

2

Fatores bióticos e abióticos à fixação biológica de N₂

Márcia do Vale Barreto Figueiredo

Bióloga, Dra., Instituto Agronômico de Pernambuco/IPA/CARHP
E-mail: marcia@ipa.br

Mário de Andrade Lira Junior

Engenheiro Agrônomo, PhD., Universidade Federal Rural de Pernambuco/UFRPE

Ademir Sérgio Ferreira de Araújo

Engenheiro Agrônomo, Dr. Universidade Federal do Piauí/UFPI

Cosme Rafael Martinez

Engenheiro Agrônomo, Dr. Universidade Federal da Paraíba/UFPB

INTRODUÇÃO

Simbioses, da mesma forma que a maioria das interações patogênicas, são caracterizadas pela sua complexidade e especificidade. Esses processos são de enorme importância para a produtividade global na agricultura e fornecem modelos para estudos fundamentais dos sistemas da planta e do microrganismo (Smith, 1992). O desenvolvimento de novas estratégias na busca por estirpes mais eficientes e competitivas para superar limitações à fixação biológica do nitrogênio (FBN) constitui-se em um campo de investigação aberto, amplo e contínuo.

Em condições de clima tropical, os principais fatores abióticos que afetam a FBN são: acidez do solo, toxidez de alumínio, salinidade e baixa fertilidade do solo, disponibilidade de N mineral, deficiência de nutrientes como fósforo e molibdênio, altas temperaturas no solo, luminosidade e baixa precipitação pluviométrica (Hungria & Vargas, 2000), metais pesa-

dos (Moreira & Siqueira, 2006), tipo de solo, textura e composição (Benizri et al., 2001). Com relação aos fatores bióticos temos: o tipo de inóculo e a via de inoculação (Brockwell et al., 1988), a seleção de cultivares apropriados que influencia decisivamente sobre as entradas de nitrogênio nos sistemas agrícolas (Wani et al., 1995), o controle de pestes e enfermidades que afetam o vigor da planta e o seu potencial de crescimento (Johnstone & Barbetti, 1987), competitividade, sobrevivência saprofítica, presença de antagonistas (Singh et al., 1995). Esses fatores bióticos são determinados pelas interações sinérgicas ou antagônicas com os outros representantes da biota do solo e com o próprio rizóbio, na sobrevivência e competição pela nodulação da planta hospedeira (Straliotto & Rumjanek, 1999).

A combinação favorável dos fatores bióticos e abióticos presentes nos ecossistemas vai determinar o sucesso da inoculação, sendo primordial o conhecimento das características dos microrganismos a serem introduzidos, sua adaptabilidade e capacidade competitiva. A eficiência dos microrganismos diazotróficos em fixar o dinitrogênio depende tanto dos fatores genéticos do micro e macrossimbionte como da interação destes com os fatores ambientais (Hungria & Vargas, 2000; Deka et al., 2006).

Esses fatores limitantes podem atuar sobre a bactéria e sobre o hospedeiro, afetando a simbiose, e seus efeitos também podem variar, dependendo das espécies de simbioses envolvidas. Os fatores abióticos alteram quantitativa e qualitativamente a população de rizóbio no solo (Antón, 2004; Figueiredo et al., 2007). A colonização e a sobrevivência de estirpes introduzidas no solo, bem como a alta capacidade competitiva por sítios de infecção nodular em relação às estirpes naturalizadas, vem se constituindo em uma das maiores preocupações dos rizobiologistas.

Vários fatores interferem na eficiência simbiótica das estirpes. Alguns são intrínsecos à bactéria, outros são extrínsecos, envolvendo outros microrganismos do solo, fatores de clima e solo ou determinados pela planta hospedeira (Howieson & Ballard, 2005). Nos tópicos a seguir serão descritos os principais fatores bióticos e abióticos que interferem na FBN, suas principais características e interações.

1 FATORES BIÓTICOS À FIXAÇÃO DE N₂

Entre os fatores bióticos os mais relevantes estão: o tipo de inóculo e a via de inoculação (Brockwell et al., 1988), a seleção de cultivares apropriados que influencia decisivamente sobre as entradas de nitrogênio nos sistemas agrícolas (Wani et al., 1995), o controle de pestes e enfermidades que afetam o vigor da planta e o seu potencial de crescimento (Johnstone & Barbetti, 1987), a competitividade do rizóbio na rizosfera, a sobrevivência saprofítica no solo e interação sinérgica e antagônica (Straliotto & Rumjanek, 1999). As interações como antagonismo e sinérgismo bacteriano que ocorrem na rizosfera são bastante complexas e muito pouco estudadas. Vários fatores estão envolvidos, e os efeitos na sobrevivência do rizóbio e nodulação são muitas vezes correlacionados com a competição por substratos de carbono, produção de antibióticos, sideróforos ou substâncias estimuladoras do crescimento vegetal (Rumjanek et al., 1995). O estabelecimento bacteriano na rizosfera é uma condição fundamental para que o microrganismo possa interagir com a planta. Além disso, é necessário que a bactéria se espalhe ao longo da raiz e não perca a capacidade de sobreviver e multiplicar-se de maneira competitiva em relação à comunidade nativa. A colonização radicular é um processo bastante complexo, pois diferentes microrganismos estão sujeitos a diversos fatores bióticos e abióticos (Benizri et al., 2001).

Resultados de experimentos têm mostrado a possibilidade de obter incremento na nodulação, por exemplo, pelo fornecimento de sinais (flavonóides) que podem ser adicionados aos inoculantes. Diversos benefícios agrônômicos, com o aumento significativo da nodulação de leguminosas e da capacidade competitiva dos rizóbios, podem ser alcançados pelo aumento quantitativo e/ou qualitativo dos indutores exsudatos pelo hospedeiro. Contudo, torna-se crucial um melhor entendimento de trocas de sinais moleculares na interação planta/microrganismos (Antón, 2004).

Na rizosfera existe a presença dos mais diversos exsudatos radiculares e é onde se concentra o maior número de microrganismos. A exsudação radicular também determina quais organismos residirão naquela rizosfera, como também quais irão gerar benefícios físicos e químicos para as plantas. Um exemplo desses benefícios é a produção de mucilagem no sistema radicular, reduzindo a descamação das raízes e melhorando o contato entre as raízes e a solução do solo (Nehl et al., 1996). As mudanças da composição dos exsudatos por causa da estrutura e do funcionamento da comunidade microbiana do solo são pouco compreendidas. Contudo, um motivo provável para a não-promoção de crescimento por um isolado bacteriano decorre de sua falta de habilidade e agressividade em colonizar a rizosfera de uma espécie vegetal (Jjemba & Alexander, 1999).

Fatores bióticos também influenciam a colonização da rizosfera, como a existência de predação por protozoários, ou a qualidade dos exsudatos radiculares (que podem atingir de 40 a 90% do carbono translocado para as raízes). Os exsudatos radiculares são classificados em cinco tipos: difusatos, secreções, lisatos, gases e mucilagem. As plantas são capazes de liberar esses compostos no solo bem como reabsorver esses rizodepósitos, balanceando o fluxo de carbono na rizosfera. Esse tipo de recaptura permite aos vegetais certo controle sobre o tamanho das comunidades microbianas associadas à rizosfera. É importante relatar que os fenômenos de antibiose, densidade populacional, capacidade de degradar moléculas energeticamente estáveis e/ou quimicamente repelentes são ativos na capacidade de colonização da rizosfera (Benizri et al., 2001).

Estudos de inoculação demonstram que a sobrevivência de bactérias na rizosfera possui correlação positiva com os parâmetros físicos do solo, como o teor de argila, de matéria orgânica e de nitrogênio, e uma correlação negativa com o teor de areia e carbonato de cálcio (Benizri et al., 2001).

1.1 Competitividade dos rizóbios

A competitividade pode ser definida como a relação entre o número de bactérias de uma determinada estirpe no inóculo e a porcentagem de nódulos que essa estirpe consegue ocupar nas raízes da planta hospedeira. Para competir com as estirpes naturalizadas ou nativas do solo, a bactéria introduzida deve apresentar características genéticas ou fisiológicas que permitam o seu favorecimento ou, então, uma vantagem numérica (Araújo, 1995). Diversos laboratórios têm concentrado seus esforços na identificação dos fatores que influenciam a capacidade competitiva das bactérias. Alguns desses fatores incluem a sua mobilidade no solo, resposta às substâncias indutoras dos genes de nodulação excretadas pelo hospedeiro (flavonóides) (Dakora, 2003), ou outros compostos como açúcares, aminoácidos, e ácidos orgânicos identificados como quimioatrativos para o rizóbio (Aguillar et al., 1988), velocidade de infecção das raízes (Oliveira & Graham, 1990), produção de bacteriocina (Triplett, 1990), eficiência da estirpe em formar nódulos (McDermott & Graham, 1989), e possibilidade de realizar manipulações genéticas (Triplett, 1990). É importante frisar que, embora muitas vezes seja possível obterem-se estirpes mais eficientes por meio de modificações genéticas, o estabelecimento dessas bactérias no campo pode ser extremamente difícil, devido à elevada capacidade competitiva das estirpes nativas ou naturalizadas do solo (Thies et al., 1991).

Outros fatores também estão envolvidos, como o caso das substâncias como as lectinas que atuam na adesão das células do rizóbio às células radiculares do hospedeiro (Freire, 1992), dos polissacarídeos extracelulares (Araújo et al., 1994), e a produção de sideróforos. Este último pode ter impacto significativo na competição entre rizóbios no solo (Duhan et al., 1999), uma vez que essa estrutura está diretamente envolvida na captação do ferro, cuja presença é marcante em muitas moléculas que fazem parte do processo da fixação de nitrogênio, como o complexo nitrogenase, a leghemoglobina, ferredoxina, hidrogenase e citocromos (Yeoman et al., 2000). Além disso, o sideróforo

desempenha um papel fundamental na formação do nódulo (Reigh & O'Connell, 1993).

A capacidade de produzir sideróforos parece ser mais difundida entre o gênero *Rhizobium* que entre o gênero *Bradyrhizobium*, uma vez que esse gênero evoluiu em solos ácidos, onde o ferro está normalmente mais disponível (Guerinot, 1994). Além disso, os rizóbios podem utilizar sideróforos de outros rizóbios, chamado sinergismo inter-estirpe, desde que possuam proteínas receptoras da membrana externa específica para o sideróforo em questão.

Em estudos mais recentes, as técnicas de biologia molecular vêm sendo cada vez mais empregadas na busca de identificação de genes ou de produtos gênicos que alterem a competitividade (Batista et al., 2007). O genótipo da planta também pode alterar a competitividade da bactéria pela seleção de determinadas estirpes. A seleção de estirpes eficientes para maximizar a FBN em espécies vegetais de importância econômica tem sido um dos principais alvos de pesquisa. Além da eficiência, essas estirpes devem apresentar outras características tais como: competição por sítios de infecção nodular, boa sobrevivência e adaptação às condições edáficas e climáticas (Moreira & Siqueira, 2006).

No caso de competitividade, as estirpes introduzidas atuam em diferentes estádios de nodulação: competem na rizosfera, durante a ocupação dos sítios de infecção, e ao penetrar nas raízes e promover o desenvolvimento do nódulo. Aliada à eficiência simbiótica, essas características são altamente desejáveis para estirpes de rizóbios recomendadas para inoculação. Trabalhos desenvolvidos por Xavier et al. (2006) estudam a taxa de ocupação nodular de estirpes de rizóbio inoculadas em acessos de feijão oriundos do Brasil, Estados Unidos e Nigéria, e a sua relação com a especificidade simbiótica resultou que os acessos brasileiros apresentaram as maiores taxas de ocupação nodular. A maior porcentagem de ocupação em seis dos 10 acessos de feijão caupi testados foi decorrente da inoculação com a estirpe BR3267. A avaliação da capacidade de ocupação de nódulos pode fornecer subsídios em relação à capacidade de sobrevivência, estabelecimento e competitividade

da estirpe inoculante com os outros rizóbios presentes no solo ou com as estirpes já introduzidas (Martins et al., 2003).

Nem sempre a população de rizóbio nativo do solo é capaz de estabelecer uma simbiose mutualística com o hospedeiro cultivado, sendo, então necessária a inoculação de estirpes selecionadas para a espécie vegetal-alvo (Moreira & Siqueira, 2006).

Segundo Freire (1992), a alta diversidade genética dentro da população de rizóbio no ambiente natural é devida à rápida reprodução, variações e mutações, bem como aos processos naturais de transferência genética. O estudo da capacidade de sobrevivência ou persistência no solo é de primordial importância, especialmente para forrageiras perenes, ou anuais de ressemeadura natural, mas também para leguminosas anuais. É de importância ressaltar que esses estudos devem ser feitos em diversos estádios do crescimento da planta e a médio-longo prazo por vários cultivos, pois essas características podem se alterar com a variação ou mutação genética das estirpes oriundas de regiões ecologicamente distintas.

Em levantamento realizado em áreas previamente inoculadas e cultivadas com soja, no Brasil, foi constatado em alguns casos que diversas estirpes reisoladas não reagiram com nenhum sorogrupo conhecido, e em outros foi observada grande variabilidade morfológica, fisiológica e genética entre estirpes reisoladas após alguns anos de adaptação ao solo e às estirpes parentais inicialmente inoculadas. Uma hipótese seria de que essas observações podem estar relacionadas à transferência horizontal de genes, da estirpe inoculante para rizóbio não-simbiótico ou simbiótico do solo (Ferreira & Hungria, 2002). Em adição aos dados obtidos, Batista et. al. (2007) confirmam que a transferência horizontal de genes está ocorrendo em alta proporção nos solos brasileiros. A variabilidade detectada pode estar relacionada a diversos eventos, incluindo dispersão de estirpes, recombinação gênica e transferência horizontal de genes. Além disso, a variabilidade genética parece estar associada à adaptação, à capacidade saprofítica e à competitividade das estirpes inoculantes e não com a efetividade simbiótica (Batista et al., 2007).

1.2 Fatores genéticos da bactéria e da planta: a competição e a sobrevivência da bactéria no solo e na planta podem ser influenciadas pela expressão de genes

Os sinais moleculares excretados pelas raízes da planta hospedeira ativam a expressão dos genes de nodulação pelo rizóbio, resultando na produção de fatores Nod (Sugawara et al., 2006). Além disso, têm-se verificado sinais hormonais da planta (sinais endógenos) que também são importantes para o estabelecimento da simbiose (Hirsch et al., 1997). Os fatores Nod estão envolvidos na resposta da planta hospedeira na despolarização da membrana, deformação do pêlo radicular, pré-infecção e iniciação dos primórdios nodulares. Dessa forma, o processo de infecção em que o rizóbio entra em contato com as raízes da planta e induz à formação do nódulo reprogramando o desenvolvimento da célula cortical, é dependente de fatores Nod e resulta no encurvamento do pêlo radicular.

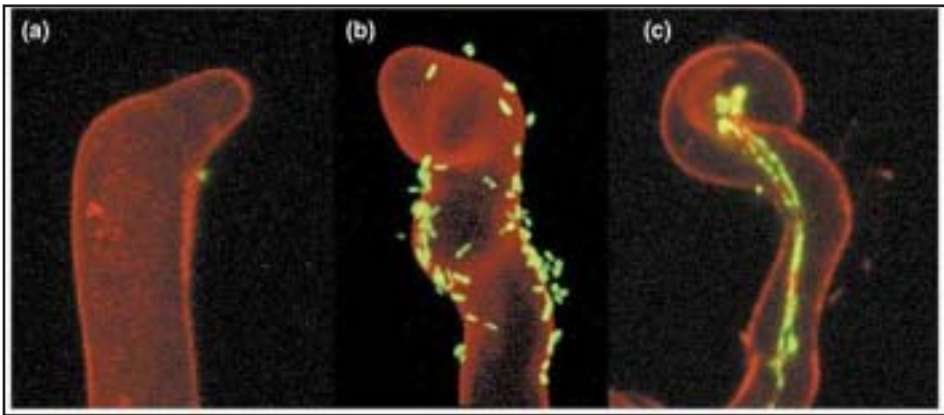


Figura 1: Resposta morfológica do pêlo radicular da leguminosa em resposta à presença do rizóbio: a) típica deformação do pêlo radicular; b) pêlo radicular com a multiplicação do rizóbio; c) pêlo radicular infectado com rizóbio (adaptado de Limpens & Bisseling, 2003).

Os fatores Nod são responsáveis, em baixa concentração, pela síntese de proteínas denominadas nodulinas, que desempenham papel importante na formação e manutenção do nódulo radicular (Almaraz et

al., 2007). Os fatores Nod caracterizam-se por lipooligossacarídeos N-acilados (N-acyl), cuja cadeia é importante para determinar a especificidade do rizóbio ao hospedeiro e os flavonóides liberados pela planta induzem à transcrição dos genes NodABC responsáveis pela síntese do N-acyl (Debellé et al., 2001). Além disso, há ainda a presença de genes NodD, do rizóbio, que são responsáveis pelo início da simbiose com a leguminosa e esta ocorre pelos efeitos indutores dos exsudatos da planta leguminosa específica (Cooper, 2004).

Por outro lado, muito se conhece sobre genes nos rizóbios envolvidos na nodulação (Nod), enquanto pouco se sabe sobre os genes das leguminosas hospedeiras relacionados à simbiose. Nesse sentido, trabalhos recentes têm buscado identificar genes da planta envolvidos na nodulação (Santos et al., 2006; Buzas & Gresshoff, 2007). Silverstein et al. (2006) encontraram novas famílias de genes em leguminosas, denominados proteínas ricas em glicina (GRP), prolina (PRP) e cisteína (CRP) envolvidos principalmente na nodulação e proteção dos nódulos. Recentemente, Kuster et al. (2007) identificaram cerca de 100 genes das leguminosas que ativam diferentes estádios durante a simbiose com o rizóbio com funções relacionadas à eficiência simbiótica, dentre elas a facilitação dos processos de transporte pelas membranas perisimbióticas que cercam os bacteróides nos nódulos.

Estudos também têm demonstrado que a expressão de genes envolvidos nos mecanismos de interação planta-microrganismo pode ser controlada por um sistema regulatório denominado sensoriamento populacional (do inglês *quorum sensing*) (Daniels et al., 2001). Por meio desse sistema, as bactérias controlam uma ampla classe de características como: inibição do crescimento, nodulação, transferência de plasmídeos, secreção de enzimas envolvidas na patogenicidade, produção de antibióticos e produção de vários metabólitos secundários (Brelles-Mariño & Bedmar, 2001). Assim, a competição e a sobrevivência da bactéria no solo e na planta podem ser influenciadas pela expressão de genes controlados pelo sensoriamento populacional. Em bactérias Gram-negativas, o sensoriamento populacional envolve geralmente duas proteínas: uma proteína tipo LuxI e uma proteína

regulatória, membro da família LuxR. As proteínas homólogas à LuxI são AHL sintases que utilizam Sadenosimetionina e proteínas carreadoras de grupos acil (acil-ACP) para sintetizar moléculas de *N*-acil homoserina lactonas (AHLs) (Swift et al., 1996). Apesar de todos os avanços no conhecimento da comunicação bacteriana mediada por AHLs, nossa compreensão desses mecanismos ainda é limitado (Lithgrow et al., 2000).

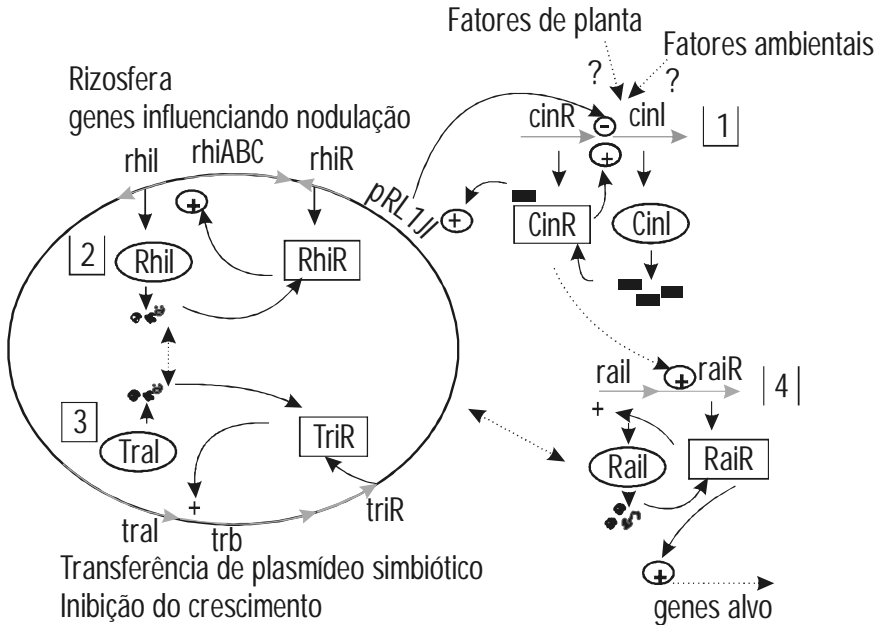


Figura 2: Sensoriamento populacional em *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae*

(1) A proteína CinR induz à expressão do gene *cinI*, permitindo a síntese de 3-OH-C14:1-HSL. Esta molécula junto com CinR ativa *cinI*. (2) 3-OH-C14:1-HSL influencia a expressão do gene plasmidial *rhlI*, que codifica uma AHL sintase. (3) A expressão de *tral*, também induzida por 3-OH-C14:1-HSL, leva à produção de diferentes AHLs que, juntas com o produto do gene *traR*, permitem a expressão dos genes *tra*. (4) A proteína Rail produz diferentes moléculas de AHLs. Os genes regulados por RaiR ainda não foram identificados. Indicam moléculas de AHLs; Indicam 3-OH-C14-HSL; Indicam uma regulação já demonstrada; Indicam uma provável regulação. Indicam uma possível comunicação cruzada entre os sistemas regulatórios (Wisniewski-Dyé & Downie, 2002).

1.3 Antagonismo microbiano

A nodulação e a fixação do N₂ podem ser influenciadas pela interação do rizóbio com as demais populações microbianas do solo, especialmente na rizosfera onde as atividades biológicas são intensas. Por outro lado, os rizóbios podem ser influenciados pelo amensalismo

produzido por diversas populações na comunidade microbiana. Entre esses se destacam as bactérias filamentosas, conhecidas produtoras de vários metabólitos secundários, principalmente antibióticos. Dessa maneira, as interações microbianas benéficas e/ou antagônicas às populações de rizóbios no solo são determinantes da eficiência da simbiose. Vários microrganismos presentes na comunidade microbiana do solo são antagônicos ou parasitas ao rizóbio e seu efeito principal está na alteração do tamanho e composição da população microbiana, a qual pode resultar uma vantagem numérica para certas estirpes ou grupos de rizóbios, podendo levar a uma alteração na ocupação nodular (Xavier et al., 2006).

Tanto na predação como no parasitismo o predador explora o outro organismo como fonte de nutriente. A capacidade de colonizar outros microrganismos vivos e aproveitá-los como fonte de nutriente é bastante comum no mundo dos micróbios e pode ser observada em vários grupos taxonômicos. Os predadores dispõem de vários mecanismos que lhes permitem ingerir as bactérias. As células bacterianas são digeridas intracelularmente por enzimas dos protozoários até liberar os compostos assimiláveis para o predador (Drozdowicz, 1991). O parasitismo microbiano pode ser citado pela predação sobre a população do rizóbio no solo exercido por protozoários, um dos mais importantes grupos de organismos do solo que interagem com o rizóbio e por *Bdellovibrio* (Keya & Alexandre, 1975).

O problema no estabelecimento do rizóbio em alguns solos tem sido atribuído à predominância desses microrganismos antagônicos. Em relação às pragas, as larvas de *Cerotoma arcuatus* Olivier (Coleóptera: Chrysomelidae) causam diversos danos, as fêmeas colocam os ovos próximos às plantas e, após a eclosão, passam por três instares. As larvas alimentam-se de raízes e nódulos nitrificadores, limitando a fixação do N₂ em até 45% (Layton & Boethel, 1987), enquanto as formas adultas alimentam-se das folhas, principalmente de soja e feijoeiro (Franco & Neves, 1992).

No Brasil, esse inseto tem sido observado com frequência na região Centro-Oeste e o seu controle é dificultado pela falta de conheci-

mento de sua bioecologia e do real dano causado. Os dados obtidos por Nava et al. (2003) revelam a importância dos danos diretos causados pelas larvas de *C. arcuatus* no sistema radicular e seus reflexos na parte aérea das plantas de soja. Além de danos diretos causados pela alimentação das larvas, as plantas, provavelmente, sofreram danos indiretos, como a diminuição da assimilação do N₂, já que os nódulos foram drasticamente reduzidos com o aumento da densidade larval.

Obviamente, os fenômenos de antagonismo não se restringem aos patógenos. Como exemplo, observa-se que o rizóbio está sujeito a tais ações durante o processo de sua multiplicação na rizosfera da planta hospedeira. Já observou-se nodulação deficiente de leguminosa devido ao baixo potencial de inóculo de *Rhizobium*, causado pelo parasitismo de bacteriófagos ou de *Bdellovibrio*, pela predação de protozoários ou pela produção de antibióticos por actinomicetos, cujas populações multiplicaram-se intensivamente após a calagem do solo (Cardoso & Freitas, 1992).

2 FATORES ABIÓTICOS À FIXAÇÃO DE N₂

Os principais fatores abióticos que interferem nas diferentes etapas da nodulação e na eficiência simbiótica são: pH, temperatura, deficiência de nutrientes, metais pesados, luminosidade, estresse hídrico e osmótico.

2.1 Efeito do pH, temperatura, deficiência de nutrientes e metais pesados

Dentre os fatores abióticos que afetam a fixação biológica de nitrogênio (FBN), o pH do solo e a temperatura são de extrema importância. Ambos os fatores apresentam efeitos mais apropriadamente descritos como síndromes, visto que não são caracterizados por apenas um efeito e sua discussão algo mais complicada em função de exercerem diferentes efeitos sob diferentes condições.

Desse modo, o pH do solo afeta a simbiose tanto se for abaixo do desejável quanto acima, de formas distintas nos dois casos, e com grande variação de espécie para espécie (Yang et al., 2001; Hara & Oliveira, 2004; Howieson & Ballard, 2004; Bala & Giller, 2006 e Shamseldin, 2007). Como nas zonas tropicais úmidas o principal problema costuma ser a acidez do solo (Date, 2000; Hungria & Vargas, 2000; Hungria et al., 2003), a discussão do efeito do pH do solo se concentrará nesse aspecto. A acidez do solo afeta em particular aspectos nutricionais, como menores teores de fósforo, cálcio e magnésio, bem como teores excessivos de alumínio e manganês. Ao mesmo tempo, alguns efeitos secundários têm grande importância, em particular a redução no desenvolvimento radicular em função da toxidez por alumínio. Essa redução afeta a absorção de nutrientes e água, tornando as plantas também mais suscetíveis a veranicos durante o desenvolvimento da cultura.

Como o efeito da acidez do solo é mais importante nas plantas dependentes da FBN que naquelas que recebem fertilizante nitrogenado ou orgânico (Correa et al., 2001; Appunu & Dhar, 2006; Lapinskas, 2007), observa-se claramente que a simbiose é mais afetada ainda que o desenvolvimento vegetal *per se*.

Esse efeito ocorre no microssimbionte em vida livre (Boddey et al., 1997; Andrade et al., 2002; Deka et al., 2006), na troca de sinais e nodulação (Duzan et al., 2004) e na FBN por aqueles nódulos que forem formados (Boddey et al., 1997; España et al., 2006) de forma cumulativa.

Quanto à bactéria isoladamente, os efeitos mais comumente relatados referem-se à redução na população rizobiana, combinada muito freqüentemente com a redução na eficiência das bactérias remanescentes, nos dois casos com grande variação inter e intraespecífica.

Um número bastante razoável de trabalhos tem sido conduzido procurando avaliar o efeito de solos ácidos sobre a população rizobiana, em particular na Austrália (Date, 2000; Cheng et al., 2002; Howieson & Ballard, 2005), e no Brasil (Martins et al., 1997; Neves & Rumjanek, 1997; Stamford & da Silva, 2000; Andrade et al., 2002; Hungria et al.,

2003; Moreira, 2006; Grange et al., 2007), embora trabalhos possam ser encontrados nas mais diversas partes do mundo (Deka et al., 2006; Brígido et al., 2007; Annapurna et al., 2007). Esses efeitos tendem a se concentrar em uma forte redução da sobrevivência, com conseqüente redução da população bacteriana, combinada com maior instabilidade genética, freqüentemente ligada à redução da eficiência das estirpes encontradas quanto à fixação biológica de nitrogênio. No entanto, a adaptação das populações nativas a essas condições pode ser usada como fonte de estirpes adequadas ao uso para produção de inoculante destinado ao uso em solos ácidos.

Avaliando o efeito da acidez sobre estirpes em meio de cultura, a primeira observação clara é a grande variabilidade encontrada entre estirpes (Hara & Oliveira, 2004; Brígido et al., 2007). Além disto, encontra-se freqüentemente uma ligação entre a produção de goma pela estirpe com maior tolerância a condições de pH mais baixo, aparentemente por contribuir para a manutenção da estabilidade do pH citoplasmático da bactéria (Watkin et al., 2003). Outra característica encontrada com muita freqüência é redução no efeito de acidez na presença de níveis mais altos de cálcio na solução nutritiva, até 100 vezes acima do usualmente encontrado em meio de cultura, nesse caso pela contribuição do cálcio para a manutenção da integridade da parede celular (Glenn et al., 1999). Apesar de trabalhos avaliando o efeito do fornecimento de cálcio sob condições de campo, exceto através da calagem – conseqüências sobre a acidez – é possível que o fornecimento de cálcio contribua para reduzir os efeitos da acidez do solo sobre a população rizobiana de forma similar à encontrada em solução nutritiva (Owino-Gerroh et al., 2005).

Outro efeito reconhecido da acidez do solo é a redução na disponibilidade de fósforo, que costuma atuar na simbiose principalmente por meio do componente vegetal, mas que pode também atuar por meio da bactéria (Owino-Gerroh et al., 2005). Nesse caso, estirpes que apresentem capacidade de solubilização de fosfatos de ferro e/ou de alumínio podem apresentar maior potencial para uso na inoculação

(Alkikhani et al., 2006), bem como potencialmente maior sobrevivência no solo entre os ciclos de cultivo.

Apesar do efeito marcante da acidez do solo sobre a população rizobiana isoladamente, esse é apenas o primeiro passo do efeito sobre a simbiose. Mesmo em situações com população rizobiana adequada em número e eficiência, existem vários relatos indicando que a troca de sinais é fortemente impactada, tanto em termos qualitativos quanto quantitativos, e com isso a formação de nódulos é bastante reduzida em solos ácidos (Cheng et al., 2002; Soto et al., 2004). Esses relatos foram observados em diversas culturas, e, em alguns casos, podem ter seu efeito reduzido pela adição de flavonóides, confirmando que a troca de sinais entre os parceiros simbióticos é o ponto principal impactado nessa situação.

Com relação à função nodular, outro efeito encontrado em alguns trabalhos, que pode ser utilizado como indicador de estresse ambiental, é um forte aumento na produção de poliaminas, como putrescina, embora nesse caso a variação dentro de um mesmo trabalho seja bastante grande, e o número de trabalhos relativamente pequeno para permitir conclusões mais claras (Fujihara 199353574/id). A toxicidade dos metais Cu, Cd e Zn (tanto para rizóbios de solo tropical temperados como tropicais) decresce nessa ordem e, entre os gêneros de rizóbio, *Bradyrhizobium* é o mais tolerante, e *Azorhizobium* o menos. *Rhizobium*, *Sinorhizobium* e *Mesorhizobium* têm tolerância intermediária entre esses dois (Matsuda et al., 2002).

2.2 Efeito da luminosidade

A luminosidade tem efeitos diretos e indiretos sobre o processo de nodulação e FBN em leguminosas. A luz exerce efeito direto sobre o processo de nodulação, devido principalmente à modificação na permeabilidade da membrana do pêlo radicular, processo controlado pelo fitocromo, que pode inibir o processo de infecção bacteriana. Além disso, durante a exposição das raízes à luz ocorre a indução de biossíntese de etileno resultando em formação de pontes citoplasmáticas

inibindo o processo de nodulação (van Spronsen et al., 2001). O etileno é um dos responsáveis pelo controle da nodulação em leguminosas e inibe o aumento no número de nódulos (Okasaki et al., 2004).

O efeito indireto da luminosidade sobre a FBN deve-se à fotossíntese e, conseqüentemente, ao suprimento de carboidratos para o crescimento e funcionamento dos nódulos. A luz fornecida à parte aérea da planta impulsiona o processo de FBN nos nódulos como conseqüência do carbono fornecido pela planta hospedeira. A energia para a FBN é suprida inicialmente na forma de ácidos dicarboxílicos (principalmente malato e succinato), que são levados aos bacteróides e são derivados da atividade da fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPcarboxilase), proporcionando uma fonte de carbono e energia para a atividade da nitrogenase na conversão do nitrogênio em amônia (Garg & Singla, 2004).

O aumento da taxa fotossintética proporcionada pela luz ocasiona um aumento na biomassa do sistema radicular, e o excesso de carbono fixado pela planta pode ser exsudado pelas raízes ocasionando estimulação da atividade microbiana na rizosfera e aumentando a nodulação. Da mesma forma, o aumento na disponibilidade de CO₂ atmosférico ocasiona um incrementando na fotossíntese, e também tem proporcionado benefícios à nodulação, pela acumulação de malato, como fonte de carbono para a bactéria, e malonato, essencial para o desenvolvimento dos nódulos. Além disso, há ainda aumento no número e massa dos nódulos, incremento no conteúdo de leghemoglobina e liberação de genes indutores de nodulação sob condições de elevada disponibilidade de CO₂ (Haase et al., 2007).

Por um lado, a disponibilização de carbono adicional, via aumento da fotossíntese, proporciona aumento nas taxas de FBN e mantém a relação C/N na planta em condições adequadas (Torbert et al., 2004). Por outro lado, quando a capacidade fotossintética da planta é prejudicada, ocorre a falta de fotoassimilados (carbono) para os nódulos, diminuindo a relação C/N e induzindo a senescência nodular (Schulze, 2003).

2.3 Efeito da umidade do solo e do estresse osmótico

As flutuações osmóticas associadas aos períodos de déficit hídrico resultam em diminuição da sobrevivência das populações de rizóbio no solo ou redução no seu crescimento (Saxena & Rewari, 1992).

As estirpes de rizóbio apresentam diferentes níveis de tolerância ao estresse osmótico, muitas são inibidas por concentrações salinas de 100 mM e outras toleram até 500 mM de NaCl (Graham, 1992). Serraj et al. (1998) observaram que a exposição de raízes noduladas de soja, alfafa e feijão (*Phaseolus vulgaris*) a um estresse de 100 mM de NaCl resultou em uma inibição do crescimento nodular e da atividade da nitrogenase (N₂ase). A maior sensibilidade do feijão foi associada a um maior acúmulo de sais nos nódulos e a uma pequena diferença na resposta da atividade de redução de acetileno a aumentos na pressão de O₂ na rizosfera. Essa menor resposta ao oxigênio implica um efeito deletério na barreira a difusão de oxigênio nos nódulos.

Nóbrega et al. (2004), ao estudarem a tolerância das estirpes de rizóbio à salinidade, constataram que a UFLA 3-84 destacou-se entre as outras estirpes como altamente tolerante à salinidade, pois cresceu em meio de cultura contendo até 30g.L⁻¹ NaCl (Moreira & Siqueira, 2006).

A simbiose com rizóbios é afetada de forma deletéria tanto em solos salinos como em solos sódicos, desde a proliferação do rizóbio na rizosfera, à infecção da raiz e ao funcionamento do nódulo. Comparando-se a sensibilidade da bactéria e da planta, foi demonstrado que as bactérias conseguem sobreviver em níveis salinos inibitórios para o hospedeiro. Porém, existem problemas para a simbiose, uma vez que tem sido constatada diminuição na sobrevivência, sendo a nodulação muito mais sensível às condições de salinidade que o sistema radicular na soja (Tsai et al., 1992). Sprent (1981) relata que as leguminosas e o processo de iniciação nodular são mais afetados pelo estresse osmótico e hídrico que o rizóbio.

Em relação ao estresse hídrico, um número bastante razoável de trabalhos tem sido conduzido procurando avaliar o efeito do estresse

sobre a população rizobiana (Sprent, 1981; Serraj et al., 1999, 2001; Sinclair et al., 2001; Silveira et al., 2003; Ramos et al., 2003; Figueiredo et al., 1998, 2007).

Silveira et al. (2003), em estudos com caupi (*Vigna unguiculata* L.), a fim de esclarecerem os mecanismos relacionados com a capacidade dos nódulos para fixar N₂ submetendo as plantas a um estresse hídrico progressivo seguindo de reidratação, verificaram que houve uma diminuição na matéria seca das folhas e dos nódulos e na concentração de ureídos na seiva do xilema e um estímulo no crescimento das raízes. Os nódulos submetidos ao estresse hídrico apresentaram um acúmulo significativo de carboidratos solúveis, junto a um aumento na concentração de ureídos, aminoácidos totais e prolina, diminuindo levemente a concentração de leghemoglobina.

Figueiredo et al. (2007) (Figura 3), estudando a resposta do estresse hídrico no caupi nos diferentes estádios da nodulação, verificaram que o efeito do estresse hídrico foi mais prejudicial às plantas de caupi quando aplicado no estágio P₂ (15-30 dias).

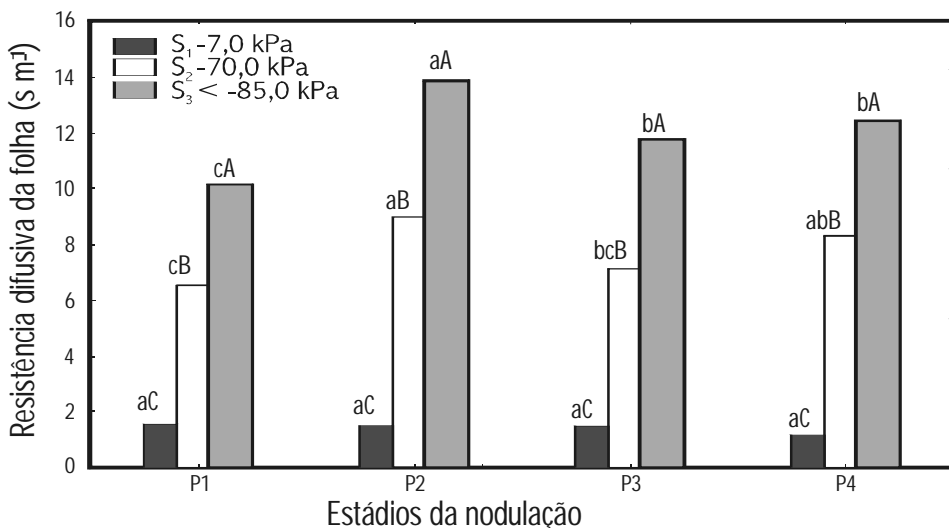


Figura 3: Resistência difusiva da folha do caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp., cv. IPA205), medidas nos diferentes estádios de nodulação (P₁ = 0-15 d, P₂ = 15-30 d, P₃ = 20-35 d e P₄ = 30-45 d), em diferentes níveis de estresse hídrico (S₁ = -7,0 kPa (controle), S₂ = -70,0 kPa and S₃ < -85,0 kPa).

As médias seguidas por letras minúscula (P₁ a P₄) e letra maiúscula (S₁ a S₃) não diferem estatisticamente (p < 0,05) pelo teste de Tukey's HSD.

É importante relatar que o excesso de umidade também inibe a nodulação e FBN, pois, segundo Chung-Ta Liao (2001), a composição e quantidade de proteínas e aminoácidos e as atividades de certas enzimas são importantes. Em particular o nitrato redutase e a glutamina sintetase, as duas enzimas-chave na redução do nitrato e assimilação de amônia que influenciam o balanço de nitrogênio e são drasticamente afetadas por este tipo de estresse.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os avanços no conhecimento são essenciais para a elucidação dos fatores bióticos e abióticos que interferem na FBN, um processo com elevado potencial de aplicação na agricultura que tem sido alvo de pesquisa no Brasil e no mundo.

É primordial garantir que as novas estirpes e cultivares estabeleçam simbioses altamente eficazes sendo necessário investir em biotecnologia não só com ênfase na genômica e proteômica, mas ao mesmo tempo dar continuidade ao desenvolvimento e validação de formulações alternativas e/ou processo inovador para otimizar a tecnologia da inoculação e obter insumos biológicos que possam promover grande saltos qualitativos na agricultura.

Por outro lado, muito se conhece sobre genes nos rizóbios envolvidos na nodulação (Nod), enquanto pouco se sabe sobre os genes das leguminosas hospedeiras relacionados à simbiose. Estudos direcionados na obtenção de hospedeiros e de estirpes capazes de tolerar condições adversas desses fatores devem ser alvo de pesquisa, corrigindo deficiências dos demais nutrientes e adequando espécies às condições edafopedoclimáticas, visando a um aproveitamento maior da FBN nos sistemas agrícolas e, conseqüentemente, aumento na produtividade.

REFERÊNCIAS

- Aguilar JMM et al. 1988 Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* towards flavonoids inducers of the symbiotic nodulation genes. *J. Gen. Microbiol.* 134, p. 2741-2746.
- Alikihani HA, Saleh-Rastin N & Antoun H 2006 Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. *Plant Soil* 287, p. 35-41.
- Almaraz JJ, Zhou X, Souleimanov A & Smith D 2007 Gas exchange characteristics and dry matter accumulation of soybean treated with Nod factors. *J. Plant Physiol.* (In press, available on line).
- Andrade DS, Murphy PJ & Giller KE 2002 The diversity of *Phaseolus*-Nodulating rhizobial populations is altered by liming of acid soils planted with *Phaseolus vulgaris* L. in Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, p. 4025-4034.
- Annapurna K, Balakrishnan N & Vital L 2007 Verification and rapid identification of soybean rhizobia in Indian soils. *Curr. Microbiol.* 54, p. 287-291.
- Antón MR de F 2004 Interacciones microorganismos-suelo-planta en la preservación del Medio Ambiente y la Salud An. R. *Acad. Nac. Farm.* 70, p. 743-776.
- Appunu C & Dhar B 2006 Symbiotic effectiveness of acid-tolerant *Bradyrhizobium* strains with soybean in low pH soil. *African J. Biotechnol.* 5, p. 842-845.
- Araújo FF de 1995 Efeito de *Bacillus* spp. e seus metabólitos na competitividade e na nodulação da soja (*Glycine Max* L. *Merril*) por *Bradyrhizobium* spp. 111p. (Mestrado em Microbiologia) Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.
- Araújo RS 1994 Fixação biológica do nitrogênio em feijão. In: Araújo RS, Hungria M, eds. *Microorganismos de importância agrícola*, p. 91-120.
- Bala A & Giller KE 2006 Relationships between rhizobial diversity and host legume nodulation and nitrogen fixation in tropical ecosystems. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 76, p. 319-330.
- Batista JSS, Hungria M, Barcellos FG, Ferreira MCF & Mendes IC 2007 Variability in *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* seven years after introduction of both the exotic microsymbiont and the soybean host in a Cerrados soil. *Microbial Ecol.* 53, p. 270-284.
- Benizri E, Baudoin E & Guckert A 2001 Root colonization by inoculated plant growth promoting rhizobacteria. *Biocontrol Sci. Technol.* 11, p. 557-574.
- Boddey RM, Sá JC, Alves BJ & Urquiaga S 1997 The contribution of biological nitrogen fixation for sustainable agricultural systems in the tropics. *Soil Biol. Biochem.* 29, p. 787-799.
- Brelles-Mariño G & Bedmar EJ 2001 *Bradyrhizobium japonicum* produces sensorial population signal molecules, *Abstract S7-P8*. 4th. *European Nitrogen Fixation Conference*, Seville, Spain.

- Brígido C, Alexandre A, Laranjo M & Oliveira S 2007 Moderately acidophilic mesorhizobia isolated from chickpea. *Letters Appl. Microbiol.* 44, p. 168-174.
- Brockwell J, Gault RR, Herridge DF, Morthorpe LJ & Roughley RJ 1988 Studies on alternative means of legume inoculation: Microbial and agronomic appraisals of commercial procedures for inoculating soybeans with *Bradyrhizobium japonicum*. *Aust. J. Agric. Res.* 39, p. 965-972.
- Buzas DM & Gresshoff PM 2007 Short- and long-distance control of root development by *LjHAR1* during the juvenile stage of *Lotus japonicus*. *J. Plant Physiol.* 164, p. 452-459.
- Cardoso E & Freitas SS 1992 A rizosfera. In: Cardoso EJBN; Tsai SM & Neves MCP ed. *Microbiologia do solo*. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciências do solo, p. 42-57.
- Cheng Y, Watkin ELJ, O'hara GW & Howieson JG 2002 *Medicago sativa* and *M. murex* differ in the nodulation response to soil acidity. *Plant Soil* 238, p. 31-39.
- Cooper, JE 2004 Multiple Responses of Rhizobia to Flavonoids During Legume Root Infection. *Adv. Bot. Res.* 41, p. 1-62.
- Correa OS, Aranda A & Barneix AJ 2001 Effects of pH on growth and nodulation of two forage legumes. *J. Plant Nutrition* 24, p. 1367-1375.
- Dakora FD 2003 Defining new roles for plant and rhizobial molecules in sole and mixed plant cultures involving symbiotic legumes. *New Phytologist* 158, p. 39-49.
- Daniels R, De Vos DE, Desair J, Raedschelderst G, Luyten E, Rosemeyer V, Verreth C, Schoeters E, Vanderleyden J & Michels J 2001 The *cin* quorum sensing locus of *Rhizobium etli* CNPAF512 affects growth and symbiotic nitrogen fixation. *J. Biol. Chem.* 277, p. 462-468.
- Date RA 2000 Inoculated legumes in cropping systems of the tropics. *Field Crop. Res.* 65, p. 123-136.
- Debellé F, Moulin L, Mangin B, Dénarié J & Boivin C 2001 Nod genes and Nod signals and the evolution of the *Rhizobium* legume symbiosis. *Acta Biochimica Polonesa* 48, p. 359-365.
- Deka AK, Azad P & Patra SC 2006 Survival of *Rhizobium* in soil at different pH, temperature and moisture levels. *Ecol. Environ. Cons.* 12, p. 751-754.
- Drozdowicz AG 1991 Microbiologia do solo. In: Roitman I; Travassos LR; Azevedo JL. *Tratado de microbiologia*, v. 2, p. 19-58.
- Duhan JS & Dudeja SS 1999 Competitiveness does not correlate with siderophore production in *Rhizobium-Cajanus cajan*. *Simbiosis* 26, p. 79-87.
- Duzan HM, Zhou X, Souleimanov A & Smith DL 2004 Perception of *Bradyrhizobium japonicum* Nod factor by soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] root hairs under abiotic stress conditions. *J. Exp. Bot.* 55, p. 2641-2646.
- España M, Cabrera-Bisbal E & López M 2006 Study of nitrogen fixation by tropical legumes in acid soil from Venezuelan savannas using ¹⁵N. *Interciencia* 31, p. 197-201.

Ferreira MC & Hungria MC 2002 Recovery of soybean inoculant strains from uncropped soils in Brazil. *Field Crops Research*, Amsterdam, 79, p. 139-152.

Figueiredo MVB, Burity HA, Martinez CR & Chanway CP 2007 Drought stress response on some key enzymes of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) nodule metabolism. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23, p. 187-193.

Figueiredo MVB, Vilar JJ, Burity HA & de França FP 1998 Alleviation of water stress effects in cowpea by *Bradyrhizobium* spp. inoculation. *Plant Soil* 207, p. 67-75.

Franco AV & Neves MCP 1992 Fatores limitantes à fixação biológica de nitrogênio In: Cardoso, EJBN; Tsai, SM & Neves, MCP ed. *Microbiologia do solo*. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciências do solo, p. 42-57.

Freire JRJ 1992 Fixação do nitrogênio pela simbiose rizóbio/leguminosaa. In: Cardoso EJBN, Tsai SM & Neves MCP ed. *Microbiologia do solo*. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciências do solo, p. 121-140.

Garg N & Singla R 2004 Growth, photosynthesis, nodule nitrogen and carbon fixation in the chickpea cultivars under salt stress, Brazilian *J. Plant Physiol.* 16, p. 137-146.

Glenn AR, Reeve WG, Tiwari RP & Dilworth MJ 1999 Acid tolerance in root nodule bacteria. *Novartis Foundation Symposium* 221, p. 112-126.

Graham PH 1992 Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, in nodulation under adverse soil conditions. *Can. J. Microbiol.* Ottawa, 38, p. 485-492.

Grange L, Hungria M, Graham PH & Martínez-Romero E 2007 New insights into the origins and evolution of rhizobia that nodulate common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Brazil. *Soil Biol. Biochem.* v. 39, p. 867-876.

Guerinot ML 1994 Microbial iron transport. *Ann. Rev. Microbiol.* 48, p. 734-772.

Haase S, Neumann G, Kania A, Kuzyakov Y, Romheld & Kandeler E 2007 Elevation of atmospheric CO₂ and N-nutritional status modify nodulation, nodule-carbon supply, and root exudation of *Phaseolus vulgaris* L. *Soil Biol. Biochem.* 39, p. 2208-2221.

Hara FAS & Oliveira LA 2004 Características fisiológicas e ecológicas de isolados de rizóbios oriundos de solos ácidos e álicos de Presidente Figueiredo, Amazonas. *Act. Amazonica*, v. 34, p. 343-357.

Hirsch AM, Fang Y, Asad S & Kapulnik Y 1997 The role of phytohormones in plant-microbe symbioses. *Plant Soil* 194, p. 171-184.

Howieson J & Ballard R 2005 Optimising the legume symbiosis in stressful and competitive environments within southern Australia - some contemporary thoughts. *Anonymous. Soil Biol. Biochem.* 36(8), p. 1261-1273.

Hungria M, Campo RJ & Mendes IC 2003 Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. *Biol. Fertil. Soils* 39, p. 88-93.

Hungria M & Vargas MAT 2000 Environmental factors impacting N₂ fixation in legumes grown in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crop. Res.* v. 65, p. 151-164.

- Jjemba PK & Alexander M 1999 Possible determinants of rhizosphere competence of bacteria. *Soil Biol. Biochem*, Oxford, 31, p. 623-632.
- Johnstone GR & Barbetti MJ 1987 *Impact of Fungal and Virus Diseases on Pasture*. East Melbourne, Australia: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization.
- Keya SO & Alexander M 1975 Regulation of parasitism by host density; the *Bdellovibrio-Rhizobium* interrelationship. *Soil Biol. Biochem*, Oxford, 7, p. 231-23.
- Kuster H, Vieweg MF, Manthey K, Baier MC, Hohnjec N & Perlick AM 2007 Identification and expression regulation of symbiotically activated legume genes. *Phytochemistry* 68, p. 8-18.
- Lapinskas EB 2007 The effect of acidity on the distribution and symbiotic efficiency of rhizobia in Lithuanian soils. *Eurasian Soil Sci.* 40, p. 419-425.
- Layton MB & Boethel DJ 1987 Reduction in N₂ fixation by soybean in response to insect-induced defoliation. *J. Economic Entomol.*, Lanham 80, p. 1319-1324.
- Limpens E & Bisseling T 2003 Signaling in symbiosis. *Curr. Plant Biol.* 6, p. 343-350.
- Lithgow JK, Wilkinson A, Hardman A, Rodelas B, Wisniewski-Dyé F, Williams P & Downie JA 2000 The regulatory locus *cinRI* in *Rhizobium leguminosarum* controls a network of sensorial and populational loci. *Mol. Microbiol.* 37, p. 81-97.
- Martins LMV, Neves MCP & Rumjanek NG 1997 Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil. *Soil Biol. Biochem.* 29, p. 1005-1010.
- Martins LMV, Rangel FW, Xavier GR, Ribeiro JRA, Morgado LB, Neves MCP & Rumjanek N 2003 Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. *Biol. Fertil. Soil* 38, p. 333-339.
- Matsuda A, Moreira FMS & Siqueira JO 2002 Tolerância de rizóbios de diferentes procedências ao zinco, cobre e cádmio. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 27, p. 343-355.
- McDermott TR & Graham PH 1989 *Bradyrhizobium japonicum* inoculant mobility, nodule occupancy, and Acetylene Reduction in the soybean root system. *Appl. Environ. Microbiol* 55, p. 2493-2498.
- Moreira FMS & Siqueira JO 2006 *Microbiologia e bioquímica do solo*. 2. ed. UFLA. 729p.
- Moreira FMS 2006 Nitrogen-fixing Leguminosae-nodulating bacteria. In: Moreira FMS, Siqueira JO, Brussaard L. Soil biodiversity in Amazonian and other Brazilian ecosystems. Wallingford: CAB International Publishing, p. 237-270.
- Nava DP, Haddad M de L & Parra JRP 2003 Danos causados por diferentes densidades de larvas de *Cerotoma arcuatus* em plantas de soja. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 38, p. 1217-1222.
- Nehl DB & Brown JF 1996 Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective. *Appl. Soil Ecol.* 5, p. 1-20.

Neves MCP & Rumjanek NG 1997 Diversity and adaptability of soybean and cowpea rhizobia in tropical soils. *Soil Biol. Biochem.* 29, p. 889-895.

Nóbrega RSA, Motta JS, Lacerda AM & Moreira FM de S 2004 Tolerância de bactérias diazotróficas simbióticas à salinidade *in vitro*. *Ciência e Agrotecnologia*, Larvas, 28 p. 899-905.

Oliveira LA & Graham PH 1990 Evaluation of strain competitiveness in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* using a nod⁺fix⁻ natural mutant. *Arch. Microbiol. Berlin* 153, p. 305-310.

Okazaki S, Nukui N, Sugawara M & Minamisawa K 2004 Rhizobial strategies to enhance symbiotic interaction: rhizobitoxine and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Microbes Environment*, v. 19, p. 99-111.

Owino-Gerroh C, Gascho GJ & Phatak SC 2005 Pigeonpea response to silicon, phosphorus, and *Rhizobium* inoculation in an acid coastal plain soil. *J. Plant Nutrition* 28, p. 797-804.

Ramos MLG, Parsons R, Sprent JI & James EK 2003 Effect of water stress on nitrogen fixation and nodule structure of common bean. *Pesq. Agropec. Bras.* 38, p. 339-347.

Reigh G & O'connell M 1993 Siderophore-mediated iron transport correlates with the presence of specific iron-regulated proteins in the membrane of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* p. 94-102.

Rumjanek NG, Martins LMV, Xavier GR & Neves MCP 2005 Fixação biológica de nitrogênio. In: Freire Filho FR; Lima JA de A; Ribeiro VQ (Ed.). Feijão: avanços tecnológicos. Brasília, DF: *Embrapa Informação Tecnológica*, p. 347-417.

Rumjanek NG, Gama AS & Triplett EW 1995 Bacteriocin production by *Bradyrhizobium* strains. In: *International Congress on Nitrogen Fixation*, 10, 1995. Saint-Petersburg, Russia. Abstracts. p. 433.

Santos MA, Nicolau MF & Hungria M 2006 Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja. *Pesq. Agropec. Bras.* 41, p. 67-75.

Saxena AK & Rewari RB 1992 Differential response of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Rhizobium* combinations to saline soil conditions. *Biol. Fertil. Soils*, Berlin, 13, p. 31-34.

Schulze, J. 2003 Source-sink manipulations suggest an N-feedback mechanism for the drop in N₂ fixation during pod-filling in pea and broad bean. *J. Plant Physiol.* 160, p. 531-537.

Serraj R & Sinclair TR 1998 N₂ fixation to drought in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Ann. Bot.* 82, p. 229-234.

Serraj R, Sinclair TR & Purcell LC 1999 Symbiotic N₂ fixation response to drought. *J. Exp. Bot.* 50, p. 143-155.

Serraj R, Vadez V & Sinclair TR 2001 Feedback regulation of symbiotic N₂ fixation under drought stress. *Agronomie* 2, p. 621-626.

- Shamseldin AAY 2007 Use of DNA marker to select well-adapted *Phaseolus*-symbionts strains under acid conditions and high temperature. *Biotechnol. Letter* 29, p. 37-44.
- Silveira JAG, Viegas RA, Figueiredo MVB, Oliveira JTA & Costa RCL 2003 N-compound accumulation and carbohydrate shortage on N₂ fixation in drought-stressed and rewatered cowpea plants. *Spanish J. Agric. Res.* 3, p. 65-76.
- Silverstein KAT, Graham MA & VandenBosch KA 2006 Novel paralogous gene families with potential function in legume nodules and seeds. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, p. 142-146.
- Sinclair TR, Purcell LC, Vadez V & Serraj R 2001 Selection of soybean (*Glycine max*) lines for increased tolerance of N₂ fixation to drying soil. *Agronomie* 21, p. 653-657.
- Singh BB, Chambliss OL, Sharma RNG, Gama SA & Triplett EW 1995 Bacteriocin production by *Bradyrhizobium* strains. In: *International Congress on Nitrogen Fixation*, 10, 1995, Saint-Petersburg, Russia. *Abstracts*, p. 433.
- Smith RS 1992 Legume inoculant formulation and application, *Can. J. Microbiol.* 38, p. 485-492.
- Soto MJ, Van Dillewijn P, Nez-Abarca F, Nez-Zurdo JI & Toro N 2004 Attachment to plant roots and nod gene expression are not affected by pH or calcium in the acid-tolerant alfalfa-nodulating bacteria *Rhizobium* sp. LPU83. *FEMS Microbiol. Ecol.* 48, p. 71-77.
- Sprent JI 1981 Nitrogen fixation. In *The physiology and biochemistry of drought resistance in plants*, p. 131-143, ed. Paleg LG & Aspinall D New York: Academic Press.
- Stamford NP & da Silva RA 2000 Efeito da calagem e inoculação de sabiá em solo da mata úmida e do semi-árido de Pernambuco. *Pesq. Agropec. Bras.* 35, p. 1037-1045.
- Straliotto R & Rumjanek NG 1999 Biodiversidade do rizóbio que nodula o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e os principais fatores que afetam a simbiose. *Seropédica: Embrapa Agrobiologia*, 51p. (Embrapa-CNPAB. Documentos, 94)
- Sugawara M, Okazaki S, Nukui N, Ezura H, Mitsui H & Minamisawa K 2006 Rhizobitoxine modulates plant-microbe interactions by ethylene inhibition. *Biotechnol. Adv.* 24, p. 382-388.
- Swift S, Throup JP, Williams P, Salmond GPC & Stewart GSAB 1996 Quorum sensing: a population-density component in the determination of bacterial phenotype. *Trends Biochem. Sci.* 21, p. 214-219.
- TaLiao C & Ho Lin C 2001 Physiological adaptation of crop plants to flooding stress. *Proc. Natl. Sci. Counc-ROC(B)* 25, p. 148-157.
- Thies JE, Singleton PW & Bohlool BB 1991 Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. *Appl. Environ. Microbiol.* Washington 57, p. 19-28.
- Torbert HA, Prior SA, Rogers HH & Runion GB 2004 Elevated atmospheric CO₂ effects on N fertilization in grain sorghum and soybean. *Field Crop. Res.* 88, p. 57-67.

Triplett EW 1990 The molecular genetics of nodulation competitiveness in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*. *Mol. Plant Microbe Interact.* Saint Paul 3, p. 199-206.

Tsai SM, Baraibar AVL & Romani VLM 1992 Efeitos de fatores do solo In: Cardoso EJBN; Tsai SM & Neves MCP ed. *Microbiologia do solo*. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, p. 42-57.

Van Spronsen PC, Grønlund M, Bras CP, Spaink HP & Kijne JW 2001 Cell Biological Changes of Outer Cortical Root Cells in Early Determinate Nodulation. *Mol.Plant Microorganism Interaction* 14, p. 839-847.

Wani SP, Rupela OP & Lee KK 1995 Sustainable agriculture in the semi-arid tropics through biological nitrogen fixation in grain legumes. *Plant Soil*, Dordrecht 174, p. 29-49.

Watkin ELJ, O'hara GW & Glenn AR 1997 Calcium and acid stress interact to affect the growth of *Rhizobium leguminosarum* bv *trifolii*. *Soil Biol. Biochem.* 29, p. 1427-1432.

Watkin ELJ, O'hara GW & Glenn AR 2003 Physiological responses to acid stress of an acid-soil tolerant and an acid-soil sensitive strain of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Soil Biol. Biochem.* 35, p. 621-624.

Wisniewski-Dyé F & Downie JA 2002 Quorum-sensing in *Rhizobium*. *FEMS Microbiological Review* 24, p. 487-506.

Xavier GR, Martins LMV, Ribeiro JR de A & Rumjanek NG 2006 Especificidade simbiótica entre rizóbios e acessos de feijão-caupi de diferentes nacionalidades. *Caatinga*, 19, p. 25-33.

Yang SS et al. 2001 Effect of pH and soybean cultivars on the quantitative analyses of soybean rhizobia populations. *J. Biotechnol.* 91, p. 243-255.

Yeoman KH et al. 2000 Analysis of the *Rhizobium leguminosarum* siderophore-uptake gene *fhuA*: differential expression in free-living bacteria and nitrogen-fixing bacteroids and distribution of an *fhuA* pseudogene in different strains. *Microbiology* 146, p. 829-837.