em culturas selecionadas a partir do isolamento de nódulos das estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 (*B. japonicum*) SEMIA 587 e SEMIA 5019 (*B. elkanii*).

Observa-se na Tabela 4 que entre os trinta variantes isolados de cada estirpe, 33%, 60%, 87% e 63%, respectivamente para as estirpes SEMIA 5079, SEMIA 5080, SEMIA 587 e SEMIA 5019 expressaram o fenótipo hidrogenase

TABELA 4. Expressão do fenótipo hidrogenase (*hup*) em variantes isolados das estirpes de *B. japonicum* (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) e *B. elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019).

Variantes isolados da estirpe SEMIA 5079*					
1 (1A)	+	11	-	21	-
2 (2A)	+	12 (5A)	+	22	-
3	-	13	-	23	-
4	-	14	-	24	-
5 (3A)	+	15	-	25	-
6	-	16 (6A)	+	26	-
7 (4A)	+	17	-	27 (9A)	+
8	-	18	-	28	-
9	-	19 (7A)	+	29 (10A)	+
10	-	20 (8A)	+	30	-
Variantes isolados da estirpe SEMIA 5080*					
1 (1B)	+	11 (4B)	+	21	-
2	+	12 (5B)	+	22	-
3 (2B)	+	13	+	23 (8B)	+
4	+	14	-	24	+
5	+	15 (6B)	+	25 (9B)	+
6	-	16	+	26	+
7 (3B)	+	17 (7B)	+	27	+
8	-	18	+	28(10B)	+
9	-	19	-	29	-
10	-	20	+	30	+
Variantes isolados da estirpe SEMIA 587*					
1	+	11	-	21 (8C)	+
2 (1C)	+	12 (5C)	+	22	+
3	+	13	+	23 (9C)	+
4 (2C)	+	14	+	24	+
5	+	15 (6C)	+	25	-
6	+	16	-	26	+
7 (3C)	+	17	+	27 (10C)	+
8	+	18 (7C)	+	28	+
9 (4C)	+	19	+	29	+
10	-	20	+	30	+
Variantes isolados da estirpe SEMIA 5019*					
1 (1D)	+	11	+	21 (7D)	+
2	+	12	-	22 (8D)	+
3 (2D)	+	13 (4D)	+	23	-
4	-	14	+	24	+
5	+	15	-	25 (9D)	+
6	+	16 (5D)	+	26	+
7 (3D)	+	17	-	27	+
8	-	18 (6D)	+	28 (10D)	+
9	-	19	+	29	-
10	+	20	-	30	-

* + = fenótipo *hup*⁺; - = fenótipo *hup*⁻

positiva (*hup*⁺). Contudo, a ocorrência do fenótipo *hup*⁺ em estirpes de *Bradyrhizobium* que nodulam a soja, tem sido observada apenas em estirpes de *B. japonicum* (Fuhrmann, 1990; Minamisawa, 1989), como a SEMIA 5080 (Boddey, 1995).

O método original descrito por Haugland et al. (1983) combina a redução do corante azul de metileno a um procedimento auxiliar para despreensão do sistema hidrogenase, uma vez que colônias de *Rhizobium japonicum* normalmente não expressam o sistema hidrogenase em vida livre (Lim, 1978). Convém ressaltar que nas condições do presente trabalho, foi utilizado o meio TY como fonte de

nutrientes, em substituição ao meio Meyer utilizado no método original, sendo provável que o rápido esgotamento do meio tenha favorecido a expressão do fenótipo *hup*⁺, uma vez que estudos conduzidos com uma cultura de *Azotobacter chroococcum* mostraram que, sob condições de limitação de carbono e fósforo, as culturas são fortemente dominadas pelo fenótipo *hup*⁺ (Yates & Campbell, 1989 *apud* Hungria & Araújo, 1994). Entretanto, Haugland et al. (1983) afirmaram que, na ausência de inibidores respiratórios, ambas as colônias *hup*⁺ e *hup*⁻ de *R. japonicum* reduzem o azul de metileno em taxas aproximadamente iguais e essa atividade pode ser observada em atmosferas saturadas por íons H₂ ou N₂. Mas, segundo os autores, a incorporação de ácido malônico e ácido indolacético, utilizada neste método, seria suficiente para inibir a redução do corante por substratos endógenos sem afetar as estimativas de redução de H₂ dependente deste corante. Embora tenham sido utilizados ácido malônico e ácido indolacético como inibidores nesta experimentação, a redução de azul de metileno por variantes *hup*⁺ e *hup*⁻ foram equivalentes, indicando provavelmente uma redução não restrita apenas ao sistema hidrogenase diretamente ligado à fixação de N₂, o que neste caso, de acordo com Meek & Arp (2000), estaria relacionado ao fato de que o corante, ao ser reduzido, teria aceitado tanto elétrons diretamente do sistema hidrogenase, assim como de outros ligantes localizados ao longo da cadeia de transporte de elétrons, resultando em uma redução não específica.

Provavelmente, a adaptação ao método proposto por Haugland et al. (1983) conforme relatado anteriormente, tenha superestimado a frequência deste fenótipo em variantes isolados de estirpes de *B. elkanii* (Tabela 4), que tradicionalmente é relatada como uma espécie *hup*⁻ (Fuhrmann, 1990; Minamisawa, 1990). Porém, se de fato, foram isolados variantes *hup*⁺ para ambas espécies de *Bradyrhizobium*, estes poderiam ter seu fenótipo confirmado através de estudos mais complexos, envolvendo a hibridização DNA:DNA, com utilização de sondas com genes específicos para a hidrogenase (Hidal et al., 1992 *apud* Lemos, 1994).

4.2. Eficiência simbiótica dos variantes de *Bradyrhizobium spp*

Os resultados de nodulação (número e massa nodular), produção de matéria seca e N total acumulado na parte aérea, para os tratamentos inoculados com a estirpe original SEMIA 5079 e seus variantes, podem ser observados na Tabela 5. Observa-se a existência de grande variabilidade quanto à nodulação (número de nódulos e massa nodular) entre os tratamentos inoculados.

TABELA 5. Avaliação da nodulação (número e peso de nódulos secos) e da produção de matéria seca da parte aérea de soja (*Glycine max*) cultivar BR 16, inoculada com a estirpe SEMIA 5079 e seus variantes, aos 35 dias após o plantio.

Tratamentos	Nodulação		Parte Aérea	
	Nódulos (N° vaso ⁻¹)*	Massa nód.secos (mg vaso ⁻¹)	de Matéria seca (g vaso ⁻¹)	N-total (mg vaso ⁻¹)
SEMIA 5079 (A)	90,2 b	520,00 a	9,42 b	259,30 c
1A	86,2 b	530,00 a	10,56 a	310,92 a
2A	134,5 a	470,00 ab	9,60 b	259,04 c
3A	70,9 b	370,00 bc	4,81 c	152,44 d

4A	39,2 c	330,00 c	4,05 d	119,42 e
5A	26,0 cd	146,66 d	2,44 e	52,70 f
6A	25,6 d	83,33 d	2,15 e	51,54 g
7A	2,6 e	53,33 d	2,40 e	20,00 g
8A	2,6 e	73,30 d	2,10 e	17,45 g
9A	2,6 e	56,66 d	1,94 e	16,49 g
10A	2,6 e	53,33 d	1,82 e	15,17 g
TA	—	—	0,74 f	8,45 g
TN	—	—	10,63 a	279,91 b
CV	15,1	16,3	16,3	17,1

* Dados transformados por $\sqrt{x+1}$

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey 5%

O tratamento inoculado com o variante 2A destaca-se quanto ao número de nódulos, apresentando valores significativamente superiores aos demais tratamentos. Não foram observadas diferenças estatísticas entre a estirpe original SEMIA 5079 e os variantes 1A e 3A quanto ao número de nódulos formados, porém estes tratamentos diferiram estatisticamente dos tratamentos que apresentaram menor nodulação.

A produção de massa nodular nos tratamentos inoculados variaram em até 100 vezes, considerando o maior e o menor rendimento, 530 mg e 53 mg, obtido pelos variantes 1A e 10A respectivamente. Em geral, os valores médios de massa nodular correspondem ao número de nódulos formados, onde a estirpe original SEMIA 5079 e os variantes 1A e 2A apresentam valor de massa nodular superior aos demais tratamentos. Observa-se que os tratamentos que apresentaram menor quantidade de nódulos formados também apresentaram massa nodular, produção de matéria seca e N total acumulado estatisticamente inferior (Tabela 5).

Em relação à produção de matéria seca da parte aérea observa-se que o tratamento inoculado com o variante 1A apresentou resultados equivalentes a testemunha nitrogenada, apresentando ainda valores médios da produção de matéria seca superiores aos demais tratamentos (Tabela 5). O variante 2A obteve produção de matéria seca semelhante à estirpe original SEMIA 5079, enquanto os demais variantes apresentaram menor produção de matéria seca quando comparados à estirpe original.

Os valores de N total acumulado na parte aérea estão, relacionados com os resultados da produção de matéria seca. Observa-se que o variante 1A apresentou um acúmulo de N total superior aos demais tratamentos. Embora o variante 2A e a estirpe original SEMIA 5079 apresentem elevados valores de N total, estes tratamentos foram inferiores à testemunha nitrogenada. A ineficiência dos variantes 6A, 7A, 8A, 9A e 10A, fica evidente quando se comparam os seus rendimentos de N total ao rendimento obtido na testemunha absoluta. A ocorrência de variantes ineficientes numa mesma estirpe pode condicionar uma menor expressão na fixação do nitrogênio (eficiência em fixar N_2), conforme observado por Rodriguez (1984) para dois variantes isolados da estirpe matriz de *Rhizobium leguminosarum* bv phaseoli CB 410. Enquanto o variante 410-2 apresentou uma nodulação abundante e inefetiva, fixando menos da metade do N total acumulado pela estirpe original, o variante 410-1 apresentou-se tão eficiente quanto à estirpe da qual foi isolado.

Em relação à nodulação (número de nódulos e massa nodular) nos tratamentos inoculados com a estirpe original SEMIA 5080 e seus variantes, observa-se que a estirpe original e os variantes 1B,

2B, 3B, 4B e 5B, apresentam excelente formação de nódulos e massa nodular, enquanto os demais variantes apresentaram menor nodulação e massa nodular (Tabela 6). Labandera & Vincent (1975), trabalhando também com *R. trifolii*, encontraram maior infectividade das culturas derivadas do que a da estirpe original, sendo no entanto ineficientes.

TABELA 6. Avaliação da nodulação (número e peso de nódulos secos) e da produção de matéria seca da parte aérea de soja (*Glycine max*) cultivar BR 16, inoculada com a estirpe SEMIA 5080 e seus variantes, aos 35 dias após o plantio.

Tratamentos	Nodulação		Parte Aérea	
	Nódulos (N° vaso ⁻¹)*	Massa nód.secos (mg vaso ⁻¹)	de Matéria seca (g vaso ⁻¹)	N-total (mg vaso ⁻¹)
SEMIA 5080 (B)	102,2 a	536,66 a	10,84 a	315,96 a
1B	100,4 a	483,33 a	9,80 bc	293,38 b
2B	84,3 a	473,33 a	9,47 c	288,16 b
3B	96,6 a	550,00 a	10,12 abc	277,12 b
4B	100,6 a	473,33 a	9,48 c	255,92 c
5B	81,4 a	423,33 a	10,06 abc	245,47 c
6B	3,5 cd	103,33 b	3,19 d	58,96 d
7B	17,9 b	176,66 b	3,04 d	36,56 e
8B	8,5 c	116,66 b	1,91 e	21,90 ef
9B	2,0 d	36,66 b	1,80 e	18,45 ef
10B	3,2 cd	103,33 b	1,89 e	15,75 f
TA	—	—	0,74 f	8,45 f
TN	—	—	10,63 ab	279,91 b
CV	18,1	16,4	18,4	15,5

* Dados transformados por $\sqrt{x+1}$

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey 5%

Os melhores resultados da produção de matéria seca foram obtidos pelos tratamentos inoculados com a estirpe SEMIA 5080 e os variantes 3B e 5B, e a testemunha nitrogenada (Tabela 6). O variante 1B também apresentou bom desempenho quanto à produção de matéria seca, não diferindo da testemunha nitrogenada. Os tratamentos inoculados com os variantes 6B, 7B, 8B, 9B e 10B apresentaram os menores valores para produção de matéria seca da parte aérea, com reduções que variaram de 81% (6B) até 84% (9B) quando comparados à estirpe original SEMIA 5080, contudo, estes variantes apresentaram acúmulo de matéria seca significativamente superior à testemunha absoluta.

A estirpe original SEMIA 5080 apresentou valores médios de N total acumulado na parte aérea superiores aos demais tratamentos, entretanto os variantes 1B, 2B e 3B também apresentaram desempenho equivalente à testemunha nitrogenada (Tabela 6). Observa-se que os variantes 8B, 9B e 10B foram ineficientes, apresentando desempenho equivalente à testemunha absoluta. Em geral, ao se comparar variantes com estirpes originais, é comum os variantes apresentarem alterações de importantes características simbióticas, tais como a perda de infectividade ou alterações na eficiência e potencial de competição por sítios nodulares, conforme observado por Kuykendall & Elkan (1976) e Mullen & Wollum II (1989).

Os resultados de nodulação, produção de matéria seca e N total acumulado na cultivar de soja BR 16, quando inoculada com a estirpe original SEMIA 587 e seus variantes, são apresentados na Tabela 7. Para os tratamentos inoculados com a estirpe original SEMIA 587 e os variantes 1C e 3C, não foram observadas diferenças significativas quanto ao número de nódulos formados, estes tratamentos diferiram dos tratamentos que apresentaram menor número de nódulos (2C, 7C, 8C, 9C e 10C).

TABELA 7. Avaliação da nodulação (número e peso de nódulos secos) e da produção de matéria seca da parte aérea de soja (*Glycine max*) cultivar BR 16, inoculada com a estirpe SEMIA 587 e seus variantes, aos 35 dias após o plantio.

Tratamentos	Nodulação		Parte Aérea	
	Nódulos (N° vaso ⁻¹)*	Massa de nód.secos (mg vaso ⁻¹)	Matéria seca (g vaso ⁻¹)	N-total (mg vaso ⁻¹)
SEMIA 587 (C)	111,8 a	730,00 ab	9,82 ab	295,55 a
1C	103,4 ab	716,66 ab	9,26 bc	244,81 b
2C	47,2 d	353,33 c	7,53 de	193,11 c
3C	96,4 ab	786,66 a	9,08 bc	241,86 b
4C	61,3 d	526,66 bc	7,23 e	230,85 b
5C	84,4 bc	663,33 ab	8,43 cd	199,89 c
6C	85,5 bc	556,66 bc	7,85 de	242,84 b
7C	64,3 cd	636,66 ab	7,78 de	183,32 c
8C	11,5 e	113,33 d	2,81 f	50,87 d
9C	3,8 f	90,00 d	2,51 f	37,92 d
10C	4,0 f	40,00 d	1,80 f	10,71 e
TA	—	—	0,74 g	8,45 e
TN	—	—	10,63 a	279,91 a
CV	15,4	16,4	13,7	15,2

* Dados transformados por $\sqrt{x+1}$

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey 5%

Em geral os variantes e a estirpe SEMIA 587 apresentaram boa produção de massa nodular (Tabela 7). Observa-se que a estirpe original e os variantes 1C, 3C, 5C e 7C apresentam valor de massa nodular superior aos demais tratamentos. Os variantes 8C, 9C e 10C, que apresentaram baixo número de nódulos formados, também apresentaram massa nodular, produção de matéria seca e N total acumulado inferior aos demais tratamentos, indicando que o número de nódulos formados em um sistema simbiótico planta-rizóbio está relacionado à infectividade da estirpe e não à sua eficiência, conforme afirmado por Döbereiner et al. (1966).

A melhor produção de matéria seca e N total acumulado, foram obtidas pela inoculação da estirpe SEMIA 587 e pela testemunha nitrogenada (Tabela 7). Com exceção dos variantes 8C, 9C e 10C, observa-se que os demais variantes apresentaram boa produção de matéria de seca e acúmulo de N total. Sato (1995) e Kober (1997) observaram variações quanto à eficiência simbiótica entre isolados da estirpe SEMIA 587 inoculados na cultivar de soja Jacuí-7, pois enquanto o variante 587 P-2, apesar de formar muitos nódulos foi inefetivo, elevados índices de

eficiência relativa foram observados quando esta cultivar foi inoculada com o variante 587 P-7.

Nos tratamentos inoculados com a estirpe original SEMIA 5019 e seus variantes (Tabela 8), observa-se a mesma tendência de grande variabilidade quanto à nodulação (número e massa nodular) observada anteriormente com os outros grupos de estirpes originais e variantes. O variante 3D e a estirpe SEMIA 5019 destacam-se quanto ao número de nódulos formados, apresentando valores superiores aos demais tratamentos inoculados (Tabela 8).

Em geral, a massa nodular nos tratamentos inoculados com a estirpe SEMIA 5019 e seus variantes, correspondeu ao número de nódulos formados. Observa-se que a estirpe SEMIA 5019 e os variantes 1D, 2D, 3D, 4D e 5D apresentam massa nodular superior aos demais tratamentos inoculados. Os variantes 7D, 8D, 9D e 10D, que apresentaram baixo número de nódulos formados também apresentaram rendimento em massa nodular inferior aos tratamentos com melhor nodulação, de maneira que a massa nodular neste grupo variou de 33,3 mg a 673,33 mg, considerando os valores extremos obtidos pelos variantes 9D e 3D respectivamente (Tabela 8).

TABELA 8. Avaliação da nodulação (número e peso de nódulos secos) e da produção de matéria seca da parte aérea de soja (*Glycine max*) cultivar BR 16, inoculada com a estirpe SEMIA 5019 e seus variantes, aos 35 dias após o plantio.

Tratamentos	Nodulação		Parte Aérea	
	Nódulos (N° vaso ⁻¹)*	Massa nód.secos (mg vaso ⁻¹)	de Matéria seca (g vaso ⁻¹)	N-total (mg vaso ⁻¹)
SEMIA 5019 (D)	109,5 a	520,00 ab	11,28 a	232,11 bc
1D	62,8 b	650,00 a	8,25 b	237,79 b
2D	65,3 b	520,00 ab	7,85 b	219,35 cd
3D	120,8 a	673,33 a	7,80 b	201,52 de
4D	59,1 b	536,66 ab	7,40 b	200,39 e
5D	29,7 c	496,66 ab	6,01 c	124,15 f
6D	23,8 c	390,00 b	5,44 c	85,33 g
7D	5,6 d	100,00 c	3,76 d	52,77 h
8D	4,3 d	66,66 c	1,97 e	30,92 i
9D	4,6 d	33,33 c	2,46 e	17,57 ij
10D	4,0 d	33,33 c	1,63 ef	13,32 ij
TA	—	—	0,74 f	8,45 j
TN	—	—	10,63a	279,91 a
CV	19,5	18,7	15,8	18,4

* Dados transformados por $\sqrt{x+1}$

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey 5%

Quanto à produção de matéria seca da parte aérea observa-se que a estirpe SEMIA 5019 não diferiu da testemunha nitrogenada, apresentando resultado superior aos demais tratamentos (Tabela 8). Os variantes 1D, 2D, 3D e 4D obtiveram valores

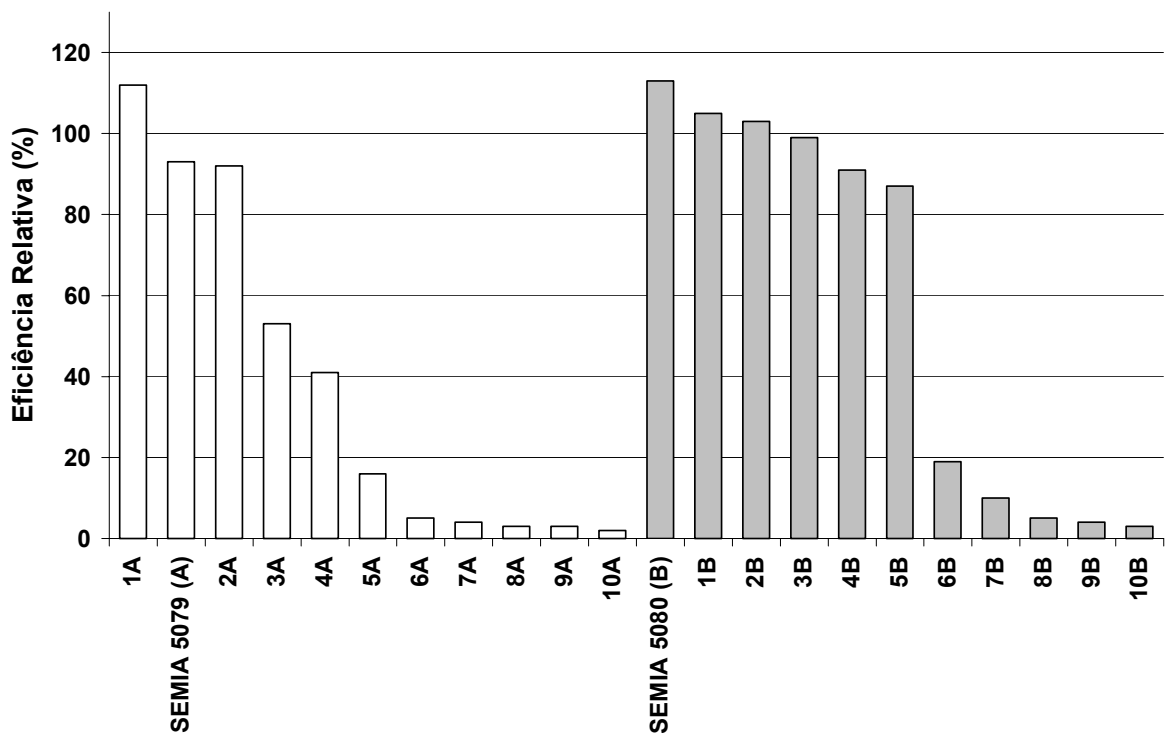
superiores de matéria seca em relação aos demais variantes. Os variantes com menor acúmulo de matéria seca foram o 8D, 9D e 10D, e dentre estes apenas o variante 10D não diferiu da testemunha absoluta.

Os valores obtidos de N total acumulado na parte aérea, em geral, correspondem aos resultados de produção de matéria seca (Tabela 8). Observa-se que a testemunha nitrogenada apresentou rendimento de N total superior aos demais tratamentos. A estirpe original SEMIA 5019 e os variantes 1D, 2D, 3D e 4D apresentam valores de N total superiores aos demais variantes. Os menores valores de N total acumulado foram obtidos pelos variantes 9D e 10D que apresentaram valores similares à testemunha absoluta, apesar de terem induzido a formação de nódulos na cultivar BR-16, o que evidencia a ineficiência deste dois variantes.

Resultados semelhantes aos observados neste estudo com os variantes da estirpe SEMIA 5019, foram observados por Peres et al. (1984) em isolados obtidos de nódulos da cultivar de soja IAC-2 inoculada com a estirpe SEMIA 5019, sendo observado uma boa relação entre o peso dos nódulos e o N-total acumulado, e que a ausência de correlação destes parâmetros com o número dos nódulos seria um indicativo de que a variação na eficiência de fixação de N_2 não estaria associada à capacidade de formar nódulos pelos isolados da estirpe SEMIA 5019.

As médias dos índices de eficiência relativa, demonstradas nas Figuras 2 e 3, indicam a porcentagem da contribuição, em termos de nitrogênio total acumulado na parte aérea, do tratamento inoculado em relação aos tratamentos controle com e sem adição de nitrogênio.

FIGURA 2. Índices de eficiência relativa dos tratamentos inoculados com estirpes



originais e variantes de *B. japonicum* em relação ao N total acumulado em soja (*Glycine max*) cultivar BR 16, aos 35 dias após o plantio.

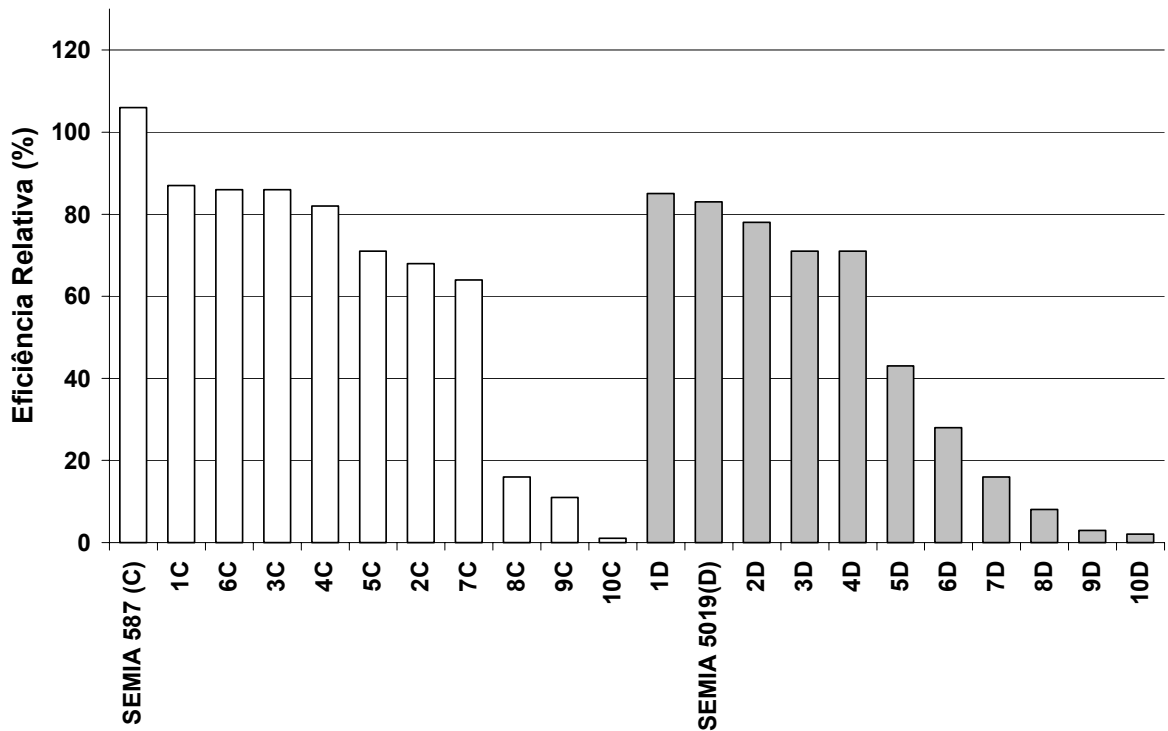


FIGURA 3. Índices de eficiência relativa dos tratamentos inoculados com estirpes originais e variantes de *B. elkanii* em relação ao N total acumulado em soja (*Glycine max*) cultivar BR 16, aos 35 dias após o plantio.

De forma geral, os variantes das estirpes originais SEMIA 5079, SEMIA 5080, SEMIA 587 e SEMIA 5019 demonstram grande variabilidade na fixação de nitrogênio. Enquanto para alguns variantes foi observado um excelente desempenho (acima de 80%), para outros, os índices de eficiência relativa foram inferiores a 10% (Figuras 2 e 3).

Uma melhor eficiência simbiótica (acima de 80%) foi observada para 20% dos variantes da estirpe SEMIA 5079, 50% dos variantes da estirpe SEMIA 5080, 40% dos variantes das estirpes SEMIA 587 e 20% dos variantes da SEMIA 5019, o que representa a possibilidade de obter variantes promissoras quanto à eficiência de fixação de N_2 a partir das estirpes que já possuem características desejáveis para a produção de inoculantes para a cultura da soja.

Observa-se que houve maior número de variantes ineficientes isolados a partir das estirpes SEMIA 5079 e da SEMIA 5019, apesar de terem sido utilizados para inóculo variantes que expressaram o fenótipo hup^+ pelo teste da atividade da hidrogenase, podendo indicar que para a maioria dos isolados o fenótipo hup^+ foi de fato superestimado. Entretanto, Devron et al. (1987) observaram que aos 75 dias a soja inoculada com estirpes isogênicas hup^+ apresentava menor matéria seca da parte aérea, o que foi atribuído pelos autores à limitação de O_2 nos nódulos, pela oxidação da hidrogenase. Estirpes de rizóbios rotineiramente são reisoladas em órgãos de pesquisa para a renovação de culturas estoque armazenadas durante um certo período e conforme constado nesta experimentação existe um grande risco de serem obtidas estirpes de menor eficiência que a estirpe original (Figuras 2 e 3).

Os resultados obtidos no presente estudo estão de acordo com a hipótese sugerida por Meyer & Pueppke (1980) de que algumas estirpes de *B. japonicum* consistem em misturas de células que coexistem numa mesma população. A análise sorológica revelou que os nódulos isolados dos variantes das estirpes SEMIA 5080, SEMIA 587 e SEMIA 5019 apresentaram a mesma reação antigênica das estirpes originais. Assim, estirpes do mesmo sorogrupo de reação ou variantes genéticos de

uma mesma estirpe fazem parte de um mesmo material biológico (Peres et al., 1984).

Com base na média dos índices de eficiência relativa apresentada nas Figuras 2 e 3, foram selecionados os variantes 1A, 2A, 3A, 1B, 3B, 4B, 1C, 3C, 6C, 1D e 2D utilizados nas próximas etapas do trabalho.

4.3 Especificidade hospedeira de variantes e estirpes de *B. japonicum* e *B. elkanii*

Para os valores médios do número de nódulos produzidos na cultivar Clark, não houve diferença significativa entre os tratamentos inoculados com variantes e estirpes originais (Tabela 9). Diferenças só foram observadas entre os tratamentos que obtiveram melhores resultados de nodulação (SEMIA 5079 e o variante 1A) com os tratamentos onde houve menor formação de nódulos (SEMIA 5032, SEMIA 5019 e o variante 2D). Em geral, os tratamentos inoculados com os variantes apresentaram maiores valores de massa nodular do que os tratamentos inoculados com as estirpes originais, com exceção da inoculação com a estirpe original SEMIA 5079, que apresentou valores superiores em relação aos tratamentos inoculados com seus variantes (1A, 2A e 3A). Entre os tratamentos inoculados com variantes e estirpes originais, a média dos resultados de massa nodular obtida pelos tratamentos inoculados com a estirpe original SEMIA 5079 e seus variantes foram superiores aos demais.

TABELA 9. Avaliação da nodulação (número e peso de nódulos secos) e da produção de matéria seca da parte aérea de soja (*Glycine max*) cultivar Clark, inoculada com estirpes e variantes de *Bradyrhizobium spp*, aos 35 dias após o plantio.

Tratamentos	Nodulação		Parte Aérea
	Nódulos (N° vaso ⁻¹)*	Massa de nód.secos (mg vaso ⁻¹)	Matéria seca (g vaso ⁻¹)
SEMIA 5079 (A)	63,3 a	135,00 ab	1,84 cd
1A	60,3 a	118,76 abc	1,57 cde
2A	42,9 ab	132,66 ab	1,50 cdef
3A	52,9 ab	118,56 abc	1,18 efg
SEMIA 5080 (B)	45,6 ab	42,00 d	1,07 fg
1B	60,0 ab	151,00 a	1,69 cd
3B	44,3 ab	70,66 bcd	1,17 efg
4B	47,7 ab	86,67 abcd	1,41 def
SEMIA 587 (C)	42,2 ab	39,66 d	1,88 c
1C	42,3 ab	127,00 abc	1,94 bc
3C	49,8 ab	79,66 bcd	2,38 ab
6C	45,8 ab	73,33 bcd	2,39 a
SEMIA 5019 (D)	26,5 b	85,00 abcd	1,60 cde
1D	41,0 ab	126,66 abc	1,52 cdef
2D	30,4 b	94,66 abcd	1,52 cdef
SEMIA 5087	51,7 ab	61,33 cd	1,17 efg

SEMIA 5032	27,6 b	33,00 d	1,85 c
TA	—	—	0,90 g
TN	—	—	1,41 def
CV	18,4	20,1	15,9

* Dados transformados por $\sqrt{x+1}$

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey 5%

Em relação à produção de matéria seca na cultivar Clark observa-se que todos os tratamentos inoculados apresentaram acúmulo de matéria seca superior ou equivalente à testemunha nitrogenada (Tabela 9). Os melhores rendimentos médios de matéria seca foram obtidos pelos tratamentos inoculados com a estirpe original SEMIA 587 e os seus variantes, apresentando os tratamentos inoculados com os variantes 3C e 6C médias para o acúmulo de matéria seca superiores aos demais tratamentos.

Para a cultivar de soja Peking, observa-se uma maior nodulação nos tratamentos inoculados com variantes de *B. japonicum* do que em suas estirpes originais (Tabela 10). Contudo o número de nódulos nos tratamentos inoculados com as estirpes originais SEMIA 587 e SEMIA 5019 foi maior do que nos tratamentos inoculados com seus variantes. Diferenças somente foram observadas entre o tratamento inoculado com a estirpe SEMIA 5032 e os tratamentos representados pelo variante 3C e as estirpes originais SEMIA 5080 e SEMIA 5079. Não houve diferença estatística entre os valores de peso de nódulos secos entre os tratamentos inoculados.

TABELA 10. Avaliação da nodulação (número e peso de nódulos secos) e da produção de matéria seca da parte aérea soja (*Glycine max*) cultivar Peking, inoculada com estirpes e variantes de *Bradyrhizobium spp*, aos 35 dias após o plantio.

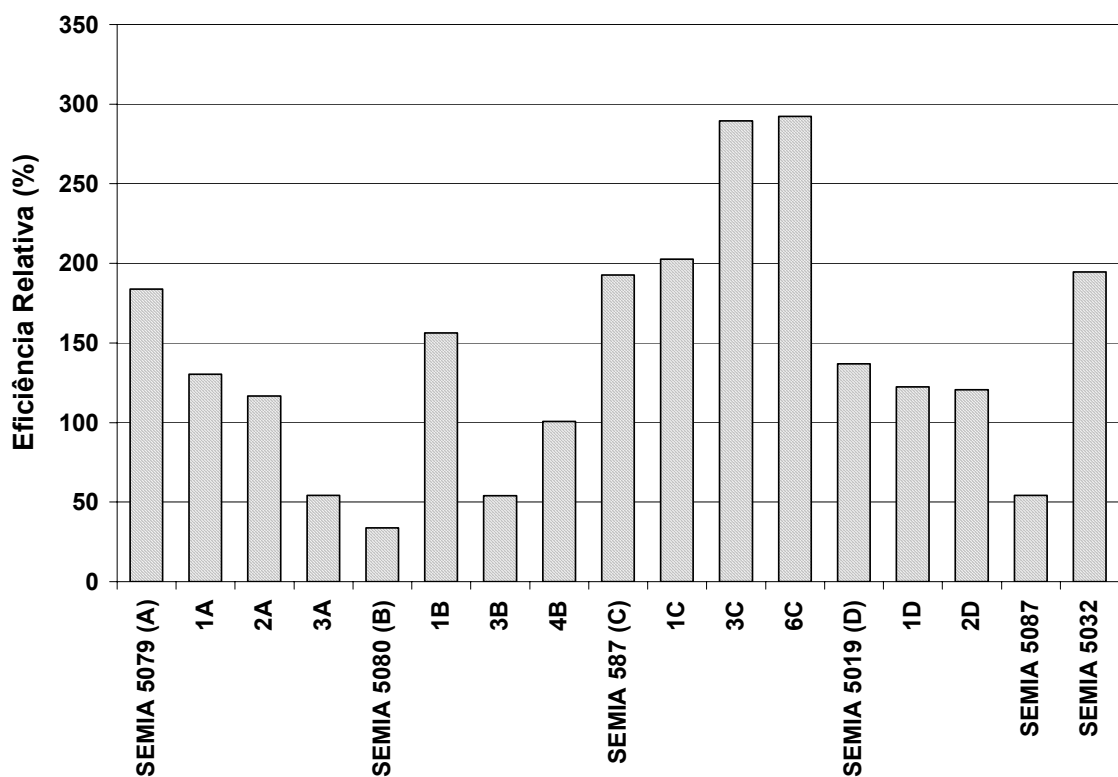
Tratamentos	Nodulação Nódulos (N° vaso ⁻¹)*	Massa de nód.secos (mg vaso ⁻¹)	Parte Aérea Matéria seca (g vaso ⁻¹)
SEMIA 5079 (A)	7,2 c	46,30 a	0,82 gh
1A	32,1 ab	53,93 a	1,04 fg
2A	38,6 ab	52,63 a	0,94 g
3A	36,9 ab	50,03 a	0,82 gh
SEMIA 5080 (B)	28,4 bc	52,47 a	1,30 defg
1B	38,3 ab	55,33 a	1,59 cde
3B	36,2 ab	95,20 a	1,53 cde
4B	37,6 ab	79,53 a	1,61 cde
SEMIA 587 (C)	56,9 ab	102,27 a	1,88 bc
1C	50,1 ab	94,27 a	1,86 bc
3C	28,7 bc	52,93 a	2,13 ab
6C	41,0 ab	76,93 a	2,55 a
SEMIA 5019 (D)	44,7 ab	81,00 a	2,51 a
1D	38,1 ab	58,20 a	1,72 bcd
2D	36,8 ab	66,60 a	1,15 efg
SEMIA 5087	35,8 ab	68,33 a	1,47 cdef
SEMIA 5032	72,3 a	43,66 a	1,22 efg

TA	—	—	0,47 h
TN	—	—	0,94 g
CV	17,8	20,5	15,7

* Dados transformados por $\sqrt{x+1}$

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey 5%

A média de produção de matéria seca do tratamento controle com adição de nitrogênio foi similar ou inferior aos tratamentos inoculados na cultivar de soja Peking (Tabela 10). Os melhores rendimentos de matéria seca foram obtidos quando a estirpe de *B. elkanii* SEMIA 5019, ou os variantes 3C e 6C foram inoculados nesta cultivar.



As médias dos índices de eficiência relativa obtidas nas cultivares de soja Clark e Peking são apresentadas nas Figuras 4 e 5.

FIGURA 4. Índices de eficiência relativa dos tratamentos inoculados com estirpes e variantes de *B. japonicum* e *B. elkanii* em relação a produção de matéria seca de soja (*Glycine max*) cultivar Clark, aos 35 dias após o plantio.

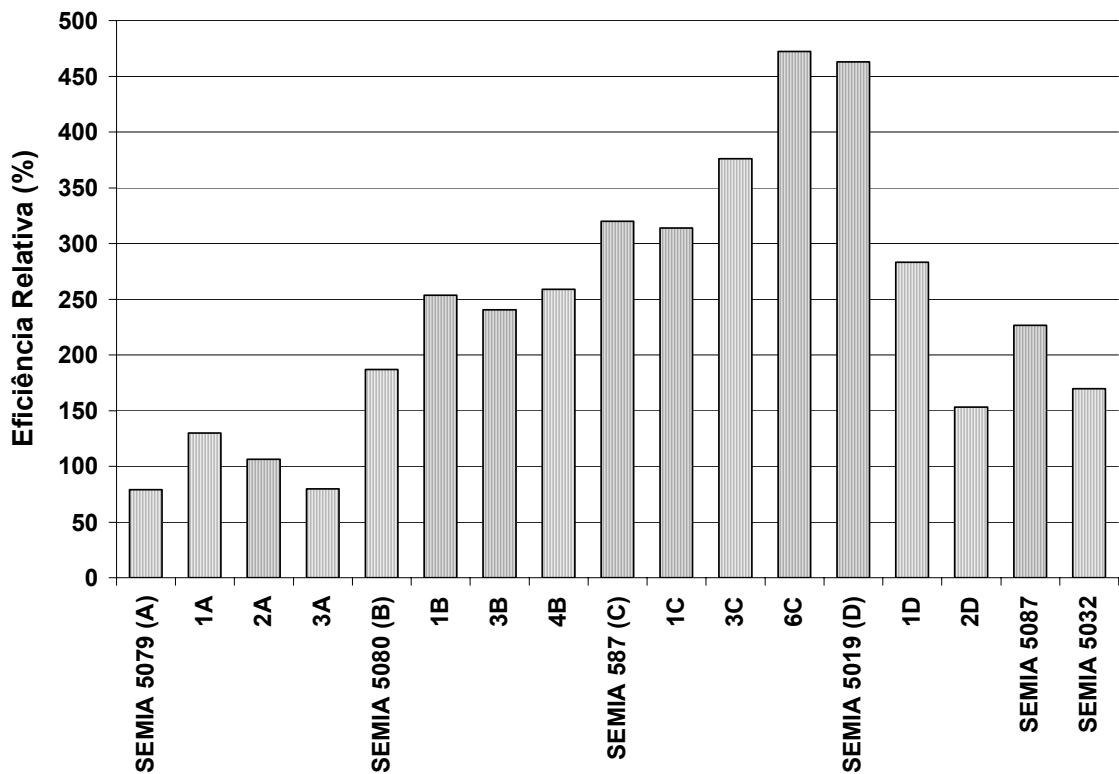


FIGURA 5. Índices de eficiência relativa dos tratamentos inoculados com estirpes e variantes de *B. japonicum* e *B. elkanii* em relação a produção de matéria seca de soja (*Glycine max*) cultivar Peking, aos 35 dias após o plantio.

Os índices de eficiência relativa obtidos por estirpes de *B. japonicum* e *B. elkanii*, quando inoculadas na cultivar de soja Clark, variaram de 34 a 292% (Figura 4). Em geral, os tratamentos inoculados com estirpes originais e variantes apresentaram comportamento bem heterogêneo, tendo as estirpes SEMIA 5079 e 5019 apresentado maior eficiência relativa em relação aos seus variantes, enquanto as estirpes SEMIA 5080 e 587 foram menos eficientes quando comparadas aos seus variantes. Quanto às estirpes SEMIA 5032 e SEMIA 5087, observa-se que a inoculação da estirpe SEMIA 5032 (*B. japonicum*) apresentou maior eficiência do que a estirpe SEMIA 5087 (*B. elkanii*).

Na cultivar de soja Peking, assim como na cultivar Clark, constata-se um padrão heterogêneo quanto ao índice de eficiência relativa observado entre estirpes originais e variantes. Contudo, nessa cultivar de soja os índices de eficiência relativa foram bem mais elevados e variaram de 79 a 472% (Figura 5).

O comportamento das estirpes SEMIA 5032 e SEMIA 5087 na cultivar Peking foi inverso ao observado na cultivar Clark, podendo ser observado uma maior eficiência da estirpe SEMIA 5087 quanto ao índice de eficiência relativa (Figuras 4 e 5).

Nas condições desta experimentação foi observado que, em geral, a eficiência simbiótica das estirpes brasileiras das espécies *B. japonicum*, *B. elkanii* e estirpes padrão destas espécies (SEMIA 5032 e SEMIA 5087) foi dependente da cultivar de soja utilizada (Figuras 4 e 5). Vidor et al. (1972) e Hungria & Bohrer (2000) também observaram um efeito acentuado da interação entre cultivares e estirpes de *Bradyrhizobium* spp usadas em inoculantes no Brasil.

Em *B. japonicum*, a estirpe SEMIA 5079 e o variante 2A, assim como a estirpe SEMIA 5032, apresentaram melhor eficiência quando associadas à cultivar de soja Clark, enquanto a estirpe SEMIA 5080 e seus variantes apresentaram maior eficiência quando associadas a cultivar de soja Peking. No grupo de *B. elkanii* (SEMIA 5087, SEMIA 587, SEMIA 5019 e seus variantes), o comportamento geral nesta espécie foi de uma melhor associação com a cultivar de soja Peking (Figuras 4 e 5). Minamisawa et al. (1997) observaram que a ocupação nodular nas espécies *B. japonicum* e *B. elkanii* foi determinada exclusivamente pelo hospedeiro, uma vez que *B. japonicum* nodulou preferencialmente com várias cultivares de *Glycine max* enquanto *B. elkanii* foi mais competitiva com a cultivar primitiva de soja Peking e também com *Macroptilium atropurpureum*.

A cultivar Peking é uma cultivar primitiva de soja que apresenta sementes com coloração escura devido à presença de antocianinas, sendo provável que, de forma semelhante ao que acontece em cultivares de feijão preto, onde a presença destes pigmentos tem sido relatada como o mais ativo indutor dos genes *nod* (Hungria et al., 1991; Hungria & Phillips, 1993), também na cultivar de soja Peking a presença de antocianinas poderia ter sido responsável por uma melhor indução dos genes de nodulação nas diferentes estirpes e variantes de bradimirizóbios estudadas, resultando na maior eficiência relativa observada nesta cultivar. Contudo, admitindo-se que os flavonóides sintetizados nas cultivares de soja Clark e Peking tenham a mesma composição, é provável que a quantidade destes compostos possa ter interferido no reconhecimento entre leguminosa e bactéria, influenciando, conseqüentemente, os índices de eficiência observada para a maioria das estirpes e variantes testadas, pois a nodulação da soja, assim como a do feijoeiro, pode ser limitada pela quantidade de indutores dos genes *nod*, conforme observado por Vargas & Hungria (1997) e Pueppke et al. (1998).

Os resultados de nodulação e produção de matéria seca da parte aérea em caupi são apresentados na Tabela 11. Observa-se que, em geral, os tratamentos inoculados com os variantes originados das estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 apresentaram melhor desempenho quanto ao número de nódulos, massa nodular e produção de matéria seca que as suas respectivas estirpes originais, enquanto as estirpes originais SEMIA 587 e SEMIA 5019 apresentaram maior número de nódulos em relação aos seus variantes. Os tratamentos inoculados com as estirpes SEMIA 5032 e SEMIA 5087 seguiram a tendência geral observada para as estirpes

B. elkanii e *B. japonicum*, onde a maior nodulação foi observada quando a estirpe SEMIA 5087 foi inoculada (*B. elkanii*).

Em caupi, os tratamentos inoculados apresentaram produção de matéria seca menor ou equivalente à testemunha nitrogenada. Contudo, também existiram tratamentos onde o desempenho foi menor que o observado na testemunha absoluta (Tabela 11). Nas infecções envolvendo o gênero *Bradyrhizobium* tem sido relatado que espécies promíscuas como *V. unguiculata*, em geral, não respondem à inoculação sob condições de campo (Vargas & Suhet, 1981). Entretanto, sob determinadas circunstâncias *V. unguiculata*, pode responder favoravelmente à inoculação, dependendo do tipo de solo, número, efetividade e graus de especificidade das estirpes nativas, conforme constatado por Bushby (1984).

TABELA 11. Avaliação da nodulação (número e peso de nódulos secos) e da produção de matéria seca da parte aérea em caupi (*Vigna unguiculata*) cultivar IPA 206, inoculado com estirpes e variantes de *Bradyrhizobium* spp, aos 35 dias após o plantio.

Tratamentos	Nodulação Nódulos (N° vaso ⁻¹)*	Massa de nód.secos (mg vaso ⁻¹)	Parte Aérea Matéria seca (g vaso ⁻¹)
SEMIA 5079 (A)	11,0 e	7,00 d	0,64 h
1A	24,9 bcde	16,00 d	1,45 a
2A	26,7 bcde	8,73 d	0,90 fgh
3A	33,5 abc	17,66 d	0,70 gh
SEMIA 5080 (B)	12,9 de	15,96 d	0,90 fgh
1B	21,3 cde	45,66 abc	1,18 bcde
3B	21,4 cde	46,53 abc	1,35 abc
4B	14,8 cde	24,33 bcd	1,26 abcd
SEMIA 587 (C)	32,3 abc	20,50 cd	1,19 abcd
1C	22,5 cde	14,50 d	0,72 gh
3C	29,0 bcd	18,96 cd	1,43 ab
6C	23,0 cde	14,90 d	1,12 cdef
SEMIA 5019 (D)	57,8 a	12,20 d	1,26 abcd
1D	28,2 bcde	59,66 a	0,74 gh
2D	10,8 e	23,10 bcd	0,85 fgh
SEMIA 5087	49,0 ab	21,60 cd	1,03 def
SEMIA 5032	27,6 bcde	49,80 ab	0,90 fgh
TA	—	—	0,92 efg
TN	—	—	1,38 abc
CV	16,8	18,7	18,3

* Dados transformados por $\sqrt{x+1}$

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey 5%

Na Tabela 12, são apresentados os valores de nodulação e produção de matéria seca da parte aérea em guandu. Observa-se que, em geral, os tratamentos inoculados com variantes dos grupos de *B. japonicum* e *B. elkanii* induziram uma maior formação de nódulos e apresentaram valores de massa nodular e produção de matéria seca superiores ou equivalentes ao obtido pelas suas estirpes originais. Entre os tratamentos inoculados com as estirpes SEMIA 5087 e SEMIA 5032, não houve diferenças quanto aos parâmetros analisados (Tabela 12), apesar de se observar um melhor desempenho da estirpe SEMIA 5087 quanto ao número de nódulos formados, massa nodular e produção de matéria seca.

Foi observado em guandu, que os tratamentos inoculados apresentaram produção de matéria seca menor que a testemunha nitrogenada, também existindo tratamentos inoculados onde o desempenho foi equivalente ou até menor do que o observado na testemunha absoluta (Tabela 12).

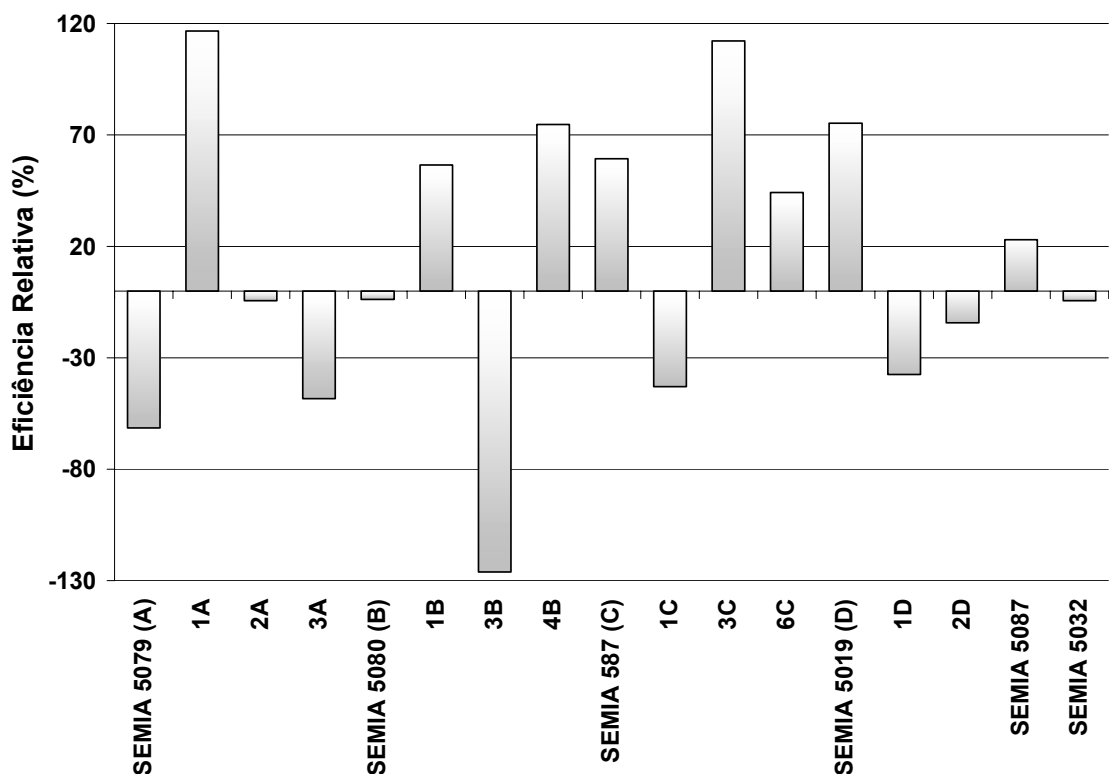
TABELA 12. Avaliação da nodulação (número e peso de nódulos secos) e da produção de matéria seca da parte aérea em guandu (*Cajanus cajan*), inoculado com estirpes e variantes de *Bradyrhizobium* spp aos 35 dias após o plantio

<i>Tratamentos</i>	<i>Nodulação Nódulos (N° vaso⁻¹)*</i>	<i>Massa de nód.secos (mg vaso⁻¹)</i>	<i>Parte Aérea Matéria seca (g vaso⁻¹)</i>
SEMIA 5079 (A)	7,5 g	4,00 de	0,33 cd
1A	33,2 bcde	9,43 bcde	0,38 bcd
2A	65,4 ab	19,00 a	0,47 bc
3A	31,8 bcdef	12,33 abcd	0,40 bcd
SEMIA 5080 (B)	71,1 a	16,30 ab	0,48 b
1B	30,8 bcdef	13,07 abc	0,49 b
3B	47,6 abc	8,33 bcde	0,45 bc
4B	45,6 abcd	10,63 abcde	0,48 b
SEMIA 587 (C)	26,1 cdefg	6,87 cde	0,18 e
1C	38,7 abcd	10,13 bcde	0,49 b
3C	9,5 fg	2,53 e	0,35 bcd
6C	35,8 abcd	9,40 bcde	0,36 bcd
SEMIA 5019 (D)	11,4 efg	3,03 e	0,38 bcd
1D	18,2 defg	4,80 cde	0,37 bcd
2D	30,9 bcdef	8,13 bcde	0,47 bc
SEMIA 5087	45,1 abcd	13,13 abc	0,43 bc
SEMIA 5032	33,3 bcde	6,23 cde	0,42 bcd
TA	—	—	0,28 de
TN	—	—	0,64 a
CV	19,2	21,3	15,2

* Dados transformados por $\sqrt{x+1}$

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey 5%

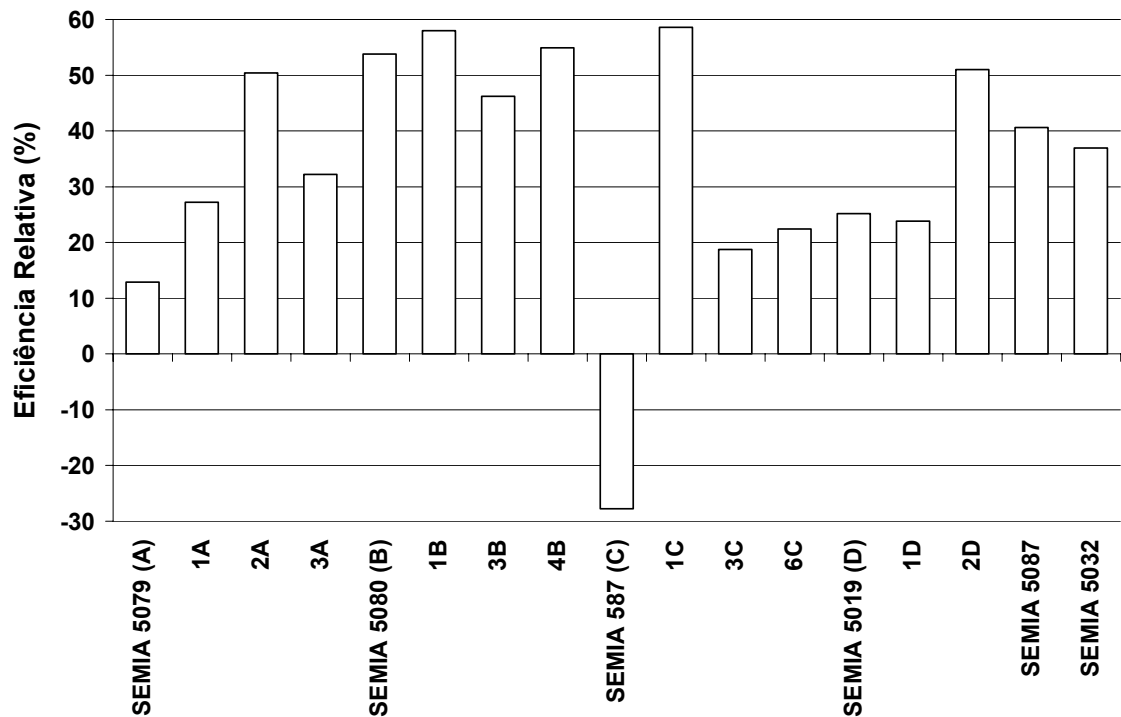
As médias dos índices de eficiência relativa obtida em caupi estão apresentadas na Figura 6. Observa-se que, entre variantes e estirpes de *B. japonicum* e *B. elkanii* inoculadas, 53% (9/17) apresentaram índices de eficiência negativos variáveis de -4 a -126% (Figura 6), sendo a maior ocorrência dos índices negativos observada na espécie *B. japonicum*, onde 100% das estirpes originais e a estirpe SEMIA 5032 apresentaram índices negativos. Em *B. elkanii*, índices de eficiência negativos foram



observados apenas quando foram inoculados os variantes 1C, 1D e 2D (Figura 6).

FIGURA 6. Índices de eficiência relativa dos tratamentos inoculados com estirpes e variantes de *B. japonicum* e *B. elkanii* em relação à produção de matéria seca de caupi (*Vigna unguiculata*) cultivar IPA 206, aos 35 dias após o plantio.

Os índices de eficiência relativa para o guandu, em geral, ficaram abaixo de 60%, sendo ainda observado que o tratamento inoculado com a estirpe SEMIA 587 foi o único tratamento que apresentou índice de eficiência negativo (-28%) (Figura 7). Na inoculação de estirpes e variantes de *B. japonicum*, incluindo a estirpe SEMIA 5032, os índices variaram de 13 a 58%, onde se observa que a estirpe SEMIA 5079 e seus variantes apresentam índices de eficiência menores que a estirpe SEMIA 5080 e seus variantes. Os índices de eficiência variaram de -28 a 59% quando estirpes e variantes de *B. elkanii* foram inoculados. Em guandu, a tendência observada entre todos os



tratamentos inoculados, foi a de um melhor desempenho dos variantes em relação às suas estirpes originais.

FIGURA 7. Índices de eficiência relativa dos tratamentos inoculados com estirpes e variantes de *B. japonicum* e *B. elkanii* em relação à produção de matéria seca de guandu (*Cajanus cajan*), aos 35 dias após o plantio.

De acordo com Singleton et al. (1992), nem todas as estirpes que nodulam determinado grupo de leguminosas são eficientes na fixação de N_2 com todas as espécies, conforme também constatado no presente estudo, quando estirpes e variantes de *B. japonicum* e *B. elkanii* foram inoculadas em soja, caupi e guandu. Os índices negativos de eficiência observados em caupi e guandu (Figuras 6 e 7), indicam a ausência de fixação de nitrogênio e diminuição da produção de matéria seca da parte aérea e, para a maioria dos tratamentos inoculados não houve diferença estatística em relação à testemunha absoluta (Tabelas 11 e 12). Assim, a partir dos resultados de eficiência relativa obtida por caupi e guandu, observa-se que ambas leguminosas não respondem à inoculação com rizóbios não homólogos (rizóbios isolados de seu próprio hospedeiro) e na ausência de uma simbiose efetiva os bradirizóbios se comportaram como simples parasitas radiculares.

4.4 Indução de clorose foliar em diferentes leguminosas inoculadas com estirpes e variantes de *Bradyrhizobium* produtoras de rizobiotoxina

Sintomas de clorose foliar induzida devido à produção de rizobiotoxina, apenas foram observados quando estirpes e variantes de *B. elkanii* foram inoculadas na cultivar de soja Clark, *Vigna unguiculata* e *Cajanus cajan* (Tabela 13). A produção de rizobiotoxina em *B. elkanii* já havia sido

estudada anteriormente por Teaney III & Fuhrmann (1992) e Minamisawa (1990) em soja. Contudo, não existem relatos da indução de clorose foliar em caupi e guandu provocada por estirpes de *B. elkanii* (Ruan & Peters, 1992).

TABELA 13. Avaliação dos sintomas de clorose foliar em *Glycine max* (cultivares Clark e Peking), *Vigna unguiculata* (cultivar IPA 206) e *Cajanus cajan*, inoculados com estirpes e variantes de *Bradyrhizobium* spp, aos 35 dias após o plantio.

Tratamentos	Leguminosas hospedeiras*			
	<i>Glycine max</i> Clark	Peking	<i>Vigna unguiculata</i> IPA 206	
SEMIA 5079	0	0	0	0
1A	0	0	0	0
2A	0	0	0	0
3A	0	0	0	0
SEMIA 5080	0	0	0	0
1B	0	0	0	0
3B	0	0	0	0
4B	0	0	0	0
SEMIA 5032	0	0	0	0
SEMIA 587	1	0	2	1
1C	1	0	2	1
3C	1	0	2	1
6C	1	0	2	1
SEMIA 5019	1	0	2	1
1D	1	0	2	1
2D	1	0	2	1
SEMIA 5087	2	0	2	1

* Escala de notas atribuídas aos sintomas de clorose foliar: (0) ausência de clorose; (1) clorose leve; (2) clorose acentuada

Em caupi, sintomas acentuados de clorose foliar foram observados quando as estirpes e/ou variantes de *B. elkanii* foram inoculadas. Entre os sintomas observados, podem ser citados a coloração diferencial nas folhas e clorose marginal, observadas nas folhas mais novas. A detecção de clorose induzida pela toxina sempre observada nas folhas jovens da mesma planta, pode indicar que a toxina não é transportada para as folhas velhas ou que esta toxina pode ser rapidamente metabolizada *in situ* (folhas novas), de acordo com Oweens & Wright (1965). Contudo, ao comparar-se tratamentos inoculados com *B. japonicum* ou *B. elkanii*, em geral, não foram observadas diferenças significativas quanto aos parâmetros avaliados (Tabela 11), sendo provável que a produção de rizobiotoxina em caupi não tenha tanta representatividade quanto tem para a soja.entre .

Em guandu os sintomas de clorose foliar observados foram leves (Tabela 13). Contudo, não pode ser atribuída a menor produção de matéria seca da parte aérea exclusivamente à produção de rizobiotoxina provocada pela inoculação desta leguminosa com estirpes e variantes de *B. elkanii*, uma vez que, assim como o caupi, também o guandu demonstrou ser uma leguminosa promíscua inefetiva para os grupos de bradirrizóbios testados (Tabela 12).

Na cultivar de soja Clark, ao comparar-se os níveis de clorose foliar observados nos tratamentos inoculados com a estirpe SEMIA 5087 (controle positivo), estirpes e variantes de *B. elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019), observa-se que, enquanto a estirpe SEMIA 5087 induziu uma forte clorose foliar, caracterizada por apresentar sempre nas folhas novas uma clorose marginal, resultando em necrose foliar, as estirpes originais SEMIA 587 e SEMIA 5019 e seus variantes induziram sintomas leves de clorose (Tabela 13). Provavelmente, em virtude da fraca indução de clorose foliar quando as estirpes originais SEMIA 587 e SEMIA 5019 ou seus variantes foram inoculados, o desenvolvimento da cultivar Clark não tenha sido prejudicado (Figura 3). Sintomas de clorose leve foliar também foram observados por Minamisawa (1990) em cultivares de soja susceptíveis à rizobiotoxina produzida por estirpes de *B. elkanii*.

Resultados semelhantes aos da Tabela 13 foram observados por Boddey (1995), onde é relatado que as estirpes de *B. japonicum* SEMIA 5079, SEMIA 5080, não induziram sintomas de clorose foliar nas cultivares de soja Lee e BR-16. Contudo, quando foram inoculadas estirpes de *B. elkanii* (SEMIA 587, SEMIA 5019, USDA 76 e USDA 94) sintomas de clorose foliar leve foram observados na cultivar Lee, enquanto a cultivar BR-16 apresentou-se altamente susceptível à rizobiotoxina produzida pelas estirpes USDA 76 e USDA 94.

A ausência dos sintomas de clorose pode indicar que, de fato, o rizóbio não sintetizou esta toxina, como é o caso de *B. japonicum* ou que o hospedeiro, atuando através de mecanismos preventivos, seja através da inibição metabólica da enzima ou de uma menor acumulação da toxina nos nódulos, conseguiu suprimir ou atenuar os efeitos da rizobiotoxina produzida pelas estirpes e variantes de *B. elkanii* (Oweens & Wright, 1965).

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, variantes ou estirpes de *B. elkanii* podem diferir na severidade da clorose foliar induzida em diferentes leguminosas. Ainda que a produção de rizobiotoxina por *B. elkanii* seja desvantajosa para o hospedeiro, não se pode descartar a hipótese sugerida por Minamisawa et al. (1991) de que a produção desta toxina pode representar uma vantagem em termos de competitividade para *B. elkanii*, uma vez que estirpes produtoras de rizobiotoxina representam a maioria das estirpes encontradas nos solos.

4.5 Competitividade de estirpes e variantes de *Bradyrhizobium* spp

Os resultados de nodulação (número de nódulos e massa nodular), produção de matéria seca e nitrogênio total acumulado dos tratamentos inoculados em soja, a partir da adição de inóculos individuais ou misturas contendo estirpes originais e/ou variantes de *Bradyrhizobium* spp, são apresentados nas Tabelas 14 e 15.

Em geral, os tratamentos que envolveram a inoculação dos variantes originados da estirpe SEMIA 5079 (1A, 2A e 3A) e da estirpe SEMIA 5080 (1B, 3B e 4B), não diferiram entre si quanto à nodulação (número de nódulos e massa nodular) (Tabela 14). Exceto pelos tratamentos inoculados com variantes 2A e 3A, foram observadas significativas reduções no número de nódulos formados e massa nodular quando os variantes 1A, 1B, 3B e 4B, foram inoculados conjuntamente com a estirpe SEMIA 5019.

Nos resultados de produção de matéria seca e N total acumulado, também não foram observadas diferenças entre os tratamentos envolvendo as co-inoculações dos variantes originados das estirpes de B. japonicum (SEMIA 5079 e SEMIA 5080) (Tabela 14).

TABELA 14. Avaliação da nodulação (número e peso de nódulos secos) e da produção de matéria seca da parte aérea de soja (*Glycine max*) cultivar BR 16, inoculada com a estirpe SEMIA 5019 e/ou variantes de *Bradyrhizobium japonicum*, a partir da adição de inóculos individuais ou mistos, aos 35 dias após o plantio.

Tratamentos	Nodulação		Parte Aérea	
	Nódulos (N° vaso ⁻¹)*	Massa nód.secos (mg vaso ⁻¹)	de Matéria seca (g vaso ⁻¹)	N-total (mg vaso ⁻¹)
1A	62,7 ab	361,33 abc	1,92 de	36,93 efghi
2A	33,7 bcde	196,00 jk	1,31 hijk	26,98 klm
3A	11,0 f	89,66 mn	1,37 ghijk	23,41 lmn
1A : 2A	44,8 abcd	238,00 hij	1,42 fghij	32,27 hijk
1A : 3A	44,4 abcd	238,00 hij	1,55 fghi	30,13 ijk
2A : 3A	38,2 bcde	241,00 ghij	1,63 efgh	31,18 ijk
1B	58,3 ab	305,00 cdef	2,27 d	50,08 d
3B	57,6 ab	278,00 defghi	1,66 efgh	39,67 efg
4B	54,9 ab	243,00 fghij	1,71 efg	40,24 ef
1B : 3B	34,8 bcde	196,00 jk	1,19 ijkl	18,98 n
1B : 4B	53,8 ab	220,00 ij	1,67 efgh	35,35 fghij
3B : 4B	46,8 abcd	135,00 klm	1,56 efgh	35,94 fghi
1A : 1B	71,1 a	335,00 bcd	1,69 efg	34,48 fghij
2A : 1B	39,3 bcde	256,66 efghij	1,16 jkl	21,05 mn
3A : 1B	49,4 abc	283,00 defgh	1,37 ghijk	31,90 ijk
1A : 3B	52,7 ab	412,00 a	0,92 lm	20,14 mn
2A : 3B	52,0 ab	234,00 hij	1,76 ef	35,88 fghi
3A : 3B	54,5 ab	302,00 cdefg	1,64 efgh	39,25 efgh
1A : 4B	42,8 abcd	267,33 efghi	1,45 fghij	32,76 ghijk
2A : 4B	53,6 ab	378,00 ab	1,18 jkl	30,24 ijk
3A : 4B	48,6 abc	314,00 cde	1,36 ghijk	32,90 ghijk

1A : SEMIA 5019	25,2 cdef	157,33 kl	3,19 c	65,96 c
2A : SEMIA 5019	17,5 ef	117,00 lm	3,61 b	74,75 b
3A : SEMIA 5019	18,9 ef	126,00 lm	3,23 c	66,87 c
1B : SEMIA 5019	17,1 ef	106,00 lm	1,35 ghijk	28,41 jkl
3B : SEMIA 5019	13,1 f	37,66 no	1,75 ef	36,15 fghi
4B : SEMIA 5019	13,0 f	22,33 o	1,66 efgh	43,87 de
SEMIA 5019	22,8 def	143,66 klm	1,25 kl	21,81 lmn
TA	—	—	0,71 m	7,31 o
TN	—	—	7,18 a	126,03 a
CV	20,9	23,1	18,2	20,3

* Dados transformados por $\sqrt{x+1}$

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey 5%

Um comportamento distinto foi observado quando variantes das estirpes SEMIA 5079 e SEMIA 5080 foram inoculados em mistura com a estirpe SEMIA 5019, pois embora os tratamentos tenham obtido padrão de nodulação (número e massa nodular) semelhante, observa-se que os tratamentos onde a estirpe SEMIA 5019 foi inoculada conjuntamente com os variantes 1A, 2A e 3A houve melhor desempenho simbiótico, uma vez que, com uma menor nodulação, foram capazes de obter produção de matéria seca e N total significativamente superior aos demais tratamentos, resultando em expressivos aumentos de eficiência relativa (Figura 8). De acordo com Vinuesa et al. (1998), isolados de uma mesma espécie, que possuem o mesmo sorotipo, podem diferir significativamente quanto à eficiência de fixação de nitrogênio, assim como na sua habilidade para ocupar nódulos em competição com outras estirpes intimamente relacionadas.

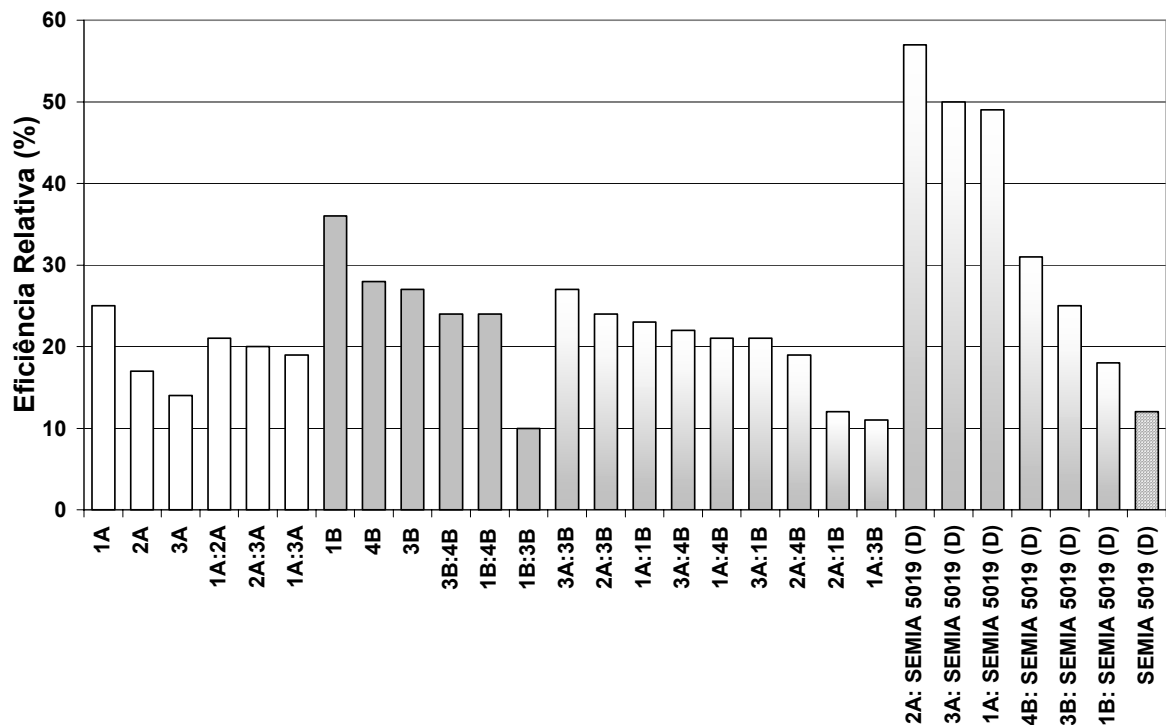


FIGURA 8. Índices de eficiência relativa dos tratamentos inoculados com variantes de *B. japonicum* e/ou a estirpe SEMIA 5019, em relação ao N total acumulado em soja (*Glycine max*) cultivar BR 16, aos 35 dias após o plantio.

As médias dos índices de eficiência relativa obtidas nos tratamentos inoculados estão demonstradas na Figura 8. Observa-se que entre tratamentos inoculados com os variantes originados da estirpe SEMIA 5079 (1A, 2A e 3A), o variante 1A apresenta índices de eficiência superior aos demais variantes, e que nas inoculações mistas entre este variante com os variantes menos eficientes (2A e 3A) resultou em uma menor eficiência. De acordo com Weiser et al. (1990), quando variantes menos eficientes são co-inoculados, podem apresentar maior ocupação nodular induzindo uma baixa produtividade.

No presente ensaio de competitividade contudo, não foi possível determinar a porcentagem de ocupação nodular obtida pelos variantes 1A, 2A e 3A, em qualquer tratamento no qual estes variantes foram inoculados, uma vez que não foram verificadas reações de aglutinação usando extratos nodulares dos tratamentos com estes variantes e o antissoro produzido a partir da estirpe original SEMIA 5079. Como se tratam de variantes espontâneos, é provável que existam alterações nos determinantes antigênicos espécie-específicos que interferiram nos resultados da análise, uma vez que reações de aglutinação foram observadas quando foram utilizadas suspensões antigênicas a partir de extratos nodulares ou crescimento bacteriano da própria estirpe original SEMIA 5079, usando o mesmo soro. Schinghamer & Dudman (1980) observaram que mutantes espontâneos de *Rhizobium* spp resistentes a espectinomicina podem diferir quanto a propriedades antigênicas e fixação de nitrogênio em relação à estirpe original. Lemos (1994) observou que a estirpe de *B. japonicum*, SEMIA 5052 (USDA 6), classificada no sorogrupo 1, pertence a um grupo de rizóbios que se mostram deficientes tanto para a produção de soros hipermunes como para a reatividade

sorológica e, que esta baixa reatividade é devido à falta do antígeno-O, constituinte do lipopolissacarídeo da parede celular das bactérias pertencentes a este grupo.

Os resultados da análise sorológica com os variantes originados da estirpe SEMIA 5079 demonstraram um problema comum aos métodos sorológicos usados na caracterização de estirpes de bradírrizóbio, que se caracteriza pela presença de estirpes que não reagem com o soro testado. De acordo com Lindermann et al. (1974) *apud* Peres (1979), a caracterização do rizóbio no nódulo é muito dependente da técnica sorológica adotada, uma vez que, em sua maioria, os métodos sorológicos não apresentam suficiente sensibilidade para diferenciar a presença de duas estirpes no mesmo nódulo, quando um segundo sorogrupo está presente em menor número. Importante enfatizar que a análise de aglutinação foi realizada a partir de soros hipermunes não purificados, sendo provável que a purificação do soro para eliminação das imunoglobulinas inespecíficas ou a produção de soros monoclonais para a estirpe SEMIA 5079, tornaria mais específica a análise de aglutinação para este grupo de variantes, o que não foi possível ser realizado no presente estudo.

Os variantes da estirpe SEMIA 5080 apresentaram índices de ocupação nodular variando de 75 a 97 %, quando inoculados em mistura com os variantes 1A, 2A e 3A (Figura 9). Reduções nas porcentagens de ocupação nodular dos variantes 1B, 3B e 4B foram observadas quando estes variantes foram inoculados conjuntamente com a estirpe SEMIA 5019. Isto era esperado pois devido à elevada competitividade apresentada, a estirpe SEMIA 5019, juntamente com a SEMIA 587 e a SEMIA 566 têm sido as estirpes indicadas para estudos de competitividade com a cultura da soja (Hungria et al., 1994). Podendo também ser observado na Figura 9 que quanto maior a ocupação nodular da estirpe SEMIA 5019 no tratamento inoculado, menor foi a eficiência relativa observada no tratamento, uma vez que a eficiência relativa obtida pela estirpe SEMIA 5019 foi significativamente inferior à observada para os variantes 1B, 3B e 4B (Figura 8). Na co-inoculação da cultivar de soja BR 16 com as estirpes SEMIA 5019 e SEMIA 5079, Boddey (1995) observou que os índices de ocupação nodular foram 73 e 27% respectivamente, sendo observado aumentos significativos de N total em relação ao tratamento inoculado apenas com a estirpe SEMIA 5019.

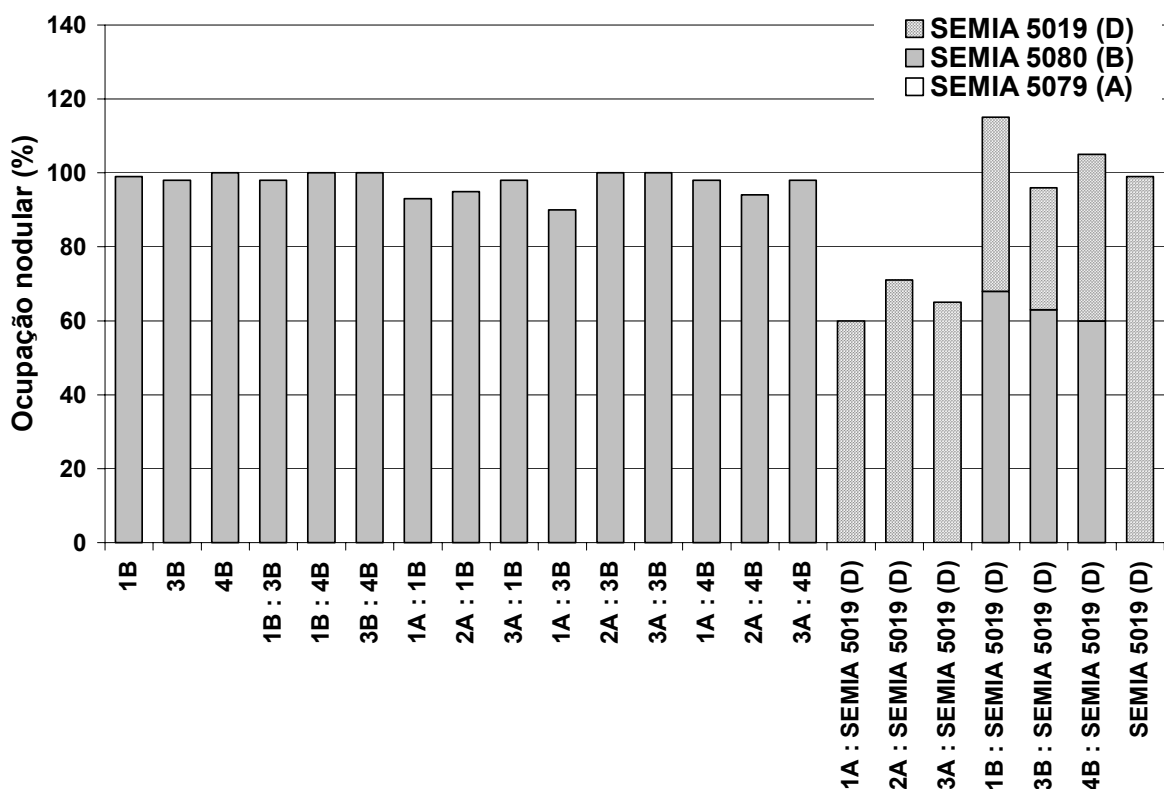


FIGURA 9. Porcentagem de ocupação nodular dos tratamentos inoculados com variantes de *B. japonicum* e a estirpe SEMIA 5019, isolados e em mistura (1:1). Os resultados do experimento de competição envolvendo variantes (1C, 3C, 6C, 1D e 2D) e estirpes de *B. elkanii* (SEMIA 587 e SEMIA 5019), demonstraram que na inoculação conjunta, houve menor número de nódulos formados e massa nodular, quando comparados os tratamentos com inoculação individual ou em mistura (Tabela 15). Nishi (1995) também observou, em experimentos de competitividade reduções no número de nódulos, massa nodular e produção de matéria seca.

TABELA 15. Avaliação da nodulação (número e peso de nódulos secos) e da produção de matéria seca da parte aérea de soja (*Glycine max*) cultivar BR 16, inoculada com estirpes e/ou variantes de *Bradyrhizobium elkanii*, a partir da adição de inóculos individuais ou mistos, aos 35 dias após o plantio.

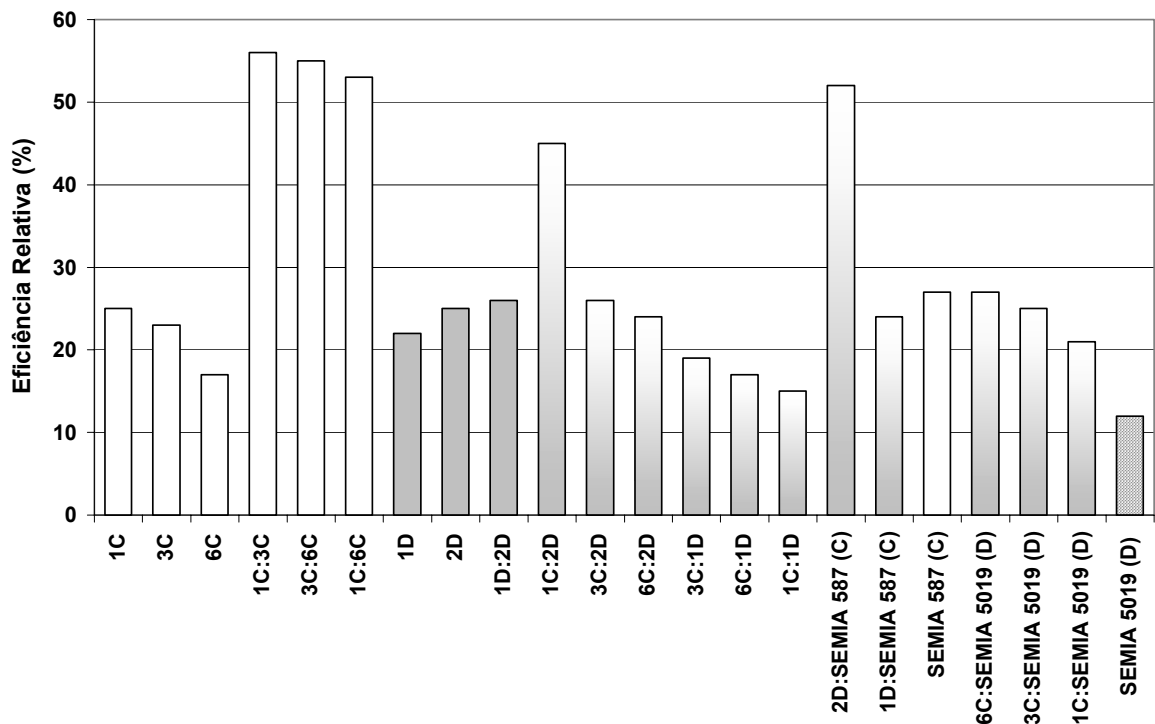
Tratamentos	Nodulação		Parte Aérea	
	Nódulos (N° vaso ⁻¹)*	Massa nód.secos (mg vaso ⁻¹)	de Matéria seca (g vaso ⁻¹)	N-total (mg vaso ⁻¹)
1C	73,5 a	330,00 c	1,78 de	36,93 de
3C	53,0 b	317,00 cd	1,68 defg	34,81 defg
6C	37,8 c	253,00 de	1,30 ghi	27,01 ghi
1C : 3C	27,9 cd	193,00 ef	3,58 b	74,00 b
1C : 6C	8,3 fg	166,00 fg	3,39 b	70,10 b
3C : 6C	22,6 de	167,33 fg	3,53 b	73,20 b
1D	64,9 ab	441,00 b	1,61 defgh	33,25 defgh
2D	61,8 ab	417,00 b	1,80 de	37,20 de
1D : 2D	37,9 c	256,66 de	1,86 de	38,50 d
1C : 1D	26,2 de	180,00 f	1,22 hi	25,20 hi
3C : 1D	28,9 cd	155,00 fg	1,45 efghi	29,93 efghi
6C : 1D	9,0 f	106,00 g	1,33 fghi	27,47 fghi
1C : 2D	25,6 de	172,66 fg	2,95 c	61,15 c
3C : 2D	23,9 de	164,00 fg	1,83 de	37,94 de
6C : 2D	27,9 cd	156,00 fg	1,75 def	36,20 de
1C : SEMIA 5019	20,9 de	145,00 fg	1,59 defgh	33,00 defgh
3C : SEMIA 5019	2,7 h	20,00 h	1,78 de	36,78 de
6C : SEMIA 5019	3,2 gh	23,00 h	1,90 d	39,44 d
1D : SEMIA 587	17,0 e	136,00 fg	1,72 defg	35,56 def
2D : SEMIA 587	30,7 cd	198,00 ef	3,23 bc	68,88 bc
SEMIA 587	69,9 a	615,00 a	1,92 d	39,79 d
SEMIA 5019	22,8 de	143,66 fg	1,25 i	21,81 i
TA	—	—	0,71 j	7,31 j
TN	—	—	7,18 a	126,03 a
CV	17,5	14,4	17,8	15,7

* Dados transformados por $\sqrt{x+1}$

Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey 5%

Embora nos tratamentos de inoculação conjunta com variantes originados de uma mesma estirpe (1C:3C, 1C:6C, 3C:6C e 1D:2D) e nos tratamentos 1C:2D e 2D:SEMIA 587 também tenham ocorrido menor formação de nódulos, observa-se contudo, que nestes tratamentos houve um efeito sinérgico entre os diferentes organismos co-inoculados, evidenciado pela maior produção de matéria seca e N total acumulado na parte aérea (Tabela 15) e, conseqüentemente, uma eficiência relativa significativamente superior foi obtida em relação aos demais tratamentos inoculados (Figura 8). Rolfe et al. (1980) observaram que, na inoculação conjunta de um mutante não-nodulante e um mutante ineficiente de *R. trifolii*, houve um efeito estimulatório sobre o mutante ineficiente, que resultou na formação de nódulos efetivos.

FIGURA 10. Índices de eficiência relativa dos tratamentos inoculados com estirpes e/ou variantes de *Bradyrhizobium elkanii*, em relação ao N total acumulado em soja (*Glycine max*) cultivar BR 16, aos 35 dias após o plantio.

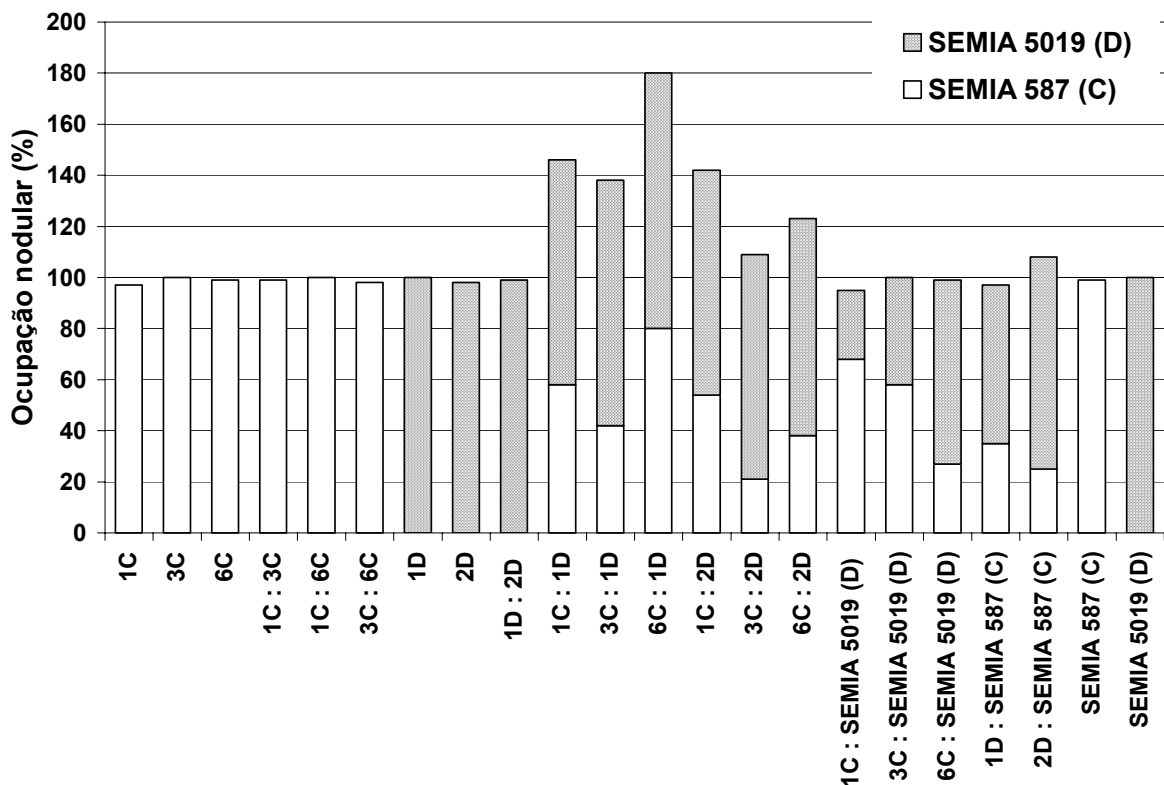


Em geral, observa-se que os variantes 1D e 2D demonstraram maior porcentagem de ocupação nodular que a sua estirpe original SEMIA 5019, quando foram inoculados em mistura com os variantes 1C, 3C e 6C (Figura 11). Observa-se que a inoculação conjunta com o variante 2D apresentou índices de eficiência relativa superiores e uma média de ocupação nodular de 87% para este variante 2D. Nos tratamentos onde os variantes 1C, 3C e 6C foram inoculados em conjunto com o variante 1D, observa-se que, embora o variante 1D tenha apresentado elevados índices de ocupação nodular (Figura 11) e bom desempenho simbiótico, provavelmente a competição nestes tratamentos tenha induzido a baixa eficiência observada, prejudicando o desenvolvimento da soja (Figura 10). Bromfield & Jones (1980) constataram a existência de competição ou antagonismo quando estirpes

são co-inoculadas, sendo observado uma menor efetividade nos tratamentos que utilizaram inóculo misto quando comparados aos tratamentos onde foram utilizados inóculo simples (apenas uma estirpe).

FIGURA 11. Porcentagem de ocupação nodular dos tratamentos inoculados com variantes e estirpes de *B. elkanii*, isolados e em mistura (1:1).

Ao comparar-se a eficiência relativa obtida pelo tratamento inoculado com a estirpe SEMIA 5019, em relação aos tratamentos onde esta estirpe foi co-inoculada com um dos variantes originados da estirpe SEMIA 587, observa-se que a eficiência relativa dos tratamentos com os inóculos mistos se eleva, em virtude da maior eficiência e ocupação nodular apresentada pelos variantes 1C, 3C e 6C (Figuras 10 e 11). Champion et al. (1992) estudando a inoculação conjunta entre variantes eficientes e ineficientes na cultura da soja, observaram que a presença do variante eficiente em 60% dos nódulos induzia bons rendimentos de matéria seca e N total.



Quando estirpes e variantes foram utilizadas individualmente, a sua ocupação nos nódulos variou de 96 a 100%. Porém, na presença de um segundo variante ou estirpe, a porcentagem de ocupação nodular foi reduzida, e alterações de nodulação, rendimentos de matéria seca e N total foram observadas. As porcentagens de nódulos ocupados acima de 100%, observada na Figura 11, principalmente nos tratamentos de co-inoculação entre os variantes originados das estirpes SEMIA 587 e SEMIA 5019, deve-se à ocorrência de infecções duplas nos nódulos. Estudando a competição em *B. japonicum* de um mutante *nif⁻* em comparação à estirpe original, Hahn & Studer (1986) observaram uma elevada porcentagem de nódulos com dupla ocupação, sendo sugerido pelos autores que uma alta densidade de inóculo (10^8 e 10^9 células planta⁻¹) seja requerida para que ocorra uma elevada frequência de infecções mistas, uma vez que, após inoculação

com uma mistura com baixa concentração celular (10^2 a 10^3 bactérias mL⁻¹), poucos nódulos apresentaram dupla ocupação.

Na avaliação da eficiência simbiótica em rizóbios e bradirrizóbios, é necessário se determinar a frequência em que cada estirpe ocorre nos nódulos, seja esta estirpe inoculada ou nativa, uma vez que efetividade e competitividade são parâmetros, intimamente relacionados quando se trata de fixação simbiótica de N₂ atmosférico (Araújo, 1994).

No presente estudo, foi observado que o determinante da maior eficiência em tratamentos co-inoculados não foi a ocupação nodular de determinada estirpe ou variante presente no inóculo, mas sim a interação destes no tratamento co-inoculado, demonstrando como é complexa e variável a interação entre os rizóbios que apresentam diferentes graus de eficiência e competitividade (Daramola et al., 1994). É importante enfatizar que o experimento de competitividade foi realizado sob condições controladas, eliminando-se assim um grande número de fatores e interações que são extremamente importantes nos estudos de competitividade. Desta forma, para confirmação dos resultados obtidos é necessário serem realizados experimentos posteriores sob condições de campo cultivado com população estabelecida de bradirrizóbios noduladores de soja.

5. CONCLUSÕES

Devido à variabilidade genética existente nas estirpes SEMIA 587, SEMIA 5019, SEMIA 5079 e SEMIA 5080, indivíduos eficientes e competitivos quanto à fixação de N₂ em soja puderam ser isolados e selecionados.

Todos os variantes e estirpes de Bradyrhizobium spp nodularam Glycine max (cultivares BR-16, Clark e Peking), Vigna unguiculata e Cajanus cajan, contudo apenas para Glycine max a interação rizóbio-leguminosa demonstrou eficiência significativa.

Variantes que expressaram o fenótipo hidrogenase positiva (hup⁺), não apresentaram necessariamente maior eficiência simbiótica durante o processo de fixação.

Variantes com diferentes potenciais para fixação de nitrogênio podem coexistir numa mesma população de bradirrizóbios, podendo alterar a eficiência simbiótica e a competitividade das estirpes utilizadas em inoculantes para a cultura da soja.

A análise individual dos perfis eletroforéticos da amplificação do DNA genômico com oligonucleotídeos iniciadores BOX A 1-R, ERIC e RP01, e também a análise conjunta com BOX A 1-R e ERIC permitiram diferenciar estirpes originais e variantes.

O BOX-PCR pode ser indicado como um método complementar para as análises de controle da qualidade das estirpes utilizadas em inoculantes para a cultura da soja.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELMOUMEN, H.; FILALI-MALTOUF, A.; NEYRA, M. et al. Effect of high concentrations on growth of rhizobia and responses to added osmotic. **Journal of Applied Microbiology**, Washington, v.86, p.889-898, 1999.

ARAÚJO, R.S. Caracterização morfológica, fisiológica e bioquímica do rizóbio. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R .S. (Eds.) **Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.157-170.

ARAÚJO, R.S. Quantificação da competitividade nodular de Rhizobium e Bradyrhizobium. In: HUNGRIA, M.; ARAUJO, R .S. (Eds.) **Manual de Métodos Empregados em Estudos de Microbiologia Agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.239-248.

AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E. et al. **Current Protocols in Molecular Biology**. New York : John Wiley, 1987. 312p.

BANGEL, E.V. **Caracterização de estirpes de Bradyrhizobium spp. recomendadas para a cultura da soja no Mercosul**. 2000. 114f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

BASIT, H.A.; ANGLE, A.; SALEM, S. et al. Phenotypic diversity among strains of Bradyrhizobium japonicum belonging to serogroup 110. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, p.1570-1572, 1991.

BEATTIE, G.A.; CLAYTON, M.K.; HANDELSMAN, J. Quantitative comparison of the laboratory and field competitiveness of Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.55, p.2755-2761, 1989.

BERINGER, J.E.R. Factor transfer in Rhizobium leguminosarum. **Journal of General Microbiology**, Cambridge, v.84, p.188-198, 1972.

BHAGWAT, A.A.; KEISTER, D.L. Isolation and characterization of a competition-defective Bradyrhizobium japonicum mutant. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, p.3496-3501, 1991.

BODDEY, L.H. **Determinação das características das espécies Bradyrhizobium japonicum e Bradyrhizobium elkanii nas estirpes brasileiras noduladoras de soja**. Londrina: UEL, 1995. 130f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1995.

BODDEY, L.H.; HUNGRIA, M. Classificação de estirpes de soja utilizadas em estudos e/ou inoculantes brasileiros nas espécies Bradyrhizobium japonicum e Bradyrhizobium elkanii. In: HUNGRIA, M.; BALOTA, E. L.; COLOZZI-FILHO, A.;

ANDRADE, D. S. (Eds). **Microbiologia do solo: Desafios para o século XXI**. Londrina: IAPAR/EMBRAPA-CNPSO, 1995. p.332-339.

BODDEY, L.H.; HUNGRIA, M. *Relação entre a divisão de B. japonicum em genótipos e a eficiência e capacidade competitiva das estirpes* In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE MICROBIOLOGIA DO SOLO, 3, 1994, Londrina. **Resumos...**Londrina: IAPAR, 1994. p.63.

BOHLOOL, B.B.; SCHMIDT, E.L. Persistence and competition aspects of *Rhizobium japonicum* observed in soil by immunofluorescence microscopy. **Soil Science Society of America Proceedings**, Madison, v.37, p.561-564, 1973.

BOHRER, T.R.J. **Avaliação de cultivares de soja (*Glycine max (L) Merr.*) para a fixação biológica de nitrogênio**. Londrina: UEL, 1996. 125f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1996.

BROMFIELD, E.S.P; JONES, D.G. *Studies on double strain occupancy of nodules and the competitive ability of *Rhizobium trifolii* on red and white clover grown in soil and agar*. **Annual Applied Biology**, Great Britain, v.94, p.51-59, 1980.

BUSHBY, H.V.A. *Colonization of rhizospheres and nodulation of two *Vigna* species by rhizobia inoculated onto seed: influence of soil*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.16, p.635-641, 1984.

CAETANO-ANOLLES, G.; CRIST-ESTES, D.K.; BAUER, W.D. *Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.170, p.3164-3169, 1988.

CARDENAS, L.; DOMINGUEZ, J.; QUINTO, C. et al. *Isolation, chemical structure and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli**. **Plant Molecular Biology**, Oxford, v.29, p. 453-464, 1995.

CARDOSO, E.J.B.N.; FREITAS, S.S. *A rizosfera*. In: CARDOSO, E.J.B.N; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. (Eds.) **Microbiologia do Solo**. Campinas: SBCS, 1992. p.41-57.

CARLSON, R.W.; SANJUAN, J.; BHAT, U.R. et al. *The structures and biological activities of the lipopolisaccharide nodulation signals produced by Type I and Type II strains of *Bradyrhizobium japonicum**. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 268, p. 18372-18381, 1993.

CAVA, J.R; TAO, H.; NOEL, K.D. *Mapping of complementation groups within a *Rhizobium leguminosarum* CFN42 chromosomal region required for lipopolysaccharide synthesis*. **Molecular General Genetic**, Oxford, v. 12, p.125-128, 1989.

CHAMPION, R.A.; MATHIS, J.N.; ISRAEL, D.W. et al. *Response of soybean to inoculation with efficient and inefficient *Bradyrhizobium japonicum* variants*. **Crop Science**, Madison, v.32, p.457-463, 1992.

CIAPINA, L. P. *Diferenciação genômica de bactérias gram-negativas e gram-positivas pela análise do gene rDNA 16S e rep-PCR*. Jaboticabal: UNESP, 1992.

113f. *Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1992.*

COSTA, J.A. **Cultura da soja**. Evangraf: Porto Alegre, 1996. 233 p.

DARAMOLA, D.S.; DANSO, S.K.A.; HARDARSON, G. Nodulation, N₂ fixation and dry matter yield of soybean (*Glycine max (L.) Merril*) inoculated with effective and ineffective *Bradyrhizobium japonicum* strains. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.26, p.883-889, 1994.

DE ANTONI, G.; LOPARDO, H.; GRAU, O. Interference in culture among *Rhizobium* strains. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.13, p.409-415, 1981.

DE BRUJIN, F.J. Use of repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and the polimerase chain to fingerprinting the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p.2180-2187, 1992.

DEVINE, T.E.; KUYKENDALL, L.D.; BREITHAUPT, B.H. Nodule-like structures induced on peanut by chlorosis producing strains of *Rhizobium* classified as *R. japonicum*. **Crop Science**, Madison, v.23, p.394-397, 1983.

DEVRON, J.J.; KALIA, V.C.; HECKMANN, M.O. et al. Influence of the *Bradyrhizobium japonicum* hydrogenase on the growth of *Glycine* and *Vigna* species. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.53, p.610-612, 1987.

DIAZ, C.L.; MELCHERS, L.S.; HOOYKAAS, P.J.J. et al. Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium* legume symbiosis. **Nature**, London, v.338, p.579-581, 1989.

DIEBOLD, R.; NOEL, K.D. *Rhizobium leguminosarum* exopolysaccharide mutants: biochemical and genetic analyses and symbiotic behavior on three hosts. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.171, p.4821-4830, 1989.

DÖBEREINER, J.; ARRUDA, N.B; PENTEADO, A. F. Avaliação da fixação do nitrogênio em leguminosas pela regressão do nitrogênio total das plantas sobre o peso dos nódulos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Rio de Janeiro, v.1, p.233-237, 1966.

EAGLESHAM, A.R.J.; STOWERS, M.D.; MAINA, M.L. et al. Physiological and biochemical aspects of diversity of *Bradyrhizobium* sp. (*Vigna*) from three west African soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.19, p.575-581, 1987.

ELSHEIKH, E.A.E.; WOOD, M. Response of chickpea and soybean rhizobia to salt: influence of carbon source, temperature and pH. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.21, p.883-887, 1989.

EMBRAPA. **Tecnologias de produção da soja** - Região Central do Brasil 2003. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 2002. 199p.

EMBRAPA. **Recomendações técnicas para a cultura da soja na Região Central do Brasil – 1993/1994**. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 1993. 120p.

FERREIRA, M. C. **Biodiversidade de Bradyrhizobium capaz de nodular a soja em solos brasileiros**. Londrina: UEL, 1999. 47 f. *Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1999.*

FLORES, M.; GONZÁLEZ, V.; PARDO, M.A. et al. Genomic instability in *Rhizobium phaseoli*. *Journal of Bacteriology*, Washington. v.170, p.1191-1196, 1988.

FORSBERG, L.S.; CARLSON, R.W. *The structures of the lipopolysaccharides from Rhizobium etli strains CE358 and CE359. The complete structure of the cores region of R. etli lipopolysaccharides.* *Journal of Biological Chemistry*, Bethesda, v.273, p.2747-2757, 1998.

FREIRE, J.R.J. *Inoculation of soybeans.* In: VICENT, J.M.; WHITNEY, A.S.; BOSE, J., (Eds.). **Exploiting the legume-Rhizobium symbiosis in tropical agriculture**. Hawaii: University of Hawaii, 1977. p.337-379, (College of Tropical Agriculture, Miscellaneous Publication, 145).

FREIRE, J.R.J. *Fixação do nitrogênio pela simbiose rizóbio/leguminosa.* In: CARDOSO, E.J.B.N; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. (Eds.) **Microbiologia do Solo**. Campinas: SBCS, 1992. p.121-140.

FREIRE, J.R.J.; VERNETTI, F.J.A. *A pesquisa com a soja, a seleção de rizóbio e a produção de inoculantes no Brasil.* **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v.5, p.1-25, 1999.

FUHRMANN, J. *Population diversity groupings of soybean bradyrhizobia.* **Advances in Agronomy**, London, v.50, p.67-103, 1993.

FUHRMANN, J. *Symbiotic effectiveness of indigenous soybean bradyrhizobia as related to serological, morfological, rhizobiotoxine, and hidrogenase phenotypes.* **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, p.224-229, 1990.

GABRIELSON, J.; HART, M.; JARELÖV, A. et al. *Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates.* **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v.50, p.63-73, 2002.

GEREMIA, R.A.; MERGAERT, P.; GEELLEN, D. et al. *The NodC protein of Azorhizobium caulinodans is an N-acetylglucosaminyltransferase.* **Proceedings of National Academy Science of USA**, Madison, v.91, p.2669-2673, 1994.

GOMES, P. **A soja**. 5. ed. São Paulo: Nobel, 1990. 152 p.

GREENWAY, H.; MUNNS, R. *Metabolism of salt tolerance in non-halophytea.* **Annual Review of Plant Physiology**, Oxford, v.31, p.149-190, 1980.

HADRI, A.E.; SPAINK, H.P.; BISSELING, T. et al. *Diversity of root nodulation and rhizobial infection process.* In: SPAINK, H.P.; KONDOROSI, A.; HOOYKAAS, P.J.J.

(Eds.) **The Rhizobiaceae: Molecular biology of model plant-associated bacteria.** Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 1998. p.348-349.

HAHN, M.; STUDER, D. Competitiveness of a *nif⁻* Bradyrhizobium japonicum mutant against the wild-type strain. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam v.33, p.143-148, 1986.

HARRISON, S.P. et al. Characterization of Rhizobium isolates by amplification of DNA polymorphisms using random primers. **Journal Canadian Microbiology**, Ottawa, v.28, p.1009-1015, 1992.

HAUGLAND, R.; HANUS, F.J.; CANTRELL, A.M. et al. Rapid colony screening method for identifying hydrogenase activity in Rhizobium japonicum. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.45, p.892-897, 1983.

HAVELSON, L.J.; STACEY, G. Effect of lectin on nodulation by wild-type Bradyrhizobium japonicum and a nodulation-defective mutant. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.51, p.753-760, 1986.

HEINRICH, K.; GORDON, D.M.; RYDER, M.H. et al. A rhizopine strain of Sinorhizobium meliloti remains at a competitive nodulation advantage after an extended period in the soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.31, p.1063-1065, 1999.

HERRIDGE, D.F.; ROUGHLEY, R.J. Variation in colony characteristics and symbiotic effectiveness of Rhizobium. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.39, p.19-27, 1975.

HO, S.C.; WANG, J.L.; SHINDLER, M. Carbohydrate binding activities of Bradyrhizobium japonicum. II – Isolation and characterization of a galactose specific lectin. **Journal of Cell Biology**, New York, v.111, p.1639-1643, 1990.

HOLLINGSWORTH, P.S.; HOLLINGSWORTH, R.L.; DAZZO, F.B. Host-range related features of the acidic extracellular polysaccharides of Rhizobium trifolii and Rhizobium leguminosarum. **Journal of Biological Chemistry**, Washington, v.264, p.1461-1466, 1989.

HOLLIS, A.B.; KLOOS, W.E.; ELKAN, G.H. DNA:DNA hybridization studies of Rhizobium japonicum and related Rhizobiaceae. **Journal of General Microbiology**, New York, v.123, p.215-222, 1981.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A. et al. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p.76-170.

HUA, S.S.T.; LICHENS, G.M.; GUIRAO, A. et al. Biochemical properties of glutamate synthase of salt-tolerant Bradyrhizobium sp. strain WR 1001. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v.37, p.209-213, 1986.

HUBER, T.A.; AGARWAL, A.K.; KEISTER, D.L. Extracellular polysaccharide composition, ex planta nitrogenase activity, and DNA homology in Rhizobium japonicum. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.158, p.1168-1171, 1984.

HUDGSON, A.L.M.; ROBERTS, W.P.; WAID, J.S. Regulated nodulation of *Trifolium subterraneum* inoculated with bacteriocin producing strains of *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.17, p.475-478, 1985.

HUNGRIA, M.; BOHRER, T.R.J. Variability of nodulation and dinitrogen fixation capacity among soybean cultivars. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.31, p.45-52, 2000.

HUNGRIA, M.; JOSEPH, C.M.; PHILLIPS, D.A. Anthocyanidins and flavonols, major nod gene inducers from seeds of a black-seeded common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Plant Physiology**, Baltimore, v.97, p.751-758, 1991.

HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P. Efeito da manipulação de fotossintatos na fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.21, p.9-24, 1986.

HUNGRIA, M.; PHILLIPS, D.A. Effects of a seed color mutation on rhizobial nod-gene-inducing flavonoids and nodulation in common bean. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, London, v.6, p.418-422, 1993.

HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R. et al. Fixação biológica do nitrogênio em soja. In: ARAÚJO, R.S.; HUNGRIA, M. (Eds.) **Microrganismos de importância agrícola**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. p.9-89.

HYMOWITZ, T. On the domestication of the soybean. **Economic Botany**, Bronx, v.24, p. 408-421, 1970.

IBGE. Levantamento sistemático de produção agrícola. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/lspa>>. Acesso em: 20 jun. 2001.

JOHN, M.; RÖHRIG, H.; SCHMIDT, J. et al. *Rhizobium nodC* protein involved in nodulation signal synthesis is a chitooligosaccharide deacetylase. **Proceedings of National Academy Science of USA**, Madison, v.90, p.625-629, 1993.

JOHNSEN, A.R.; BENDIXEN, K.; ULRICH, K. Detection of microbial growth on polycyclic aromatic hydrocarbons in microtiter plates by using the respiration indicator WST-1. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.68, p.2683-2689, 2002.

JORDAN, D.C. Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.32. p.136-139, 1982.

JUDD, A.K.; SCHNEIDER, M.; SADOWSKY, M.J.; de BRUJIN, F. Use the repetitive sequences and the polymerase chain reaction technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 strains. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.1702-1708, 1993.

KOBER, M.V. Caracterização de variantes de *Bradyrhizobium japonicum*: morfologia colonial, resistência a antibióticos, perfil isoenzimáticos e comportamento simbiótico em soja. 1997. 102f. Dissertação (Mestrado) – Pós-

Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.

KOZUSNY-ANDREANI, D.I. **Uso de marcadores moleculares para estimar a eficiência da fixação biológica de nitrogênio em variantes isoladas de Bradyrhizobium japonicum SEMIA 566 e SEMIA 5079.** Jaboticabal: UNESP, 1992. 98f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1992.

KOZUSNY-ANDREANI, D.I. **Descrição de um marcador endógeno em Bradyrhizobium japonicum e Bradyrhizobium elkanii para uso em estudos ecológicos.** Jaboticabal: UNESP, 1997. 97 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1997.

KOZUSNY-ANDREANI, D.I.; LEMOS, E.G.M. **Análisis a través de marcadores moleculares y eficiencia en la fijación de nitrógeno de variantes aisladas de Bradyrhizobium japonicum SEMIA 566 y SEMIA 5079.** In: REUNIÓN LATINOAMERICANA DE RHIZOBILOGIA, 18., Santa Cruz de la Sierra, 1996. **Anais...** Santa Cruz de la Sierra: ALAR, 1996. p.261-263.

KUYKENDALL, L.D.; ELKAN, G.H. **Rhizobium derivatives differing in nitrogen-fixing efficiency and carbohydrate utilization.** *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.32, p.511-519, 1976.

KUYKENDALL, L.D.; ROY, M.A.; O'NEILL, J.J. et al. **Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of Bradyrhizobium japonicum**, *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washington, v.38, p.358-361, 1988.

KUYKENDALL, L.D.; SAXENA, B.; DEVINE, T.E. et al. **Genetic diversity in Bradyrhizobium japonicum Jordan 1982 and a proposal for Bradyrhizobium elkanii sp. Nov.** *Canadian Journal of Microbiology*, Ottawa, v.38, p.501-505, 1992.

LABANDERA, C.A.; VINCENT, J.M. **Competition between an introduced strain and native uruguayan strains of Rhizobium trifolii.** *Plant and Soil*, Dordrecht, v.42, p. 237-247, 1975.

LAGUERRE, G.; MAVINGUI, P.; ALLARD, M.R. et al. **Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: Application to Rhizobium leguminosarum and its different biovars.** *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 62, p. 2029-2036, 1996.

LEGENDRE, L.; LEGENDRE, P. **Numerical ecology.** New York: Elsevier, 1983. 419 p.

LEMOS, E.G.M. **Classificação e identificação de bradirrizóbios que nodulam soja por análise de padrões enzimáticos, sorologia, morfologia de colônias e atividade de hidrogenase.** Jaboticabal: UNESP, 1994. 108 f. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1994.

LEUNG, K.; STRAIN, S.R.; BRUJIN, F.J. et al. Genotypic and phenotypic comparisons of chromosomal types within indigenous soil population of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.416-426, 1994.

LIM, S.T. Determination of hydrogenase in free-living cultures of *Rhizobium japonicum* and energy efficiency of soybean nodules. **Plant Physiology**, Baltimore, v.62, p.609-611, 1978.

LIU, R.; TRAN, V.M.; SCHIMIDT, E.L. Nodulating competitiveness of a nonmotile Tn7 mutant of *Bradyrhizobium japonicum* in nonsterile soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.55, p.1895-1900, 1989.

LLORET, J.; WULFF, B.B.H.; RUBIO, J.M. et al. Exopolysaccharide II production is regulated in the halotolerant strain *Rhizobium meliloti* EFB I. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, p.1024-1028, 1998.

LODEIRO, A.R.; FAVELUKES, G. Early interactions of *Bradyrhizobium* and soybean roots: specificity in the process of adsorption. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.31, p.1405-1411, 1999.

LODEIRO, A.R.; LOPEZ-GARCÍA, S.L.; VÁZQUEZ, T.E.E. et al. Stimulation of adhesiveness, infectivity, and competitiveness for nodulation of *Bradyrhizobium japonicum* by its pretreatment with soybean seed lectin. **FEMS Microbiology Letter**, Amsterdam, v.188, p. 177-184, 2000.

LONG, S.R. Genes and signals in the *Rhizobium*-legume symbiosis. **Plant Physiology**, Baltimore, v.125, p.69-72, 2001.

LOPES, E.S.; GIARDINI, A.R.; KIEHL, R. et al. Especificidade hospedeira e pré-seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* para as variedades Santa Rosa, Viçosa e IAC-2 de soja *Glycine max* (L.) Merrill. **Bragantia**, Campinas, v.35, p.1-12, 1976.

LORDA, G.S.; BALATTI, A.P. Designing media I. Production of high cell concentrations of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. In: BALLATI, A. P.; FREIRE, J.R.J. (Eds.) **Legume inoculants. Selection and characterization of strains. Production, use and management**. Buenos Aires: [s.n.], 1996. p. 78-81.

LOUWS, F.J.; FULBRIGHT, D.W.; STEPHENS, C.T. et al. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, p.2286-2295, 1994.

LUNGE, V.R. Identificação e análise filogenética entre estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* por RFLP e RAPD. 112f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1993.

MAGALHÃES, C.M. Introdução e evolução da soja no Brasil; No Estado do Rio Grande do Sul. In: MIYASAKA, S.; MEDINA, J.C. (Eds.) **A soja no Brasil**. Campinas: ITAL, 1981. p.18-20.

MARTIN, R.; HUMBERT, O; CAMARA, M. et al. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.20, p.3479-3483, 1992.

MARTINEZ de DRETZ, ; ARIAS,G.; ROVIRA de CUTINELLA, M. Fast and slow growing *Rhizobia*: difference in sucrose utilization and invertase activity. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.20, p.605-609, 1972.

MATHIS, J.N.; ISRAEL, D.W.; BARBOUR, W.M. et al. Analysis of the symbiotic performance of *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 and its derivative I-110 and discovery of new manitol-utilizing, nitrogen-fixing USDA 110 derivative. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.52, p.75-80, 1986.

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

MEANS, U.M.; JOHNSON, W.; ERDMAN, L.W. Competition between bacterial strains effecting nodulation in soybeans. **Soil Science America Proceedings**, Madison, v.25, p.105-108, 1961.

MEEK, L.; ARP, D.J. The hydrogenase cytochrome b heme ligands of *Azotobacter vinelandii* are required for full H₂ oxidation capability. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.82, p.3429-3436, 2000.

MEYER, M.C.; PUEPPKE, S.G. Differentiation of *Rhizobium japonicum* strain derivatives by antibiotic sensitivity patterns, lectin binding, and utilization of biochemicals. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.26, p.606-612, 1980.

MINAMISAWA, K. Division of rhizobitoxine-producing and hydrogen-uptake positive strains of *Bradyrhizobium japonicum* by *nifDKE* sequence divergence. **Plant and Cell Physiology**, Kioto, v.31, p.81-89, 1990.

MINAMISAWA, K. Comparison of extracellular polysaccharide composition, rhizobitoxine production, and hydrogenase phenotype among various strains of *Bradyrhizobium japonicum*. **Plant and Cell Physiology**, Kioto, v.30, p.877-884, 1989.

MINAMISAWA, K.; FUKAI, K. Production in indole-3-acetic acid by *Bradyrhizobium japonicum*: a correlation with genotype grouping and rhizobitoxine. **Plant and Cell Physiology**, Kioto, v.32, p.1-9, 1991.

MINAMISAWA, K.; ONODERA, S.; TANIMURA, Y. Preferential nodulation of Glycine max, Glycine soja and *Macroptilium atropurpureum* by two *Bradyrhizobium* species japonicum and elkanii. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.24, p.49-56, 1997.

MINAMISAWA, K.; SEKI, T.; ONODERA, S.; KUBOTA, M.; ASAMI, T. Genetic relatedness of *Bradyrhizobium japonicum* field isolates as revealed by repeated sequences and various other characteristics. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.58, p. 2832-2839, 1992.

MULLEN, M.D.; WOLLUM II, A.G. Variation among different cultures of *Bradyrhizobium japonicum* strains USDA 110 and 122. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.35, p.583-588, 1989.

MUNEVAR, F.; WOLLUM II, A.G. Growth of *Rhizobium japonicum* strains at temperature above 27°C. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.42, p.272-276, 1981.

NEI, M. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Columbia University Press, 1987. 512p.

NEVES, M.C.P.; DIDINET, A.D.; DUQUE, F.F. et al. *Rhizobium* strains effects on nitrogen fixation and distribution in soybeans. **Journal of Experimental Botany**, London, v.36, p.1179-1192, 1985.

NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Bioquímica e fisiologia da fixação de nitrogênio. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. (Eds.) **Microbiologia do Solo**. Campinas: SBSCS, 1992. p.141-155.

NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. **Ecologia do rizóbio em solos tropicais**. Rio de Janeiro: [s.n.], 1996. 27p. (EMBRAPA-CNPAB. Documento, 23).

NISHI, C.Y.M. **Infecção, competitividade e eficiência da fixação biológica do N₂ em soja (*Glycine max* (L.) Merrill) inoculada com as estirpes de *Bradyrhizobium SEMIA 566*, *SEMIA 586*, *SEMIA 5079* e *SEMIA 5080***. 1995. 115f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1995.

NISHI, C.Y.M.; BODDEY, L.H.; VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Morphological, physiological and genetic characterization of two new *Bradyrhizobium* strains recently recommended in Brazilian commercial inoculants for soybean. **Symbiosis**, Philadelphia, v.20, p.147-162, 1996.

NOEL, K.D.; VANDENBOSCH, K.A.; KULPACA, B. Mutations in *Rhizobium phaseoli* that lead arrested development of infection in threads. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.168, p.1392-1401, 1986.

ORGAMBIDE, G.G.; LEE, J.I.; HOLLINGSWORTH, R.I. et al. Structurally diverse chitolipooligosaccharide Nod factors accumulate primarily in membranes of wild-type *Rhizobium leguminosarum biovar trifolii*. **Biochemistry**, Oxford, v.34, p.3832-3840, 1995.

OWEENS, L.D.; WRIGHT, D.A. Rhizobial chlorosis in soybeans: Isolation, production in nodules, and varietal specificity of the toxin. **Plant Physiology**, Rockville, v.40, p.927-930, 1965.

PADMANABHAN, S.; HIRTZ, R.D.; BROUGHTON, W.J. Rhizobia in tropical legumes: cultural characteristics of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* sp. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.22, p.23-28, 1990.

PERES, J.R.R. Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* e competitividade por sítios de infecção nodular em cultivares de soja (*Glycine max* L. Merrill).

1979. 81 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1979.

PERES, J.R.R.; MENDES, I.C.; SUHET, A.R.; VARGAS, M.A.T. *Eficiência e competitividade de estirpes de rizóbio para soja em solos de cerrado.* **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.17, p.357-363, 1993.

PERES, J.R.R.; VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R. *Variabilidade na eficiência em fixar nitrogênio entre isolados de uma mesma estirpe de *Rhizobium japonicum*.* **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.8, p.193-196, 1984.

PERES, J.R.R.; VIDOR, C. *Relação entre concentração de células no inoculante e competição por sítios de infecção nodular entre estirpes de *Rhizobium japonicum* em soja.* **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.4, p. 139-143, 1980.

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

PINTO, P.P.; RAPOSEIRAS, R.; MACEDO, A.M. et al. *Effects of high temperature on survival, symbiotic performance and genomic modifications of bean nodulation *Rhizobium* strains.* **Reviews of Microbiology**, Washington, v.29, p.295-300, 1998.

POUPOT, R.; MARTINEZ-ROMERO, E.; PROMÉ, J.C. *Nodulation factors from *Rhizobium tropici* are sulfated or non-sulfated chitopentasaccharides containing an N-methyl-N-acylglucosamine terminus.* **Biochemistry**, Oxford, v.32, p.10430-10435, 1993.

PUEPPKE, S.G.; BOLANOS-VÁSQUEZ, M.C.; WERNER, D. et al. *Release of flavonoids by soybeans cultivars McClall and Peking and their perception as signals by nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium fredii*.* **Plant Physiology**, v.117, p.599-608, 1998.

PUVANESARAJAH, V.; SCHELL, F.M.; GERHOLD, D. et al. *Cell surface polysaccharides from *Bradyrhizobium japonicum* and a nonnodulating mutant.* **Journal of Bacteriology**, Washington, v.169, p.137-141, 1987.

REYES, V.G.; SCHMIDT, E.L. *Population densities of *Rhizobium japonicum* strain 123 estimated directly in soil and rhizospheres.* **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.37, p.854-858, 1979.

RICHARDSON, A.E.; VICARS, L.A.; WATSON, J.M. et al. *Differentiation of *Rhizobium* strains using the polymerase chain reaction with random and directed primers.* **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v.27, p.515-524, 1995.

RODRIGUEZ, J.J. *Isolamento e caracterização de variantes de *Rhizobium phaseoli*.* 1984. 90 f. Dissertação (Mestrado em Solos) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1984.

ROHLF, F.J.; SLICE, D.E. **Numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York: NTSYS, 1992. 115 p.

ROLFE, B.G.; GRESHOFF, P.M.; SHINE, J. et al. Interaction between a non-nodulating and an ineffective mutant of *Rhizobium trifolii* resulting in effective (nitrogen-fixing) nodulation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.39, p.449-452, 1980.

ROUGHLEY, R.J. The production of high quality inoculants and their contribution to legume yield. In: NUTMAN, P.S. (Ed.) **Symbiotic nitrogen fixation in plants**. Cambridge: Cambridge University Press, 1976. p.121-136.

RUAN, X.; PETERS, N.K. Isolation and characterization of rhizobiotoxine mutants of *Bradyrhizobium japonicum*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.174, p.3467-3473, 1992.

RUMJANEK, N.G.; DOBERT, R.C.; van BERKUM, P.; TRIPLETT, E.W. Common soybean inoculant strains in Brazil are members of *Bradyrhizobium elkanii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.4371-4373, 1993.

SÁ, E.L.S. de. **Isolamento e caracterização de variantes de *Bradyrhizobium japonicum***. 1987. 112 f. Dissertação (Mestrado em Solos) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1987.

SÁ, E.L.S. de. **Diversidade fenotípica e genética de rizóbios isolados de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) em solos ácidos de Cunha – SP**. Piracicaba: UNESP, 2001. 109 f. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

SADOWSKY, M.J. Competition for nodulation in the soybean/*Bradyrhizobium* symbiosis. In: TRIPLETT, E.W. (Ed.) **Prokaryotic nitrogen fixation: A model system for the analysis of a biological process**. Madison: Horizon Scientific Press, 2000. p.279-293.

SADOWSKY, M.J.; KEYSER, H.H.; BOHLOOL, B.B. Biochemical characterization of fast and slow growing rhizobia the nodulated soybeans. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.32, p.716-722, 1983.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1352p.

SANTOS, M.A. **Caracterização genotípica e fenotípica de estirpes de *Bradyrhizobium noduladoras* de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) isoladas da região dos Cerrados**. Londrina: UEL, 1998. 81f. Dissertação (Mestrado) – Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1998.

SATO, M.L. **Sobrevivência e estabilidade genética da SEMIA 587 de *Bradyrhizobium japonicum* submetida à liofilização**. 1995. 157 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1995.

SATO, M.L.; GARCÍA-BLÁSQUEZ, C.; van BERKUM, P. Verification of strain identify in Brazilian soybean inoculants by using the polymerase chain reaction. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Philadelphia, v.15, p.387-391, 1999.

SAXENA, D.; AMIN, M.; KHANA, S. Modulation of protein profiles in *Rhizobium sp* under salt stress. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.42, p.617-630, 1996.

SCHLAMMAN, H.R.; PHILLIPS, D.A.; KONDOROSI, E. Genetic organization and transcriptional regulation of rhizobial nodulation genes. In: SPAINK, H.P.; KONDOROSI, A.; HOOYKAAS, P.J.J. (Eds.) **The Rhizobiceae: Molecular biology of model plant-associated bacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p.361-386.

SCHWINGHAMER, E.A.; DUDMAN, W.F. Methods for identifying strains of diazotrophs. In: BERGENSEN, F. J. (Ed.) **Methods for evaluating biological nitrogen fixation**. New York : Jonh Willey, 1980, p.337-365.

SCOTTI, M.R.M.L.; NEVES, M.C.P.; DOBEREINER, J.; PAIVA, E. Competitive and proteic alterations in *Bradyrhizobium japonicum* strains after contact with soybean root (*Glycine max* (L.) Merril). **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, Rio de Janeiro, v.65, p.427-438, 1993.

SELENSKA-POBELL, S.; GIGOVA, L. PETROVA, N. Strain-specific fingerprints of *Rhizobium galegae* generated by PCR with arbitrary and repetitive primers. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.79, p.425-431, 1995.

SESSISTISCH, A.; JJEMBA, P.K.; HARDSON, G. et al. Measurement of competitiveness index of *Rhizobium tropici* strain CIAT 899 derivatives marked with the *gusA* gene. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.29, p.1099-1110, 1997.

SINGLETON, P.W.; BOHLOOL, B.B.; NAKAO, P.L. Legume response to rhizobial inoculation in the tropics: myths and realities. In: LAL, R.; SANCHEZ, P.A., (Eds.) **Myths and science of soils of the tropics**. Madison: Soil Science Society of America, 1992. p.135-155.

SMITH, G.B.; WOLLUM II, A.G. Nodulation of *Glycine max* by six *Bradyrhizobium japonicum* strains with different competitive abilities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.55, p.1957-1962, 1989.

SOBERÓN CHAVES, G.; NÁJERA, R.; OLIVERA, H.; et al. Genetic rearrangements of a *Rhizobium phaseoli* symbiotic plasmid. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.167, p.487-491, 1986.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H.J. **Handbook for rhizobia**. New York: Springer-Verlag, 1994. 450p.

STACEY, G.; LUKA, S.; SANJUAN, J. et al. *nodZ*, a unique host-specific nodulation gene, is involved in the fucosylation of the lipopolysaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.176, p.620-633, 1994.

STACEY, G.; PAAU, A.S.; NOEL, K.D. et al. Mutants of *Rhizobium japonicum* defective in nodulation. **Archives of Microbiology**, Heidelberg, v.132, p.219-224, 1982.

STANLEY, J.S.; BROWN, G.G.; VERMA, D.P.S. Slow-growing *Rhizobium japonicum* comprises two highly divergent symbiotic types. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.163, p.148-154, 1985.

STOWERS, M. D.; EAGLESHAM, A. R. Physiological and symbiotic characteristics of fast growing *Rhizobium japonicum*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.77, p.3-14, 1984.

SULLIVAN, J.T.; EARDLY, B.D.; van BERKUM, P. et al. Four unnamed species of nonsymbiotic rhizobia isolated from the rhizosphere of *Lotus corniculatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.62, p.2818-2825, 1996.

SULLIVAN, T.T.; RONSON, C.W. Evolution of rhizobium by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a *phe-rRNA* gene. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, Madison, v.95, p.5145-5149, 1998.

SYLVESTER-BRADLEY, R.; THORNTON, P.; JONES, P. Colony dimorphism in *Bradyrhizobium strain.*, **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.54, p.1033-1038, 1989.

TEANEY III, G.B.; FUHRMANN, J. Soybean response to nodulation by bradyrhizobia differing in rhizobitoxine phenotype. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.145, p.275-285, 1992.

TEDESCO, M.J.; GIANELO, C.; BISSANI, C.A. et al. **Análises de solo, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre: Departamento de Solos da UFRGS, 1995. 188p. (Boletim Técnico de Solos, 5).

TRINICK, M.J. Competition between rhizobial strains for nodulation. In: Vincent, J. M. (Ed.) **Nitrogen fixation in legumes**. Sydney: Academic Press, 1982. p.229-237.
TRIPLETT, E.W.; BARTA, T.M. Trifotoxin production and nodulation are necessary for the expression of superior nodulation competitiveness by *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* strain T24 on clover. **Plant Physiology**, Baltimore, v.85, p.335-342, 1987.

TRIPLETT, E.W.; SADOWSKY, M.J. Genetics of competition for nodulation. **Annual Review of Microbiology**, Washington, v.46, p.399-428, 1992.

TYLER, K.D.; WANG, G.; TYLER, S.D. et al. Factors affecting reability and reproducibility of amplication-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. **Journal Clinical of Microbiology**, Dordrecht, v.35, p.339-346, 1997.

UNNI, S.; RAO, K.K. Protein and lipopolysaccharide profiles of a salt-sensitive *Rhizobium* sp and its exopolysaccharide-deficient mutant. **Soil Biology Biochemistry**, Oxford, v.33, p.111-115, 2001.

van BERKUM, P. Evidence for a third uptake hydrogenase phenotype among the soybean bradyrhizobia. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, p.3835-3841, 1990.

van BERKUM, P.; EARDLEY, B.D. Molecular evolutionary systematics of the Rhizobiaceae. In: SPAINK, H.P.; KONDOROSI, A.; HOOYKAAS, P.J.J. (Eds.) **The Rhizobiaceae: Molecular biology of model plant-associated bacteria**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998. p.1-24.

VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. Fixação biológica do nitrogênio na cultura da soja. In: VARGAS, M.A.T.; HUNGRIA, M. (Eds.) **Biologia dos solos dos cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. p.297-360.

VARGAS, M.A.T.; MENDES, I.C.; SUHET, A.R. et al. Fixação biológica do nitrogênio. In: SIMPÓSIO SOBRE A CULTURA DA SOJA NOS CERRADOS: Cultura da soja nos Cerrados, 1992. Uberaba. **Anais...** Uberaba: POTAFOS, 1992. p. 159-182.

VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R. Eficiência de inoculantes comerciais e de estirpes de *Rhizobium* para seis leguminosas forrageiras em um solo de cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.16, p.357-362, 1981.

VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R.; MENDES, I.C et al. **Fixação biológica de nitrogênio em solos de Cerrados**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 83p.

VASILAS, B.L.; FUHRMANN, J.J. Field response of soybean to nodulation by a rhizobiotoxine-producing strain of *Bradyrhizobium*. **Agronomy Journal**, Madison, v.85, p.302-305, 1993.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.19, p.6823-6831, 1991.

VESPER, S.J.; BAUER, W.D. Characterization of *Rhizobium* attachment to soybean roots. **Symbiosis**, Philadelphia, v.1, p.139-162, 1985.

VIDOR, C.; BROSE, E.; PEREIRA, J.S. Competição por sítio de infecção nodular entre estirpes de *Rhizobium japonicum* em cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merr.). **Agronomia Sulriograndense**, Porto Alegre, v.15, p.227-238, 1979.

VIDOR, C.; FREIRE, J.R.J.; SOARES, J. et al. Especificidade simbiótica entre estirpes de *Rhizobium japonicum* e variedades de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Agronomia Sulriograndense**, Porto Alegre, v. 08, p.61-67, 1972.

VINCENT, J.M. **Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970. 164p.

VINUESA, P.; RADEMAKER, J.L.W.; de BRUJIN, F.J.; et al. Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic wood legumes of the Canary Islands by PCR-Restriction fragment Length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting and partial 16S rDNA sequencing. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.64, p.2096-2104, 1998.

WEAVER, R.W.; FREDERICK, L.R. Effects of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max* L. Merril. I. Greenhouse studies. **Agronomy Journal**, Madison, v.66, p.229-232, 1974.

WEISER, G.C.; SKIPPER, H.D.; WOLLUM II, A.G. Exclusion of inefficient *Bradyrhizobium japonicum* sero groups by soybean genotypes. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.121, p.99-105, 1990.

WILSON, K.J. Molecular techniques for study of rhizobial ecology in the field. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.27, p.501-514, 1995.

WOOD, M.; COOPER, J.E.. Screening clover and *Lotus* rhizobia for tolerance of acidity and aluminum. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.17, p.493-497, 1985.

XU, L.M.; GE, C.; CUI, Z. et al. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.45, p.706-711, 1995.

YOUNG, C.C.; CHEN, K.T. Genetic diversity of fast and slow growing soybean rhizobia determined by random amplified polymorphic DNA analysis. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v.26, p.2544-2560, 1998.

YOUNG, J.P.W.; DOWNER, H.L.; EARDLY, B.D. Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTA il by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.173, p.2271-2277, 1991.

ZAHARAN, H. H.; RASANEN, L. A.; KARSISTO, M. et al. Alteration of lipopolysaccharide and protein profiles in SDS-PAGE of rhizobia by osmotic and heat stress. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 10, p.100-105, 1994.