

Resistência à salinidade de rizóbios noduladores de *Lotus* spp.¹

Adriana Ferreira Martins², Luciano Kayser Vargas³, Julie Graziela Zanin⁴, Letícia Schönhofen Longoni⁴, Leane Gabriele Collonia Fraga⁵ e Enilson Luiz Saccol de Sá⁶

Resumo – No Rio Grande do Sul, alguns solos de várzea estão sujeitos à salinização por excesso de sais na água de irrigação usada em lavouras de arroz, processo que pode ser potencializado pelo uso de fertilizantes como o KCl. Tais áreas também são utilizadas periodicamente para pecuária e a salinização do solo pode afetar leguminosas, como as do gênero *Lotus*, introduzidas para melhoramento das pastagens. O presente trabalho teve como objetivo avaliar rizóbios noduladores de *Lotus* spp., nativos de solos do Rio Grande do Sul, quanto à resistência à salinidade. Foi avaliado o crescimento de diferentes isolados e de estirpes recomendadas em doses crescentes (4, 8, 12, 16 e 20 g L⁻¹) de NaCl ou KCl em meio levedura-manitol. Entre os rizóbios estudados, onze foram resistentes até concentrações de 12 g L⁻¹ de NaCl e seis foram resistentes até a 20 g L⁻¹ de KCl. Os isolados UFRGS Lc 372, UFRGS Lc 516 e UFRGS Lc 520 apresentaram elevada resistência ao estresse salino e podem ser uma opção para a produção de inoculantes para solos sujeitos à salinização. Dentre as estirpes recomendadas para as espécies do gênero *Lotus*, apenas SEMIA 849 é resistente às diferentes concentrações de NaCl e de KCl estudadas.

Palavras-chave: leguminosa, cloreto de sódio, cloreto de potássio, salinização.

Lotus spp. nodulating rhizobia resistant to salinity

Abstract – In Southern Brazil, paddy soils are potentially subjected to salinization caused by the excess of salts in irrigation water used in rice fields. This process can be increased by the use of fertilizers such as KCl. These areas are periodically used to raise cattle and soil salinization can affect legumes, like *Lotus* spp., which are introduced to improve forage quality. This paper intended to evaluate *Lotus* spp. nodulating rhizobia, native from Rio Grande do Sul soils, for their resistance to salinity. The growth of different rhizobial isolates and recommended strains was evaluated in increasing doses of (4, 8, 12, 16 and 20 g L⁻¹) of NaCl or KCl in yeast mannitol broth. Among the studied rhizobia, eleven were resistant up to the concentration of 12 g L⁻¹ of NaCl and six were resistant up to 20 g L⁻¹ of KCl. The isolates UFRGS Lc 372, UFRGS Lc 516 and UFRGS Lc 520 have shown a high resistance to saline stress and may be an option for the production of inoculants to saline soils. Among the strains recommended for *Lotus* spp., only SEMIA 849 is resistant to the different concentrations of NaCl and KCl.

Key words: legumes, sodium chloride, potassium chloride.

Introdução

A salinização do solo se constitui em uma das mais sérias formas de degradação dos recursos edáficos (NÓBREGA et al., 2004). No Rio Grande do Sul, a salinização está associada ao excesso de sais na água de irrigação, especialmente em lavou-

ras de arroz (CARMONA et al., 2009). Desta forma, as regiões de maior ocorrência do problema de salinidade são as Planícies Costeiras e a Região Sul, regiões próximas a lagoas e a rios litorâneos, os quais entram em contato direto ou indireto com a água do oceano Atlântico, sobretudo durante os meses de verão (FRAGA et al., 2010).

Além da presença de sais na água de irrigação,

¹Parte da dissertação de mestrado apresentada pela primeira autora ao Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo da UFRGS.

²Bióloga, Mestre em Ciência do Solo, Fepagro, Rua Gonçalves Dias, 570, 90130-060, Porto Alegre, RS. E-mail: biol.adriana@gmail.com.

³Eng. Agrônomo, Doutor em Ciência do Solo, Fepagro, Rua Gonçalves Dias, 570, 90130-060, Porto Alegre, RS. E-mail: luciano-kayser@fepagro.rs.gov.br.

⁴Acadêmicas em Ciências Biológicas, UFRGS, Av. Paulo Gama, 110, 90040-060, Porto Alegre, RS. E-mail: july_grazy@yahoo.com.br, leticiasl@gmail.com.

⁵Acadêmica de Biomedicina, IPA, Rua Cel. Joaquim Pedro Salgado, 80, 90420-060, Porto Alegre, RS. E-mail: leanecollonia@yahoo.com.br.

⁶Eng. Agrônomo, Doutor em Ciências, UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 7712, 91540-000, Porto Alegre, RS. E-mail: enilson.sa@ufrgs.br.

determinadas práticas agrícolas podem intensificar o processo de salinização do solo. A aplicação localizada de KCl, por exemplo, pode prejudicar genótipos de arroz sensíveis à salinidade, em decorrência do alto índice salino do adubo (CARMONA et al., 2009; OSTER et al., 1984).

Em geral, solos salinos contêm valores muito baixos de nitrogênio, não adequados para o cultivo da maioria das plantas (FREITAS et al., 2007). Uma solução apropriada para tal situação é o cultivo de plantas capazes de fixar nitrogênio através da simbiose rizóbio-leguminosa. Neste sentido, merecem especial atenção as leguminosas forrageiras de inverno, uma vez que as áreas de arroz frequentemente são usadas também para a pecuária (MENEZES et al., 2001). E, dentre essas, espécies do gênero *Lotus* têm se mostrado bastante promissoras para o cultivo em solos de várzea no Rio Grande do Sul (MARCHEZAN et al., 1998).

O estabelecimento de pastagens com espécies de *Lotus* baseia-se na eficiência da simbiose rizóbio/leguminosa, a qual, por sua vez, depende de ambos os simbiossiontes. Entretanto, não somente a maioria das plantas, mas também os rizóbios são sensíveis à salinidade (NOGALES et al., 2002; FREITAS et al., 2007), tanto na fase de vida livre quanto durante o processo simbiótico (DOMÍNGUEZ-FERRERAS et al., 2009). O excesso de sais pode ter um efeito negativo sobre as populações de rizóbios como resultado de toxicidade direta, bem como através de estresse osmótico ou de estresse iônico (NOGALES et al., 2002; MAHMOOD et al., 2008). A salinidade também induz efeitos depressivos sobre a nodulação, a leghemoglobina e a nitrogenase (MANCHANDA e GARG, 2008).

Assim, é necessária a seleção não somente de genótipos de plantas resistentes ao estresse salino, mas também de estirpes de rizóbios. O presente trabalho teve como objetivos avaliar e selecionar rizóbios noduladores de *Lotus* spp., nativos de solos do Rio Grande do Sul, quanto à resistência à salinidade.

Material e Métodos

Foram analisados 52 rizóbios capazes de nodular *Lotus* spp, obtidos por Fontoura (2007) e Frizzo (2007), pertencentes à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia do Solo da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Dentre os rizóbios estudados, 31 eram isolados de *Lotus corniculatus* (Lc), três de *L. glaber* (Lg), seis de *L. subbiflorus* (Ls) e doze de *L. uliginosus* (Lu). Estes foram obtidos a partir de amostras de solo de cinco municí-

pios do Rio Grande do Sul: Bagé, Encruzilhada do Sul, Hulha Negra, Mostardas e Piratini. Os estudos de resistência à salinidade foram realizados no Laboratório de Fitopatologia da Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Sul (Fepagro). Como padrão, utilizou-se a estirpe de *Rhizobium tropici* SEMIA 4077 (CIAT 899), considerada resistente aos fatores de salinidade (NOGALES et al., 2002).

A resistência dos rizóbios ao estresse salino foi avaliada pelo crescimento em meio extrato de levedura e manitol (LM) líquido com diferentes concentrações salinas de NaCl e KCl. Para a obtenção das concentrações salinas crescentes, foram adicionados 4, 8, 12, 16 e 20 g de NaCl por litro de meio LM, ajustando-se o pH para 6,8 (FREITAS et al., 2007). Como a salinidade do solo é comumente expressa como condutividade elétrica ou pressão osmótica equivalente na solução de saturação do solo (CARDOSO, 1992), determinou-se também a condutividade elétrica (CE) em dS m⁻¹ de cada concentração de NaCl ou de KCl em meio LM líquido (Tabela 1).

O inóculo foi preparado com culturas crescidas em meio líquido triptona levedura (TY), em agitador orbital, por sete dias a 28°C. Após, o inóculo foi padronizado em cerca de 10⁴ células viáveis por mL de meio e as culturas foram inoculadas em frascos estéreis, com meio LM com os diferentes sais e concentrações, e incubadas em agitação orbital constante de 100 rpm, durante sete dias, a 28°C. Ao final do período, determinou-se o número de células viáveis usando-se o método de gotas (HOBEN e SOMASEGARAN, 1982). Após dois a sete dias de incubação em estufa 28°C, realizou-se a contagem do número de colônias formadas. Foram realizadas três repetições por tratamento e considerados como resistentes os rizóbios que apresentaram número de células viáveis, no mínimo, mil vezes maior do que o inóculo.

Resultados e Discussão

Com relação à resistência dos 52 rizóbios de *Lotus* spp. ao estresse salino por diferentes concentrações de NaCl, observou-se que alguns dos isolados apresentaram resistência na faixa de 4 a 12 g L⁻¹ de NaCl (Figura 1), concentrações equivalentes à condutividade elétrica entre 5,66 e 11,97 dS m⁻¹. Por outro lado, nas concentrações de 16 a 20 g L⁻¹ de NaCl (condutividade elétrica de 13,56 e 15,73 dS m⁻¹, respectivamente) no meio de cultura, observou-se que alguns isolados não apresentaram crescimento, enquanto outros apresentaram crescimento na ordem de 10³ até 10⁶ UFC mL⁻¹, não

Tabela 1 – Condutividade elétrica das diferentes concentrações de cloreto de sódio e cloreto de potássio no meio de extrato de levedura e manitol líquido

Concentração (g L ⁻¹)	Condutividade elétrica (dS m ⁻¹)
NaCl	
0,1	1,04
4,0	5,66
8,0	9,29
12,0	11,97
16,0	13,58
20,0	15,73
KCl	
0*	0,74
4,0	6,09
8,0	10,60
12,0	14,73
16,0	17,42
20,0	19,68

0*Sem adição de Cloreto de Potássio (Concentração de potássio no meio extrato de levedura e manitol = 0,22 g L⁻¹).

sendo considerados resistentes pelos critérios adotados ($> 10^7$ UFC mL⁻¹). De modo geral, os rizóbios diminuíram o crescimento de 10^9 para até 10^3 UFC mL⁻¹, conforme a concentração de NaCl no meio de cultura. Dentre os 52 isolados de rizóbios para *Lotus* spp., 39 cresceram até a concentração de 4 g L⁻¹ de NaCl. Destes, 27 cresceram até 8 g L⁻¹, e apenas onze (UFRGS Lc 7, UFRGS Lc 11, UFRGS Lc 340, UFRGS Lc 348, UFRGS Lc 372, UFRGS Lc 516, UFRGS Lc 520, UFRGS Lc 523, UFRGS Lc 547, UFRGS Lu 56 e UFRGS Lu 59) cresceram até a concentração de 12 g L⁻¹ de NaCl, com populações da ordem de 10^7 UFC mL⁻¹. Nesta avaliação, doze rizóbios (UFRGS Lc 2, UFRGS Lc 3, UFRGS Lc 4, UFRGS Lc 596, UFRGS Lc 602, UFRGS Lc 614, UFRGS Lg 88, UFRGS Ls 45, UFRGS Ls 46, UFRGS Lu 25 e UFRGS Lu 67) foram considerados sensíveis, pois não apresentaram crescimento bacteriano a partir da concentração de 4 g L⁻¹ de NaCl em meio de cultura. Resultados semelhantes foram obtidos por Freitas et al. (2007), que observaram que rizóbios apresentavam crescimentos até o nível de 12 g L⁻¹ de NaCl nos meios ajustados para pH 6,8. Entretanto, Medeiros et al. (2007) obtiveram, no estudo de tolerância de rizóbios à salinidade do município de Mossoró (RN), isolados que apresentaram crescimento na concentração 15,47 g L⁻¹ de NaCl, em 28°C, enquanto que os isolados de rizóbios dos municípios de Alto do Rodrigues (RN) e Ceará-Mirim (RN) apresentaram crescimento na concentração 12,84 e 7,28 g L⁻¹ de NaCl, respectivamente, sendo portanto, menos tolerantes à salinidade. Singh et al. (2008) relataram que estir-

pes de *Rhizobium* que nodulam *Trigonella foenum-graecum* foram capazes de crescer em meio de cultura contendo 1 % de NaCl, mas foram incapazes de crescer em concentrações mais altas, mostrando assim que os isolados eram sensíveis ao sal. Já as estirpes estudadas por Nóbrega et al. (2004) toleraram concentrações de NaCl que variaram de dois até 30 g L⁻¹. Assim, é possível observar uma ampla variação na tolerância de rizóbios à salinidade, desde 0 até 60 g L⁻¹ de NaCl (RASA et al., 2001; TAMIMI, 2001; HUNGRIA et al., 2001).

Entre as estirpes de *Mesorhizobium loti* liberadas para a produção de inoculantes, somente a SEMIA 849 apresentou resistência em todas as concentrações testadas, enquanto SEMIA 816 e SEMIA 830 apresentaram crescimento nas concentrações até 12 g L⁻¹ de NaCl. SEMIA 806 apresentou crescimento até a concentração de 8 g L⁻¹ de NaCl, e SEMIA 839 foi considerada sensível ao estresse salino por NaCl, pois apresentou populações da ordem de 10^3 UFC mL⁻¹ na concentração de 4 g L⁻¹ de NaCl e não desenvolveu crescimento bacteriano nas concentrações de 8 a 20 g L⁻¹ de NaCl.

Em relação ao estresse salino por diferentes concentrações de KCl, observou-se que os 52 isolados de rizóbios para *Lotus* spp. variaram seu crescimento entre as concentrações de 4 a 20 g L⁻¹ (Figura 2). Como no estudo de resistência ao estresse salino por sódio, o crescimento das células viáveis dos isolados diminuiu com o aumento da concentração de KCl no meio de cultura, produzindo populações da ordem de 10^9 para até 10^3 UFC mL⁻¹. Dos 52 isolados para *Lotus* spp., 46 cresce-

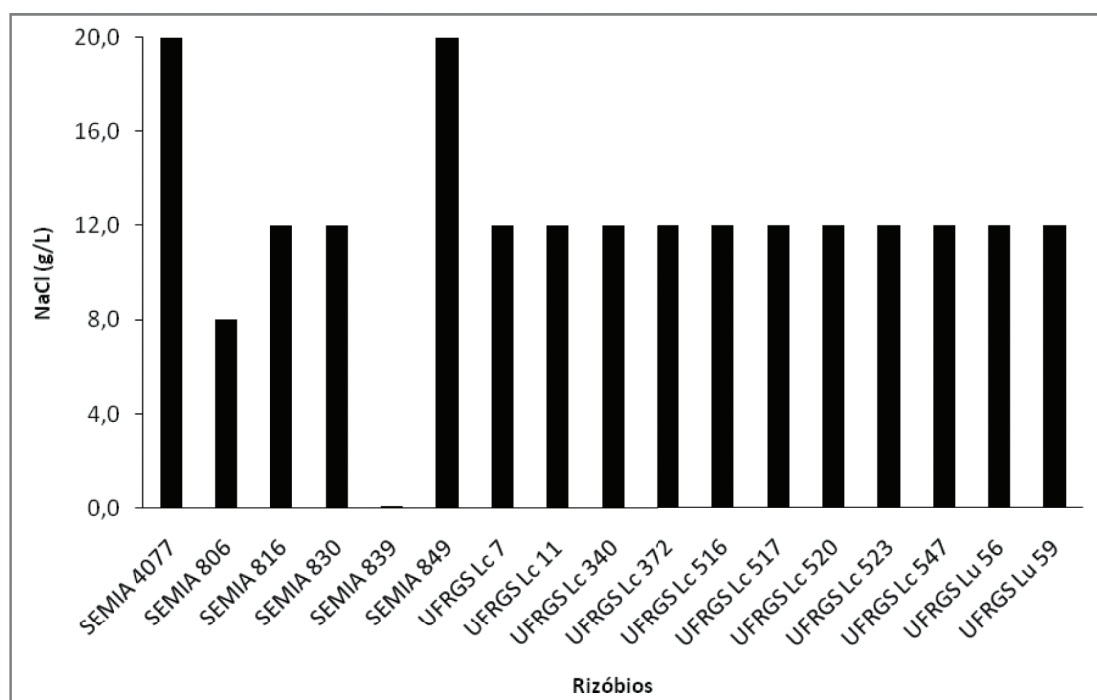


Figura 1 – Concentração de NaCl na qual os rizóbios de *Lotus* spp. apresentaram crescimento igual ou superior a 10^7 UFC mL⁻¹

ram na concentração de 4 g L⁻¹. Destes, 28 cresceram em 8 g L⁻¹, 19 em 12 g L⁻¹, doze em 16 g L⁻¹ e apenas seis cresceram na concentração de 20 g L⁻¹ de KCl – UFRGS Lc 2, UFRGS Lc 3, UFRGS Lc 372, UFRGS Lc 516, UFRGS Lc 517, UFRGS Lc 520. Por outro lado, seis isolados foram considerados sensíveis – UFRGS Lu 21, UFRGS Lu 26, UFRGS Lu 56, UFRGS Lu 67, UFRGS Lc 348, UFRGS Lc 602.

Em relação às estirpes liberadas para a produção de inoculantes de *Lotus* spp., tal como observado no estudo com NaCl, somente a SEMIA 849 apresentou crescimento de células viáveis em todas as concentrações testadas. SEMIA 830 cresceu nas concentrações de 4 a 16 g L⁻¹ de KCl, enquanto que SEMIA 806 e SEMIA 816 apresentaram semelhante crescimento bacteriano entre si nas concentrações de 4 a 12 g L⁻¹, com populações na ordem de 10^9 e 10^8 UFC mL⁻¹, e SEMIA 839 demonstrou ser resistente somente na concentração de 4 g L⁻¹, com populações na ordem de 10^8 UFC mL⁻¹.

Os isolados UFRGS Lc 602 e UFRGS Lu 67 foram sensíveis ao estresse salino tanto em concentrações altas de NaCl quanto de KCl. Segundo Mary et al. (1986), NaCl e KCl apresentam toxicidade similar em diferentes espécies de rizóbios, o que foi observado nos resultados de 18 isolados de rizóbios para *Lotus* spp. neste

estudo, sendo eles UFRGS Lc 7, UFRGS Lc 9, UFRGS Lc 11, UFRGS Lc 356, UFRGS Lc 523, UFRGS Lc 586, UFRGS Lc 609, UFRGS Lc 610, UFRGS Ls 1, UFRGS Ls 5, UFRGS Ls 33, UFRGS Ls 36, UFRGS Lu 9, UFRGS Lu 14, UFRGS Lu 16, UFRGS Lu 19, UFRGS Lu 59 e UFRGS Lu 71. Upchurch e Elkan (1977) relataram, em seu estudo, que KCl apresentou efeito mais inibitório do que o de NaCl, em mesmas concentrações, para quatro estirpes de *Rhizobium japonicum*, atualmente denominado *Bradyrhizobium japonicum*. Contudo, esse efeito não foi observado neste trabalho (Figura 3). Pelo contrário, dentre os 52 isolados de rizóbios para *Lotus* spp. estudados, 21 (UFRGS Lc 2, UFRGS Lc 3, UFRGS Lc 4, UFRGS Lc 5, UFRGS Lc 8, UFRGS Lc 322, UFRGS Lc 329, UFRGS Lc 372, UFRGS Lc 516, UFRGS Lc 517, UFRGS Lc 520, UFRGS Lc 596, UFRGS Lc 602, UFRGS Lc 614, UFRGS Lg 74, UFRGS Lg 85, UFRGS Lg 88, UFRGS Ls 45, UFRGS Ls 46, UFRGS Lu 25, UFRGS Lu 57) foram mais afetados por NaCl do que por KCl. Além disso, alguns isolados foram capazes de crescer na concentração de 20 g L⁻¹ de KCl, mas apenas as estirpes SEMIA 4077 e SEMIA 849 foram capazes de crescer em igual concentração de NaCl. Resultados semelhantes foram obtidos pelos autores Elsheikh e Wood (1990), estudan-

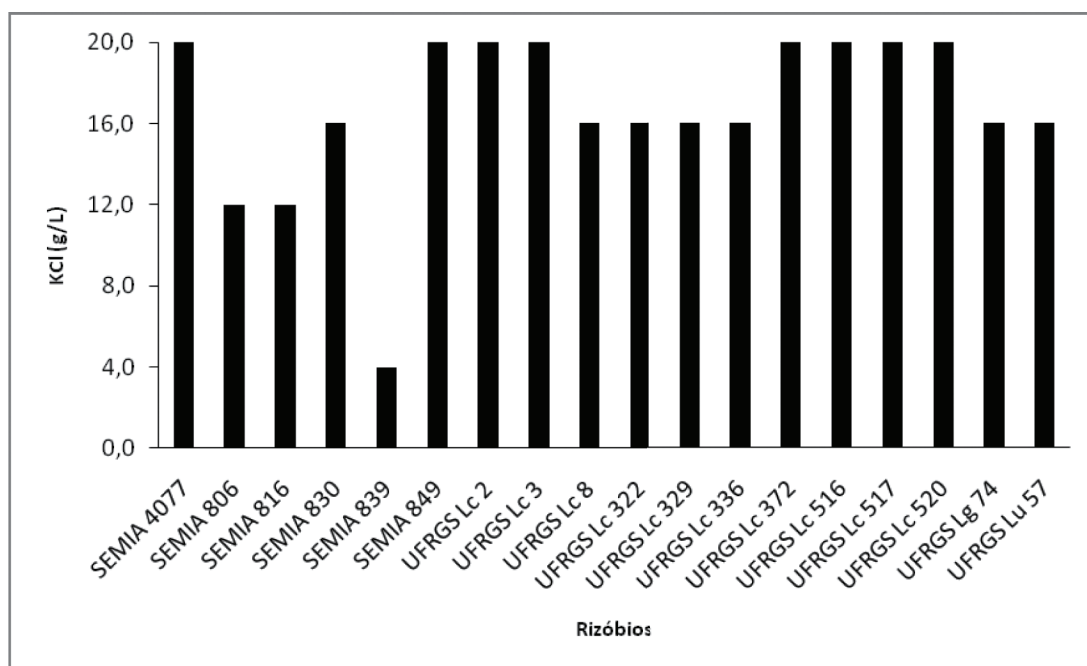


Figura 2 – Concentração de KCl na qual os rizóbios de *Lotus* spp. apresentaram crescimento igual ou superior a 10^7 UFC mL⁻¹

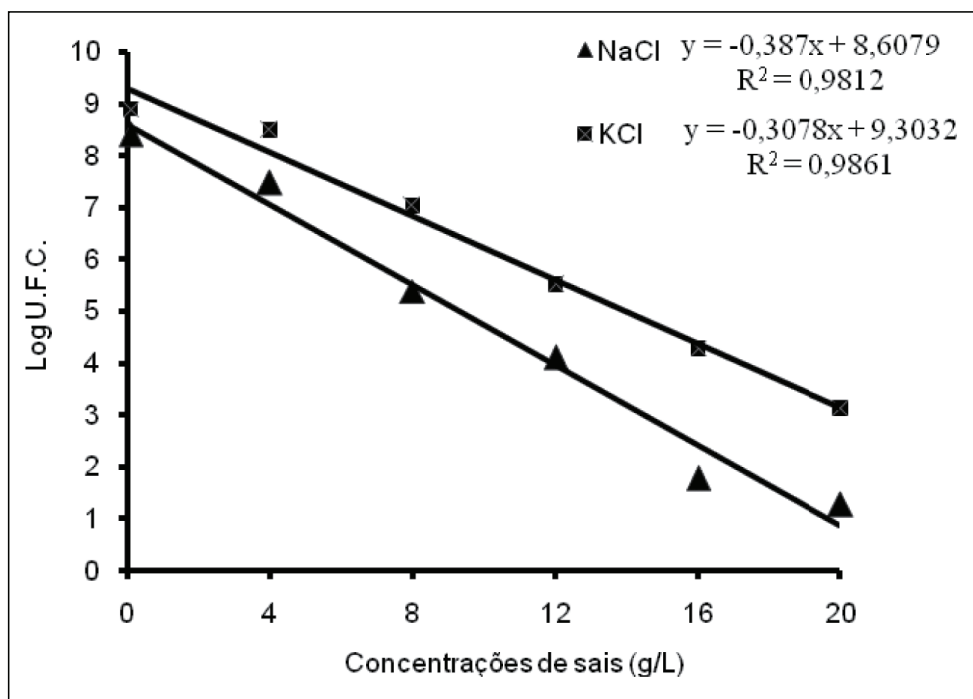


Figura 3 – Regressão linear das diferentes concentrações de NaCl e de KCl, em meio levedura e manitol, sobre os isolados e estirpes de rizóbios de *Lotus* spp

do o efeito de diferentes concentrações de sódio e potássio na forma de NaCl e KCl, respectivamente, no crescimento de *Rhizobium* sp. para grão-de-bico, estirpe Ch192 e *R. fredii* para soja, estirpe USDA 201. Os autores observaram que no meio salino contendo KCl ocorreu crescimento maior das estirpes do que no meio com NaCl e, também, que as estirpes foram resistentes em concentração de 2,5 % de KCl enquanto que em NaCl resistiram até a concentração de 2,0 %.

Conclusão

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que existem rizóbios noduladores de espécies de *Lotus* resistentes ao estresse salino em solos do Rio Grande do Sul. Os isolados UFRGS Lc 372, UFRGS Lc 516 e UFRGS Lc 520, obtidos a partir de *L. corniculatus*, apresentaram elevada resistência ao estresse salino por NaCl e por KCl e podem ser uma opção para a produção de inoculantes mais eficientes e adaptados às condições de solos sujeitos à salinização. Dentre as estirpes recomendadas para as espécies do gênero *Lotus*, somente SEMIA 849, recomendada para *L. subbiflorus*, é resistente às diferentes concentrações de NaCl e de KCl estudadas.

Referências

CARDOSO, E. J. B. N. (Coord.). **Microbiologia do solo**. Campinas, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. 360p.

CARMONA, F. C.; ANGHINONI, I.; MEURER, E. J.; HOLZSCHUH, M. J.; FRAGA, T. I. Estabelecimento do arroz irrigado e absorção de cátions em função do manejo da adubação potássica e do nível de salinidade no solo. **Revista Brasileira de Ciência Solo**, Campinas, v.32, n.2, p. 371-383, 2009.

DOMINGUÉZ-FERRERAS, A.; MUÑOZ, S.; OLIVARES, J.; SOTO, M. J.; SANJUÁN, J. Role of potassium uptake systems in *Sinorhizobium meliloti* osmoadaptation and symbiotic performance. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.191, n.7, p.2133-2143, 2009.

ELSHEIKH, E. A. E.; WOOD, M. Salt effects on survival and multiplication of chickpea and soybean rhizobia. **Soil Biology and Biochemistry**, United States, v.22, n.3, p. 343-347, 1990.

FONTOURA, R. A. **Seleção de rizóbios nativos, de solos do Rio Grande do Sul, para *Lotus glaber* e *Lotus subbiflorus***. 2007. 94f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

FRAGA, T. I.; CARMONA, F. D. C.; ANGHINONI, I.; GENRO JUNIOR, S. A.; MARCOLIN, E. Flooded rice yield as affected by levels of water salinity in different stages of its cycle. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.34, n.1, Viçosa, p.163-173. 2010.

FREITAS, A. D. S.; VIEIRA, C. L.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P.; LYRA, M. C. C. P. Caracterização de rizóbios isolados de jacatupé cultivado em solo salino do estado de Pernambuco, Brasil. **Bragantia**, Campinas, v.66, n.3, p.497-504, 2007.

FRIZZO, M. L. S. **Seleção e caracterização de rizóbios nativos, de solos do Rio Grande do Sul, para *Lotus corniculatus* L. e *Lotus uliginosus* Schkuhr**. 2007. 81f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

HOBEN, H. J. SOMASEGARAN, P. Comparison of the pour, spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium* spp. in inoculants made from presterilized peat. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.44, n.5, p.1246-1247, 1982.

HUNGRIA, M.; CHUEIRE, L. M. O.; COCA, R. G.; MEGÍAS, M. Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soybean nodules in Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.33, n.10, p.1349-1361, 2001.

MAHMOOD, A.; ATHAR, M.; QADRI, R.; MAHMOOD, N. Effect of NaCl salinity on growth, nodulation and total nitrogen content in *Sesbania sesban*. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, Zagreb, v.73, n.3, p.137-141, 2008.

MANCHANDA, G.; GARG, N. Salinity and its effects on the functional biology of legumes. **Acta Physiologica Plantarum**, Berlin, n.30, p.595-618, 2008.

MARCHEZAN, E.; VIZZOTTO, V.R.; ZIMMERMAN, F.L. Produção de forrageiras de inverno em diferentes espaçamentos entre drenos superficiais sob pastejo animal em várzea. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.28, n.3, p.393-397, 1998.

MARY, P.; OCHIN, D.; TAILLIEZ, R. Growth status of rhizobia in relation to their tolerance to low water activities and desiccation stress. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.18, p.179-184, 1986.

MEDEIROS, E.V.; SILVA, K.J.P.; MARTINS, C.M.; BORGES, W.L. Tolerância de bactérias fixadoras de nitrogênio provenientes de municípios do Rio Grande do Norte à temperatura e salinidade. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, v.7, n.2, p.160-168, 2007.

MENEZES, V.G.; MARIOT, C.H.P.; LOPES, M.C.B.; SILVA, P.R.F.; TEICHMANN, L.L. Semeadura direta de genótipos de arroz irrigado em sucessão a espécies de cobertura de inverno. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.36, n.9, p.1107-1115, 2001.

NÓBREGA, R.S.A.; MOTTA, J.S.; LACERDA, A.M.; MOREIRA, F.M.S. Tolerância de bactérias diazotróficas simbióticas à salinidade *in vitro*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.28, n.4, p.899-905, 2004.

NOGALES, J.; CAMPOS, R.; ABDELKHALEK, H.B.; OLIVARES, J.; LLUCH, C.; SANJUAN, J. *Rhizobium tropici* genes involved in free-living salt tolerance are required for the establishment of efficient nitrogen-fixing symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St Paul, v.15, n.3, p.225-232, 2002.

OSTER, J.D.; HOFFMAN, G.J.; ROBINSON, F.E. Management alternatives: crop, water and soil. **California Agriculture**, Richmond, v.38, n.10, p.29-32, 1984.

RASA, S.; JORNSGARD, B.; ABOU-TALEB, H.; CHRISTIANSEN, J.L. Tolerance of *Bradyrhizobium* sp. (Lupini) strains to salinity, pH, CaCO₃ and antibiotics. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.32, n.6, p.379-383, 2001.

SINGH, B.; KAUR, R.; SINGH, K. Characterization of *Rhizobium* strain isolated from the roots of *Trigonella foenumgraecum* (fenugreek). **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v.7, n.20, p.3671-3676, 2008.

TAMIMI, S.M. Genetic diversity and symbiotic effectiveness of rhizobia isolated from root nodules of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown in the soils of the Jordan Valley. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v.19, p.183-190, 2001.

UPCHURCH, R.G.; ELKAN, G.H. Comparison of colony morphology, salt-tolerance and effectiveness in *Rhizobium japonicum*. **Canadian Journal of Microbiology**, Saskatoon, n.23, p.1118-1122, 1977..