

## TOLERÂNCIA DE RIZÓBIO DE FEIJÃO-CAUPI À SALINIDADE E À TEMPERATURA EM CONDIÇÃO *IN VITRO*

*Gustavo Ribeiro Xavier*

Embrapa Agrobiologia. Rio de Janeiro-RJ. E-mail: cnpab.embrapa.br

*Lindete Míria Martins*

Professora Adjunta da Universidade do Estado da Bahia - Juazeiro-Ba E-mail: lmvmartins@uneb.br

*Norma Gouveia Rumjanek*

Embrapa Agrobiologia. Rio de Janeiro-RJ. E-mail: norma@embrapa.br

*Maria Cristina Prata Neves*

Embrapa Agrobiologia. Rio de Janeiro-RJ. E-mail: mcpneves@cnpab.embrapa.br

**RESUMO** – A seleção de estirpes de rizóbio tolerantes a estresses de salinidade e temperatura, característicos da região semi-árida, amplia as chances de sucesso para a introdução e estabelecimento de bactérias fixadoras do nitrogênio atmosférico em associação com o feijão-caupi, resultando no aumento da produtividade de grãos. Fatores como tolerância a diferentes concentrações de NaCl (1%, 2% e 3%) e dois níveis de temperatura elevada (39°C e 42°C) foram estudados em setenta e seis estirpes de rizóbio, isoladas de nódulos de feijão-caupi, com o objetivo de identificar as relações com a região de origem e hábito de crescimento em meio de cultura YEM sólido. De modo geral, observou-se que as estirpes provenientes do Sertão se mostraram mais tolerantes a temperaturas elevadas. O estudo dos efeitos da salinidade (NaCl), por outro lado, mostrou que à medida que a concentração do sal aumenta há uma redução na porcentagem de estirpes tolerantes, sendo que cerca de 40% delas foram capazes de crescer em meio de cultura contendo 1% de NaCl. Na concentração de 2% de NaCl, 17% do total foram capazes de crescer, sendo que 15% eram provenientes do Sertão e 24% da Zona da Mata. Entretanto, na concentração de 3% de NaCl, apenas 12% das estirpes testadas foram capazes de crescer. Cerca de 10% das setenta e seis estirpes mostraram-se tolerantes às altas temperaturas e aos níveis de NaCl testados, sendo uma oriunda do Agreste, quatro do Sertão e duas da Zona da Mata.

**Palavras-chave:** *Vigna unguiculata*, FBN, NaCl, estresse.

## TOLERANCE OF COWPEA RHIZOBIUM TO SALINITY AND HIGH TEMPERATURE UNDER *IN VITRO* CONDITION

**ABSTRACT** – The selection of rhizobium strains tolerant to salinity and temperature stress, typically of semi-arid regions, enhances the chance for introducing and establishing the air nitrogen fixing bacteria and cowpea association successfully, resulting in grain yield increases. Effects of factors, such as tolerance to different NaCl concentrations (1%, 2% and 3%) and two levels of high temperature (39° C and 42° C). were studied on seventy-six rhizobium strains isolated from cowpea root nodules in order to identify the relation to the origin region and their growth habit in YEM solid culture medium. In general, it was observed that bacteria from the “Sertão” region were more tolerant to high temperatures. On the other hand, results for the salinity study showed that as the salt concentration increased, the percentage of tolerant strains decreased. About 40% of the strains were able to grow in a culture medium with 1% of NaCl. At 2% of NaCl concentration, 17% of the total strains could grow and, from this amount, 15% came from the “Sertão” region and 24% from “Zona da Mata” region. At 3% NaCl concentration, only 12% of the strains were able to grow. From the 76 strains, around 10% were tolerant to high temperatures and to the NaCl levels used, one of them from the “Agreste” region, four from the “Sertão” region and 2 from the “Zona da Mata” region”.

**Key words:** *Vigna unguiculata*, BNF, NaCl, estress.

### INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de tecnologias e conhecimentos que favoreçam a atividade agrícola em solos salinos ou afetados pela salinização decorrente de ações antrópicas é um dos desafios à segurança alimentar de grandes contingentes po-

pulacionais em escala planetária, em especial nas zonas áridas e semi-áridas. Este problema atinge cerca de 45 dos 230 milhões de hectares da área irrigada em toda a Terra (FAO, 2000), e mantém tendência de expansão com o abandono anual de aproximadamente 10 milhões de hectares sob o

efeito da salinização e processos decorrentes.

No semi-árido brasileiro, a salinidade alcança cerca de 20% dos 95 milhões de hectares (Melo et al., 2006). Nas áreas irrigadas desta região – 300 mil ha – o problema já está presente em 25% da área (Goes, 1977). Caracterizado por baixa precipitação pluviométrica, estiagens prolongadas, altas temperaturas e, muitas vezes, baixa fertilidade do solo, o Semi-árido do Brasil concentra a população com menor Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) do país.

Nesta região, o feijão-caupi ou feijão de corda (*Vigna unguiculata* (L.) Walp), uma leguminosa com alto teor de proteínas no grão, representa um recurso importante por ser uma planta capaz de resistir às condições de déficit hídrico, salinidade e temperatura. Tradicionalmente, é uma cultura de subsistência, cultivada por pequenos e médios agricultores de base familiar, cujo excedente de produção é comercializado em feiras livres como feijão-verde. No entanto, a cultura do feijão-caupi tem avançado para áreas mais tecnificadas, utilizando práticas de correção, fertilização e irrigação, em rotação com outras culturas (Freire Filho, et al., 2005).

O feijão-caupi por ser uma leguminosa se beneficia do N proveniente da Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN). Estimativas recentes mostram que a FBN pode representar uma economia da ordem de US\$ 13 milhões, somente para a região Nordeste brasileira (Rumjanek et al., 2005). Para aumentar a contribuição da FBN, torna-se necessário a otimização do processo através da seleção e inoculação com estirpes de rizóbios eficientes e adaptadas à região.

Alguns trabalhos realizados principalmente com leguminosas de clima temperado relatam o efeito prejudicial da salinidade na nodulação. A maioria desses trabalhos considera que o efeito é mais acentuado no sistema radicular, prejudicando o desenvolvimento do rizóbio (Tu, 1981). Alguns pesquisadores observaram variações na tolerância de diferentes estirpes quanto a concentrações crescentes de NaCl (Rai, 1983; Rai et al., 1985), enquanto outros consideram que a tendência e magnitude das reduções por efeito da salinidade dependem também das variedades apresentadas pelas plantas (Ahmed et al., 1981). Acredita-se que, quando os estresses são de curta duração, predominem os efeitos osmóticos dos sais, fazendo com que o potencial hídrico do ambiente radicular diminua e restrinja a absorção de água; em estresses de longa duração, todavia, os íons se acumulam e provocam toxidez, induzindo distúrbios nutricionais e metabólicos (Munns 2002).

De modo geral, os efeitos prejudiciais dos sais são mais evidentes, particularmente em relação aos efeitos da concentração do íon específico do que ao efeito osmótico (Elsheikh, 1998). Nesse contexto, o NaCl tem sido considerado bom indicador da tolerância de bactérias à sais (Abdelmoumen et al., 1999).

Por outro lado, temperaturas elevadas são outro fator também limitante para o rizóbio, onde o tamanho do nódulo parece ser o parâmetro mais sensível a altas temperaturas do que o número de nódulos em estudos com a cultura da soja realizados por Castro et al. (1993). Esta sensibilidade a temperaturas elevadas pode ser exemplificada pelas simbioses do feijoeiro, com sensibilidade. No caso do feijoeiro, tanto a planta como o rizóbio são afetados quando em temperaturas superiores à 34°C, sendo que no caso do rizóbio, os plasmídeos que carregam os genes simbióticos podem ser perdidos. Estirpes isoladas de leguminosas florestais tolerantes a altas temperaturas e eficientes na nodulação do feijoeiro têm sido apontadas como uma valiosa fonte de recursos genéticos para aumentar o potencial da FBN nesta cultura nos trópicos como as encontradas por Hungria et al. (1993), citado em Moreira e Siqueira, (2002). Em feijão-caupi, Dart & Mercer (1965) encontraram que nódulos foram reduzidos em número, tamanho e conteúdo de leghemoglobina quando submetidas a altas temperaturas embora outros fatores, além da temperatura, estivessem também envolvidos.

A seleção de estirpes de rizóbio adaptáveis ao estresse de salinidade e temperatura elevada da região Semi-árida amplia as chances de sucesso para a introdução e estabelecimento da bactéria na associação com o feijão-caupi, aumentando a produtividade de grãos. Para tanto, testes *in vitro* podem ser utilizados, pois, além de permitirem a comparação de um grande número de microrganismos, são também rápidos e de custo relativamente baixo, possibilitando a identificação de estirpes tolerantes, antes da verificação de sua tolerância no campo (Nóbrega et al., 2004).

Este trabalho teve com objetivo verificar diferenças entre estirpes de bactérias isoladas de feijão-caupi com relação à tolerância à NaCl e temperatura, e sua relação quanto à origem e velocidade de crescimento das estirpes.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram testados 76 estirpes de rizóbio obtidas de nódulos de feijão-caupi obtidos de um estudo anterior de caracterização morfológica da colônia e eficiência simbiótica em plantas de caupi e soja

(Martins et al., 1998). As estirpes foram provenientes de 3 ecossistemas, sendo 21 oriundas da Zona da Mata, 8 do Agreste e 47 do Sertão, e representando 53 e 23 bactérias de crescimento lento e rápida, respectivamente. Estas bactérias apresentavam muco tipo seco (10 isolados), tipo viscoso ou tipo I (51 isolados) ou tipo butírico ou tipo II (15 isolados), conforme descrição de Xavier et al. (1998).

As bactérias foram inicialmente recuperadas da coleção de cultura disponível no laboratório de Ecologia Microbiana da Embrapa Agrobiologia, através do cultivo em meio YEM sólido (Vincent, 1970), contendo: 10g de manitol, 0,5g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2g de MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O; 1,0 g de extrato de levedura, 0,2 g de NaCl (0,02% p/v); 13 mg de FeCl<sub>3</sub> · 6 H<sub>2</sub>O, em um volume de 1L e incubadas a 28°C para garantir a viabilidade e a pureza do inóculo.

Para o teste de salinidade as bactérias foram testadas nas concentrações de 1, 2 e 3% de NaCl (p/v) e ainda um controle com a concentração original do meio (0,02% NaCl) para verificar a qualidade do inóculo. As bactérias foram repicadas em placa, com auxílio de alça de platina, com duas repetições, e incubadas à 28°C, durante o aparecimento das colônias ou até o 20º dia de incubação.

Já para o teste de tolerância à temperatura, as bactérias foram também repicadas e submetidas a incubação à 28°C, como controle, e à 39 e 42°C, durante o aparecimento das colônias ou até o 20º dia de incubação. Os isolados que obtiveram crescimento uniforme nas diferentes condições, com o aparecimento de colônias isoladas, receberam sinal (+) e os que não cresceram receberam sinal (-).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Características relacionadas com o local de origem do rizóbio são provavelmente associadas com adaptação de pressões específicas do ambiente. Neste estudo, avaliando a tolerância das estirpes a 39 e 42°C, observa-se que as bactérias provenientes do Sertão (onde o clima é mais quente e seco com o aumento da latitude) são mais tolerantes a temperaturas elevadas (Figura 1A). No entanto, não foi observado um gradiente de acordo com as características de origem das estirpes, entre os isolados da Zona da Mata que tem temperaturas mais amenas que as do Agreste e este, por sua vez, é mais ameno quando comparado ao Sertão.

A habilidade da estirpe em tolerar a altas temperaturas não tem sido relacionada à latitude geo-

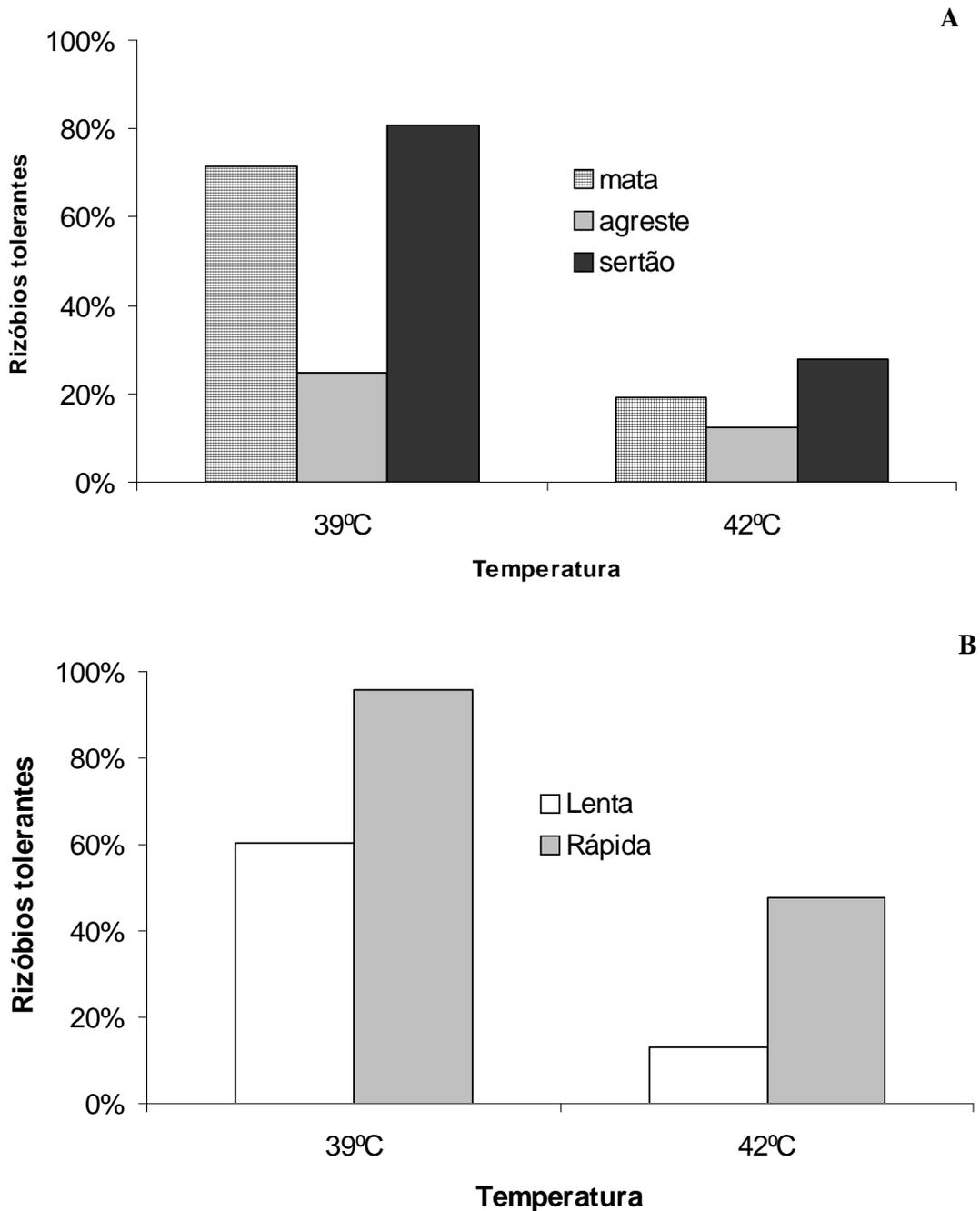
gráfica da origem dos rizóbios (Karanja e Wood, 1988). Entretanto, os resultados observados, dentre as 18 estirpes capazes de tolerar temperaturas de até 42°C, 13 são provenientes do Sertão. Temperaturas acima de 40°C são frequentemente observadas na superfície do solo (Eaglesham and Ayanaba, 1984; Hafeez et al., 1991; Lal, 1993). Estas temperaturas elevadas têm sido responsáveis por limitar a nodulação e a FBN (Eaglesham and Ayanaba, 1984, Jones and Tisdale, 1921). Apesar de não existir forte correlação da seleção in vitro de rizóbios a temperaturas elevadas e os resultados no campo (Hungria and Vargas, 2000), tais características podem ser úteis para a melhoria futura de inoculantes que em geral contém isolados de rizóbio eficientes, mas sensíveis a temperaturas elevadas (Hung et al., 2005).

Dentre 18 estirpes tolerantes a 42°C, 11 apresentam a característica de crescimento rápido em meio de cultura. Este mesmo comportamento foi observado na temperatura de 39°C (Figura 1B).

Com base nesses dados e de acordo com a determinação da temperatura máxima (T<sub>m</sub>) de crescimento de diferentes espécies de rizóbios (Lindstrom & Lehtomaki, 1988), sendo *R. leguminosarum* (T<sub>m</sub>, 31 a 35°C), a do *R. meliloti* (T<sub>m</sub>, 38 a 41°C), do *R. loti* (T<sub>m</sub>, 33 a 37°C), a do *R. fredii* (T<sub>m</sub>, 34 a 36°C), e o *R. galegae* (T<sub>m</sub>, 33 a 37°C), pode-se verificar que estas bactérias apresentam comportamento similar aos de *R. meliloti* do que a outras espécies de rizóbio.

Em relação aos estudos dos efeitos da salinidade (NaCl) em meio de cultivo, todas as 76 estirpes foram inicialmente cultivadas a 0,02% de NaCl à 28°C, onde 100% apresentaram crescimento no meio YEM e ainda nas concentrações de 1,0; 2,0 e 3,0% de NaCl. Observou-se que à medida que a concentração de NaCl aumentou ocorreu uma redução na porcentagem de isolados tolerantes. Destas estirpes, cerca de 40% foram capazes de crescer em meio de cultura contendo 1% de NaCl. Na concentração de 2% de NaCl, foram capazes de crescer 17% do total de isolados, sendo que destes, 15% foram isolados de solos da região do Sertão e 24% da Zona da Mata. Já na concentração de 3% deste sal, somente 12% das estirpes testadas foram capazes de crescer nesta condição (Figura 2A).

Eaglesham et al (1987) estudando aspectos fisiológicos e bioquímicos da diversidade de *Bradyrhizobium* spp isolados de feijão-caupi em três solos do Oeste Africano encontraram somente uma estirpe capaz de resistir a 1% de NaCl, dentre as 79 estirpes testadas. Esses autores observaram que a resistência dos isolados não pas-

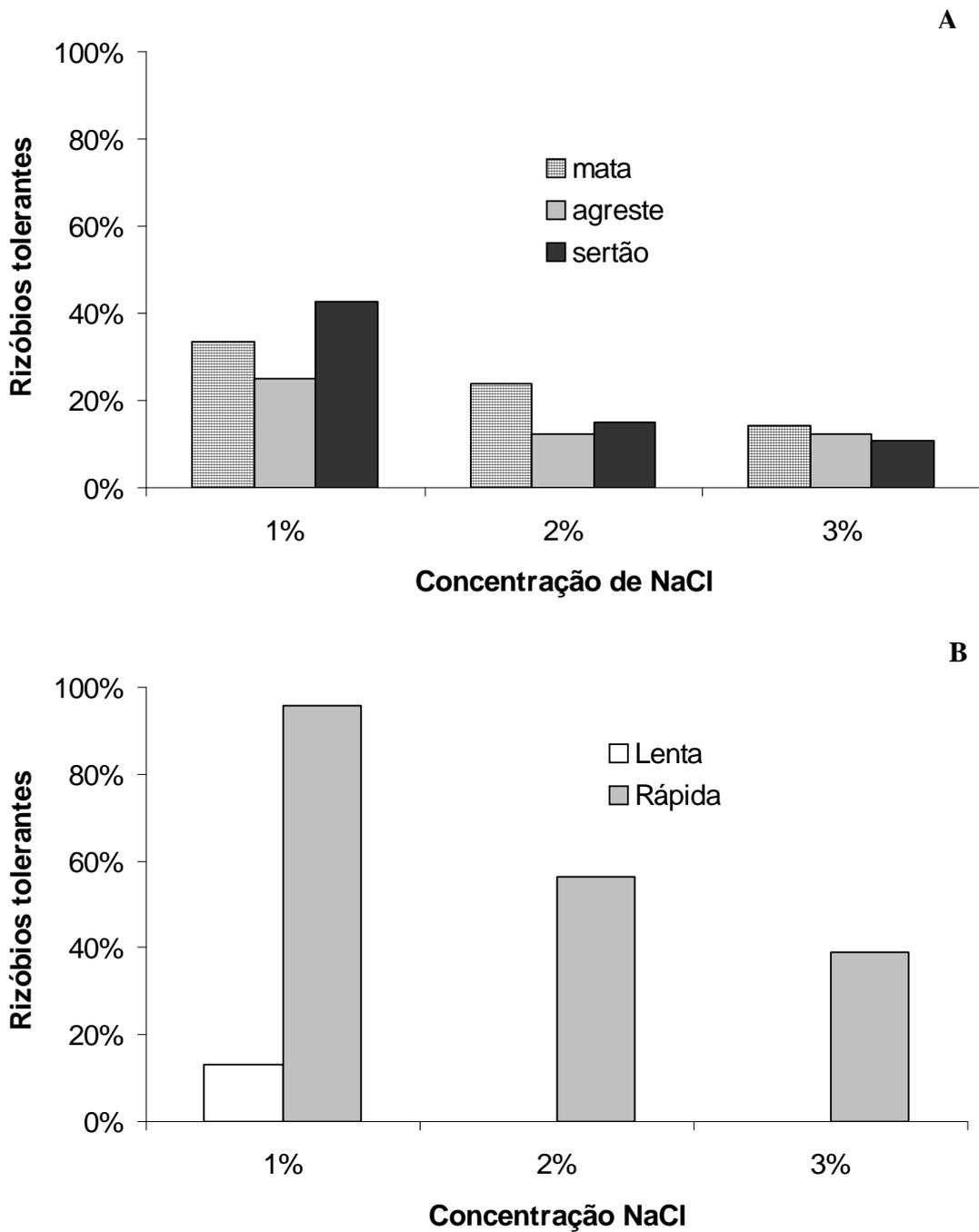


**Figura 1:** Distribuição de isolados resistentes às temperaturas de 39 e 42°C de acordo com (A) a origem e (B) a velocidade de crescimento das estirpes de rizóbios.

sou de 0,5% de NaCl, onde 41 estirpes (52%) apresentou crescimento, sendo todas produtoras de muco. Nenhuma das estirpes secas cresceram com 0,5% de NaCl. De forma contrária, as 8 estirpes secas estudadas nesse trabalho não toleraram a concentração de 3% de NaCl, porém 1 iso-

lado tolerou 2% de sal e 3 toleraram a concentração de 1% de NaCl.

Para Graham & Parker (1964) muitas espécies de rizóbio podem tolerar acima de 2% de NaCl no meio de cultura. Em nossos estudos, 9 isolados de crescimento rápido obtidos de solos do



**Figura 2:** Distribuição de isolados resistentes às concentrações de 1, 2 e 3% de NaCl de acordo com a (A) origem e (B) e a velocidade de crescimento das estirpes de rizóbios.

Nordeste foram capazes de crescer normalmente na concentração de 3% de NaCl (Figura 2B). Resultados similares foram encontrados por Zhang et al (1991) estudando rizóbios de crescimento rápido que nodulam espécies arbóreas no

Sudão e também por Basak & Goyal (1980) com isolados de Acácia.

Os altos valores de tolerância a temperatura máxima e níveis de tolerância a NaCl dessas estirpes pode indicar uma importância ecológica sob as condições de clima quente e seco encon-

tradas no Nordeste brasileiro.

A maior tolerância dos isolados de crescimento rápidos para as mais altas concentrações de sal está de certa forma, correlacionada com a tolerância que os isolados rápidos apresentam às altas temperaturas. Elsheikh e Wood (1989) observaram que, além da respostas de tolerância a salini-

Para Osa-Afiana & Alexander, (1982) a habilidade do rizóbio do grupo caupi de crescer relativamente bem em altas temperaturas parece estar correlacionada com a quantidade de muco produzido pelas estirpes em meio YEM a 28°C. Hollingsworth et al (1985) encontraram que estirpes de rizóbio do grupo caupi capazes de crescer a

**Tabela 1:** Distribuição das estirpes de feijão-caupi resistentes às temperaturas de 39 e 42°C e às concen-

Tipo de muco	Temperatura (°C)		NaCl (%)		
	39	42	1	2	3
Seca	70%	40%	40%	10%	0%
Butírico	93%	0%	0%	0%	0%
Viscoso	65%	27%	49%	24%	18%

dade ser dependente da temperatura, também está relacionada ao pH e a fonte de carbono em meio de cultura.

Os resultados obtidos neste trabalho também foram relacionados com o tipo de muco das colônias de rizóbio (Tabela 1). Comparando os resultados dos estudos de tolerância a temperaturas adversamente altas e à salinidade foi possível observar que os isolados com muco seco se mostraram mais resistentes à temperatura de 42°C, ao passo que os isolados produtores de muco viscoso se mostraram mais resistentes à salinidade em todas as concentrações avaliadas. Por outro lado, os 15 rizóbios com muco tipo butírico não se mostraram capazes de tolerar qualquer das concentrações de NaCl (1, 2 e 3%) testadas e menor tolerância a temperaturas adversamente altas.

temperaturas elevadas produziram mais muco a 42°C do que a 30°C. Eaglesham et al, (1987) encontrou que estirpes produtoras de muco são superiores às estirpes secas em termos de resistência a condições salinas e a antibióticos.

A junção de estresses de seca e altas temperaturas são prevaletentes em muitas regiões onde as leguminosas são cultivadas para alimento e também como forragem. Consequentemente, atenção especial merece ser dada para a avaliação da tolerância a temperatura e as condições de seca para estirpes de rizóbio, que podem ser usadas como inoculantes em áreas sujeitas a tais condições de estresses.

Quando analisado de forma conjunta os resultados é possível observar que 7 isolados foram tolerantes tanto às altas temperaturas e aos níveis

**Quadro 1:** Características das bactérias com tolerâncias à altas temperaturas e aos níveis de NaCl.

Isolado	25 - 1	12-10	17-6	12 - 9	28 b 6	30 b 1	2 - 26
<b>Região de origem sistema agrícola</b>	Agreste sequeiro	Sertão irrigado	Sertão irrigado	Sertão irrigado	Mata sequeiro	Mata sequeiro	Sertão irrigado
<b>Velocidade de crescimento muco</b>	Rápida	Rápida	Rápida	Rápida	Rápida	Rápida	Rápida
<b>pH</b>	Viscosa	Viscosa	Viscosa	Viscosa	Viscosa	Viscosa	Viscosa
<b>Diâmetro</b>	ácida	neutra	ácida	neutra	ácida	ácida	ácida
<b>Forma</b>	> 2 mm	> 2 mm	até 2 mm	> 2 mm	até 2 mm	> 2 mm	> 2 mm
<b>Borda</b>	circular	circular	irregular	circular	circular	circular	irregular
<b>Superfície muco</b>	inteira	inteira	inteira	inteira	inteira	inteira	inteira
<b>Nod feijão-caupi</b>	mucóide viscosa	mucóide viscosa	mucóide viscosa	mucóide viscosa	mucóide viscosa	mucóide viscosa	mucóide viscosa
Fixcau	+	+	+	+	+	+	+
Hupcau	-	+	+	+	+	+	+
Nodsoj	+	-	+	+	-	+	+
Fixsoj	-	-	+	+	-	-	-
Hupsoj	+	nd.	+	+	+	+	+

de NaCl testados neste trabalho; sendo 1 do Agreste, 2 da Zona da Mata e 4 do Sertão. As características desses isolados estão descritas no quadro 1 (Tabela 2). Deste modo, o levantamento destas informações pode ser útil para apontar estirpes candidatas para os programas de seleção de inoculantes em feijão-caupi.

### CONCLUSÕES

Somente 7 das 76 estirpes de feijão-caupi foram tolerantes às altas temperaturas e aos níveis de NaCl testados; sendo 1 do Agreste, 4 do Sertão e 2 da Zona da Mata.

As estirpes de crescimento rápido e produtoras de muco se mostraram mais resistentes em meio de cultura às condições de tolerância a altas temperaturas e níveis crescentes de NaCl.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o CNPq e o PRODETAB pelo auxílio financeiro.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELMOUMEN, H.; FILALI-MALTOUF, A.; NEYRA, M.; BELABED, A.; IDRISSE, M. M. Effect of high salts concentration on the growth of rhizobia and responses to added osmótica. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 86, n. 6, p. 889-898, June 1999.
- ARAGÜES, R. Calidad de agua para riego. In: IX Curso Internacional de Riego Localizado. Tenerife. 1998. 162p.
- AHMAD, M. H.; EAGLESHAM, A. R. J.; HAS-SOUNA, S.; SEAMAN, B.; AHMAD, M.H.; EAGLESHAM, A.R.J.; HASSOUNA, S.; SEAMAN, B.; AYANABA, A.; MULONGOY, K.; PULVER, E.L. Examining the potential for inoculant use with cowpea in West African soils. **Tropical Agriculture**, Trinidad, v.58, p.325-335, 1981.
- BASAK, M.K.; GOYAL, S.K. Studies on tree legumes. III. Characterization of the symbionts and direct and reciprocal cross inoculation studies with tree legumes and cultivated legumes. **Plant and Soil**, The Hague, v.56, p.39-51, 1980.
- CASTRO, O.M. de; PRADO, H. do; SEVEDO, A.C.R.; CARDOSO, E. J. B. N. Evaluation of nitrogen fixation and soil microorganisms in soybean under conventional and minimal cultivation regimes. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, vol.50, no.2, p.212-219. 1993.
- DART, P.J.; MERCER, F.V. The effect of growth temperature, level of ammonium nitrate and light intensity on the growth and nodulation of cowpea. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v.16, p.321-328, 1965.
- EAGLESHAM, A.R.J., AYANABA, A., 1984. **Tropical stress ecology of rhizobia, root nodulation and legume nitrogen fixation**. In: Subba Rao, N.S. (Ed.), Selected Topics in Biological Nitrogen Fixation. Oxford/IBH Publishing, New Dehli, pp. 1-35.
- EAGLESHAM, A.R.J.; STOWERS, M.D.; MAINA, M.L.; GOLDMAN, B.J.; SINCLAIR, M.J.; AYANABA, A. 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 next term and pH. **Soil Biology and Biochemistry** v. 21, p. 883-887, 1989.
- ELSHEIKH, E. A. E. Effects of salt on rhizobia and bradyrhizobia: a review. **Annals of Applied Biology**, Lannham, v. 132, n. 3, p. 507-524, June 1998.
- FAO. Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soils. 2000. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/AGL/agll/spush/intro.htm>.
- FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; VIANA, F. M. P.; RIBEIRO, V. Q. **Feijão caupi: avanços tecnológicos**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2005. 640 p.
- GOES, E.S. O problema de salinidade e drenagem em projetos de irrigação do Nordeste e a ação da pesquisa com vistas a seu equacionamento. Recife: SUDENE, 1977. 20p.
- GRAHAM, P.H.; PARKER, C.A. Diagnostic features in the root nodule bacteria of legumes. **Plant and Soil**, The Hague, v.20, p.383-396, 1964.

- Hafeez, F.Y.; Asad, S.; Malik, K.A. The effect of high temperature on *Vigna radiata* nodulation and growth with different bradyrhizobial strains. **Environ. Exp. Bot.** 31, pp. 285–294, 1991.
- HOLLINGSWORTH, R.; SMITH, E.; AHMAD, M.H. Chemical composition of extracellular polysaccharides of cowpea rhizobia. **Archives of Microbiology**, Berlin, v.142, p.18-20, 1985.
- HUNG, M. H.; BHAGWATH, A. A.; SHEN, F. T.; DEVASYA, R. P.; YOUNG, C. C. Indigenous rhizobia associated with native shrubby legumes in Taiwan. **Pedobiologia**, v. 49, p. 577-584, 2005.
- Hungria, M.; Vargas, M.A.T. Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in tropics, with an emphasis on Brazil, **Field Crop Res** v. 65, p. 151–164, 2000.
- HUNGRIA, M.; FRANCO, A. A.; SPRENT, J. I. New sources of high-temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 149, n. 3, p. 103-109, 1993.
- JONES, F.R.; TISDALE, W.B. The effect of soil temperature upon the development of nodules on the roots of certain legumes. **Journal of Agricultural Research**, Pakistan, v.22, p.17-23, 1921.
- Karanja, N.K.; Wood, M. Selecting Rhizobium phaseoli strains for use with beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in Kenya: tolerance of high temperature and antibiotic resistance. **Plant and Soil**, v. 112, pp. 15–22, 1988.
- LAL, R. The role of no-till farming in sustainable agriculture in tropics. **Anais do I Encontro Latinoamericano sobre Plantio Direto na Pequena Propriedade**, IAPAR, Ponta Grossa/Brazil, 22–26 Novembro, pp. 29–62, 1993.
- LINDSTROM, K.; LEHTOMAKI, S. Metabolic properties, maximum growth temperature and phage sensitivity of *Rhizobium* sp. (*galega*) compared with other fast growing rhizobia. **FEMS. Microbiology Letters**, Amsterdam, v.50, p.277-287, 1988.
- MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 1005–1010, 1997.
- MARTINS, L.M.V. **Características ecológicas e fisiológicas de rizóbio que nodula caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) isolados a partir de solos da região Nordeste do Brasil. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996. Dissertação de Mestrado.**
- MELO, P. C. S.; ANUNCIÇÃO FILHO, C. J.; OLIVEIRA, F. J.; BASTOS, G.; Q.; TABOSA, J. N.; SANTOS, V. F.; MELO, M. R. C. S. Seleção de genótipos de arroz tolerantes à salinidade durante a fase vegetativa. **Ciência Rural**, 1 Santa Maria, v.36 no. Jan./Feb. 2006.
- MOREIRA, F. M. S. & SIQUEIRA, J. O, **Microbiologia e Bioquímica do Solo**; Lavras: Editora UFLA, 2002. 626 p.
- MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell & Environment** 28:239-250. 2002.
- NÓBREGA, R. S. A.; MOTTA, J. S.; LACERDA, A. M.; MOREIRA, F. M. S. Tolerância de bactérias diazotróficas simbióticas à salinidade *in vitro*. **Ciência agrotec.**, Lavras, v. 28, n. 4, p. 899-905, jul./ago., 2004
- OSA-AFIANA, L.O.; ALEXANDER, M. Clays and the survival of Rhizobium during desiccation. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.46, p.285-288, 1982.
- RAI, R. The salt tolerance of *Rhizobium* strains and lentil genotypes and the effect on salinity aspects of symbiotic N-fixation. **Journal of Agricultural Sciences**, Cambridge, v.100, p.81-86, 1983.
- RAI, R.; NASAR, S.K.T.; SINGH, S.J.; PRASAD, V. Interactions between *Rhizobium* strains and lentil (*Lens culinaris* L.) genotypes under salt stress. **Journal of Agricultural Sciences**, Cambridge, v.104, p-199-205, 1985.
- RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P. Fixação Biológica de Nitrogênio. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; SILVA, P. H. S.; VIANA, F. M. P. (Org.). **Feijão caupi: avanços tecnológicos**. p. 281-335, 2005.
- TU, J.C. Effects of salinity on *Rhizobium* root

hair interaction, nodulation and growth of soybean. **Canadian Journal of Plant Sciences**, Ontario, v.61, p.231-239, 1981.

ZHANG, X.; HARPER, R.; KARSISTO, M.; LINDSTROM, K. Diversity of *Rhizobium* Bacteria Isolated from the Root Nodules of Leguminous Trees. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Washington, v.41, p.104-113, 1991.