

ESPECIFICIDADE E COMPETITIVIDADE DE ESTIRPES DE RHIZOBIUM EM CENTROSEMA SOB CONDIÇÕES CONTROLADAS¹

CÉSAR H. BEHLING MIRANDA², NELSON FREDERICO SEIFFERT³ e SEBASTIÃO M. SOUTO⁴

RESUMO - Foram conduzidos dois experimentos em casa-de-vegetação, em areia-vermiculita, com a finalidade de comparar a eficiência e especificidade entre onze estirpes de *Rhizobium* e três centrosemas - *Centrosema* sp GC 372/79, *Centrosema* sp (híbrido interespecífico Itaguaí) e *C. macrocarpum* CIAT 5065 - e identificar a estirpe de *Rhizobium* responsável pela formação de nódulos no híbrido Itaguaí quando feita inoculação com mistura de estirpes. A estirpe C-106, isolada de *C. pubescens*, apresentou peso de nódulos, N-total e eficiência relativa significativamente maiores ($p < 0,05$) do que as demais estirpes. Entretanto, mostrou-se incapaz de formar nódulos quando inoculada junto com a estirpe C-551, isolada igualmente de *C. pubescens*, ou formou pequena percentagem de nódulos quando em mistura com outras duas estirpes. A estirpe C-551 mostrou-se pouco eficiente, mas altamente competitiva, sendo capaz de formar de 70% a 100% dos nódulos quando inoculada em conjunto com outras três estirpes. Dentre os materiais estudados, o híbrido Itaguaí apresentou melhor peso de nódulos, produção de matéria seca e N total.

Termos para indexação: fixação biológica de N₂, leguminosas forrageiras, inoculação.

SPECIFICITY AND COMPETITIVENESS OF RHIZOBIUM STRAINS IN CENTROSEMA UNDER CONTROLLED CONDITIONS

ABSTRACT - Two green-house experiments with a sand-vermiculite substrate were conducted to compare the efficiency of 11 *Rhizobium* strains with three centrosema species (*C. macrocarpum* CIAT 5065, *Centrosema* sp GC 312/79, and an interspecific hybrid between *C. pubescens*, *C. virginianum* and *C. brasilianum* (Itaguaí hybrid), and to study the competitiveness of four strains of *Rhizobium* in the Itaguaí hybrid. Strain C-106 isolated from *C. pubescens* was superior to the others in all centrosemas tested when inoculated as single strain. However, in the presence of strain C-551 (also isolated from *C. pubescens*) it did not cause the Itaguaí hybrid to nodulate, and formed only few nodules in a mixture with two other strains. The strain C-551, in spite of its low efficiency, has shown high competitiveness and formed from 70% to 100% of the nodules when inoculated in a mixture with three strains. Among the centrosemas studied, the Itaguaí hybrid was superior in nodulation, growth, and nitrogen fixation.

Index terms: nitrogen fixation, forrage legumes, inoculation.

INTRODUÇÃO

Observou-se em vários trabalhos (Döbereiner 1971, Lopes et al. 1972, Norris 1966, 1972), que leguminosas tropicais não necessitam ser submetidas a inoculação, em parte por não serem específicas em relação a determinada espécie de *Rhizobium*, em parte porque estirpes capazes de nodulá-las são amplamente encontradas nos solos tropicais.

Algumas espécies e cultivares de gêneros considerados previamente como promíscuos, no entanto, apresentam grande especificidade (Norris 1958,

Trinick 1968, Campêlo & Döbereiner 1969). Para *Centrosema* em particular, altos graus de especificidade foram encontrados, a ponto de variações de nodulação dentro de linhagens serem descritas (Bowen 1959, Bowen & Kennedy 1961, Franco et al. 1973, Serpa & De-Polli 1976). Esta especificidade faz com que sejam necessários trabalhos paralelos de avaliação com estirpes pré-selecionadas ou com nova seleção de estirpes, quando da introdução ou melhoramento de genótipos desta forrageira.

Neste trabalho, são discutidos dois experimentos, nos quais estudou-se a especificidade de três novas introduções de centrosema e onze estirpes de *Rhizobium*, bem como a competitividade de quatro destas estirpes entre si por sítios de nodulação.

MATERIAL E MÉTODOS

Experimento 1: Seleção de estirpes de *Rhizobium* para *Centrosema* spp.

Foram usados três materiais de *Centrosema*: o híbrido

¹ Aceito para publicação em 17 de abril de 1985.

² Eng. - Agr., M.Sc., EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (CNPGC), Caixa Postal 154, CEP 79100 Campo Grande, MS.

³ Eng. - Agr., M.Sc., EMBRAPA/CNPGC.

⁴ Eng. - Agr., Ph.D., EMBRAPA/Unidade de Apoio ao Programa Nacional de Pesquisa em Biologia do Solo, km 47, CEP 23460 Seropédica, RJ.

sintético Itaguaí, obtido do cruzamento de *C. pubescens* X *C. virginianum* X *C. brasilianum*, o *C. macrocarpum* CIAT 5065, e o ecótipo nativo dos cerrados, não classificado, GC 372/79.

Usaram-se onze estirpes de *Rhizobium* (Tabela 1), quatro delas oriundas da UAPNPBS/EMBRAPA, km 47, RJ, isoladas de *C. pubescens*, e as restantes em viagem de coleta realizada na região do vale do rio Araguaia, pelos estados de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás, isoladas de solos onde cresciam centrosemas nativos.

Fizeram-se três repetições por tratamento, considerando-se cada estirpe e planta um tratamento; usaram-se ainda dois tratamentos-testemunhas sem inoculação: um, adubado com 700 mg de N mineral, e outro, sem adubação. Como fonte de N mineral nas testemunhas, usou-se NH_4NO_3 , fazendo-se aplicação parcelada em quatro vezes de 200, 200, 200 e 100 mg/vaso aos 15, 30, 40 e 45 dias após o plantio, respectivamente.

O experimento foi instalado em vasos de Leonard (Vincent 1970), usando-se como substrato 500 g da mistura 2:1 de vermiculita e areia, esterilizada em autoclave.

Fez-se irrigação constante durante o período experimental com solução nutritiva sem nitrogênio, como descrito por Vincent (1970).

Em cada vaso, foi transplantada uma semente pré-germinada em estufa a 30°C, previamente desinfetada e escarificada com H_2SO_4 concentrado por 20 minutos, e lavagens sucessivas com água deionizada estéril. Fez-se inoculação, ao plantio, das estirpes em teste, através de dispersão sobre a semente de 1 ml de calda inoculante contendo, em média, para todas as estirpes, 10^8 células viáveis por ml de calda.

Por ocasião do plantio, foram adicionados, em todos os tratamentos, 15 mg de NH_4NO_3 , visando fornecer su-

porte nitrogenado até o início da fixação efetiva que, segundo observações preliminares, começa entre 20 e 30 dias após o plantio.

Os tratamentos foram distribuídos ao acaso, mantidos sobre mesas em casa-de-vegetação e trocados casualizadamente duas vezes no decorrer do experimento.

Aos 55 dias após o plantio, foi feita a coleta, cortando-se as plantas à altura do colo e separando-se parte aérea e raízes; a parte aérea foi deixada em estufa a 70°C, até secagem completa, determinando-se a produção de matéria seca e o seu conteúdo em N total pelo método Kjeldhal, como descrito por Bremner (1965).

Os nódulos foram destacados das raízes e pesados após secagem a 105°C, até peso constante.

Experimento 2: Competição de estirpes por sítios de nodulação no híbrido Itaguaí.

O híbrido Itaguaí recebeu inoculação com quatro estirpes individuais (C-551, C-106, CEN GG 26 e CEN GC 29), seis misturas destas estirpes combinadas duas a duas, uma mistura das quatro estirpes individuais, e dois tratamentos-testemunhas: um com e outro sem N mineral, como descrito no experimento 1, totalizando treze tratamentos.

Foram usadas para cada tratamento em que a inoculação foi individual, sem mistura, 10^8 células viáveis/vaso. Nos tratamentos com mistura de duas estirpes, cada estirpe participou com 10^4 células viáveis/vaso e, no tratamento com mistura das quatro estirpes, cada uma participou com 10^2 células viáveis/vaso. A condução deste experimento foi semelhante à do anterior, excetuando-se a etapa relacionada à identificação das estirpes nos nódulos.

De cada repetição foram tomados, casualizadamente, dez nódulos secos, e fez-se a identificação, por sorologia,

TABELA 1. Local de origens das estirpes nativas de *Rhizobium* e algumas características dos solos de origem e das estirpes.

| Estirpes | Origem | Características químicas do solo | | | | Crescimento em meio de cultura ácido ^a | Crescimento em meio de cultura com sulfato de estreptomicina (mg/l) ^b |
|-----------|--------------------------|----------------------------------|------|------|------|---|--|
| | | pH | Al | Ca | Mg | | |
| CEN GC 26 | Cáceres, MT | 5,64 | 0,28 | 7,66 | 2,26 | + | 60 |
| CEN GC 28 | Barra do Garças, MT | nd | nd | nd | nd | + | 30 |
| CEN GC 29 | S. Félix do Araguaia, MT | nd | nd | nd | nd | + | 45 |
| CEN GC 30 | Água Boa, MT | 5,01 | 0,92 | 0,31 | 0,22 | + | 45 |
| CEN GC 36 | Barra do Garças, MT | 5,04 | 0,46 | 1,38 | 0,76 | + | 45 |
| CEN GC 42 | Guerova, MT | 5,12 | 0,61 | 0,56 | 0,33 | + | 30 |
| CEN GC 45 | Itapiraporã, MT | 5,19 | 0,46 | 0,34 | 0,18 | + | 60 |

nd - Não determinado

+ - Crescimento semelhante ao da testemunha, sem condições limitantes, pH = 7

a - Meio líquido, como descrito por Keyser & Munns (1979), com adição de 50 ppm de Al, como $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ e pH = 4,8

b - Nível no qual o crescimento foi semelhante ao da testemunha sem estreptomicina.

da estirpe presente, usando a técnica de imunoaglutinação como resumida por Miranda (1983).

RESULTADOS

Experimento 1: Seleção de estirpes de *Rhizobium* para *Centrosema* spp.

Peso seco de nódulos

No ecótipo GC 372/79, a estirpe C-106 foi superior às demais, seguida da ARG-9. No híbrido Itaguaí, as duas não diferiram entre si, e foram superiores às demais, e, na cultivar CIAT 5065, as estirpes C-106, ARG-9, C-100 e CEN GC 29 não diferiram entre si, e foram superiores às demais (Tabela 2).

Peso seco da planta

O híbrido Itaguaí produziu 24% a mais de matéria seca em comparação com o ecótipo GC 372/79, e este produziu 107% a mais, em relação à cultivar CIAT 5065.

Os materiais, quando inoculados com a estirpe C-106, apresentaram maior produção de peso seco. O efeito desta estirpe no híbrido Itaguaí foi 110%

superior ao demonstrado pela testemunha com N mineral, e não diferiu deste tratamento nos outros dois materiais (Tabela 2).

Nitrogênio total

O híbrido Itaguaí produziu 40% e 150% de N a mais do que o ecótipo GC 372/79 e a cultivar CIAT 5065, respectivamente, e o efeito da estirpe C-106 foi significativamente superior às demais estirpes, independentemente dos materiais estudados (Tabela 2).

Eficiência relativa (Er)

Eficiência relativa é a relação percentual entre o N-total do tratamento com inoculação, em comparação ao N-total da testemunha sem inoculação e adubada com N mineral. Esta testemunha tem seu N-total considerado como valor 100.

A estirpe C-106 mostrou no híbrido Itaguaí uma Er igual a 150, e no ecótipo GC 372/79 e na cultivar CIAT 5065 foi de 103 e 82, respectivamente (Tabela 2).

Eficiência simbiótica (Es)

Eficiência simbiótica é o parâmetro definido

TABELA 2. Efeito de estirpes de *Rhizobium* na nodulação e no desenvolvimento das centrosemas GC 372/79, Itaguaí e CIAT 5065. Cada valor é média de três repetições.

| Estirpe ^a | Peso seco de nódulos (mg/pl) | | | Peso seco planta (g/pl) | | | N-total planta (mg/pl) | | | Eficiência relativa (%) | | |
|-----------------------------|------------------------------|----------------------|------------------------|-------------------------|---------|-----------|------------------------|---------|-----------|-------------------------|---------|-----------|
| | GC 372/79 ^d | Itaguaí ^d | CIAT 5065 ^d | GC 372/79 | Itaguaí | CIAT 5065 | GC 372/79 | Itaguaí | CIAT 5065 | GC 372/79 | Itaguaí | CIAT 5065 |
| C-551 ^a | 51 | 57 | 48 | 1,02 | 0,65 | 0,52 | 22 | 18 | 12 | 43 | 30 | 70 |
| C-106 ^a | 190 | 275 | 45 | 2,53 | 3,04 | 0,61 | 54 | 81 | 14 | 103 | 150 | 82 |
| C-100 ^a | 48 | 43 | 44 | 0,42 | 0,64 | 0,45 | 4 | 15 | 10 | 8 | 28 | 59 |
| ARG-9 ^a | 117 | 218 | 58 | 0,88 | 1,55 | 0,47 | 14 | 28 | 11 | 27 | 51 | 65 |
| CEN GC 28 | 24 | 47 | 30 | 0,67 | 1,11 | 0,63 | 15 | 30 | 12 | 29 | 55 | 70 |
| CEN GC 28 | 0 | 42 | 0 | 0,43 | 0,80 | 0,22 | 9 | 8 | 2 | 17 | 15 | 12 |
| CEN GC 29 | 30 | 49 | 43 | 0,72 | 1,32 | 0,56 | 15 | 20 | 10 | 29 | 37 | 59 |
| CEN GC 30 | 0 | 0 | 0 | 0,31 | 0,72 | 0,38 | 2 | 9 | 6 | 4 | 17 | 35 |
| CEN GC 36 | 0 | 0 | 0 | 0,25 | 0,65 | 0,46 | 2 | 10 | 5 | 4 | 19 | 29 |
| CEN GC 42 | 63 | 71 | 26 | 0,78 | 1,05 | 0,29 | 12 | 24 | 4 | 23 | 44 | 23 |
| CEN GC 45 | 68 | 76 | 27 | 1,08 | 1,09 | 0,45 | 24 | 20 | 9 | 46 | 37 | 52 |
| Testemunha + N ^b | 0 | 0 | 0 | 2,28 | 1,45 | 0,44 | 52 | 54 | 17 | 100 | 100 | 100 |
| Testemunha ^c | 0 | 0 | 0 | 0,36 | 0,61 | 0,18 | 5 | 10 | 2 | 10 | 19 | 12 |
| Fontes de variação | F ^a | | | F ^a | | | F ^a | | | F | | |
| Centrosema (C) | 42** | | | 52** | | | 149** | | | 27** | | |
| Estirpe (E) | 133** | | | 119** | | | 101** | | | 43** | | |
| C x E | 10** | | | 13** | | | 20** | | | 5** | | |
| CV (%) | 18 | | | 23 | | | 32 | | | 28 | | |

^a Dados originais transformados em $\sqrt{n+1}$

^b Testemunha sem inoculação, adubada com 700 mg NO₃NH₄ parcelada em quatro aplicações

^c Testemunha sem inoculação, sem adição de N mineral

^d GC 372/79 (*Centrosema* sp) Itaguaí (*C. pubescens* x *C. virginianum* x *C. brasilianum*); CIAT 5065 (*C. macrocarpum*)

^e Estirpes isoladas de *C. pubescens*; demais estirpes ver Tabela 1.

^f Percentual de N - total em relação a testemunha + N (700 mg/vaso).

pela regressão obtida entre o logaritmo decimal do N-total da planta sobre seu peso seco de nódulos, e que permite avaliar a quantidade de N fixado por unidade de tecido nodular (Döbereiner et al. 1966).

Foi encontrada correlação altamente significativa de $r = 0,85$ com coeficiente de regressão $b = 0,25$, ou seja, cada mg de nódulos proporcionou acréscimo de 0,25 mg de N-total, independentemente da estirpe ou variedade usada.

Experimento 2: Competição de estirpes por sítios de nodulação no híbrido Itaguaí.

Os resultados deste experimento podem ser visto na Tabela 3.

A estirpe C-106, como no experimento 1, proporcionou significativamente maior peso de nódulos ($p < 0,05$) e N-total do que as outras estirpes estudadas neste experimento.

As estirpes CEN GC 26 e 29, quando submetidas a inoculação cada uma junto com estirpe C-106, mostraram maior peso de nódulos do que as inoculações isoladas daquelas estirpes, apesar de não se observarem aumentos no N acumulado. Por outro lado, todos os nódulos formados no tratamento com mistura das estirpes C-551 e C-106 foram formados apenas pela primeira estirpe, como pode ser observado na percentagem de ocorrência das estirpes identificadas nos nódulos amostrados (Tabela 3).

DISCUSSÃO

O híbrido de centrosema Itaguaí produziu maior nodulação e N-total do que os outros dois materiais usados neste experimento, CIAT 5065 e GC 372/79 (Tabela 2). Atualmente, a cultivar CIAT 5065 tem sido considerada como o centrosema que melhor se adaptou aos cerrados na Colômbia (Bradley et al. 1983) e no Brasil.

A estirpe C-106, isolada de plantas de *Centrosema pubescens*, foi a que melhores resultados apresentou, independentemente dos materiais de centrosema e dos parâmetros avaliados no experimento 1 (Tabela 2). Em outras avaliações, em que se usou um solo LVE intermediário para areia quartzosa da região dos cerrados, com escassa população de *Rhizobium* capaz de nodular *Centrosema*, a estirpe C-106 manteve, no híbrido Itaguaí, uma alta eficiência relativa (ER = 109) em comparação à testemunha adubada com 100 kg/ha de N:

Entretanto, além da eficiência de uma estirpe, é necessário conhecer outras características condicionantes de seu efetivo estabelecimento no campo, como a sua capacidade de competir com estirpes já estabelecidas no solo por sítios de nodulação e seu potencial saprofítico (Freire et al. 1983). Isto é evidenciado nos resultados do experimento 2 (Tabela 3). Fazendo-se o reconhecimento da pre-

TABELA 3. Nodulação, N-total e percentagem de ocorrência de estirpes de *Rhizobium* inoculadas no híbrido Itaguaí, individualmente ou em mistura. Cada valor é média de três repetições.

| Estirpes | Peso seco de nódulos** (mg/pl) | N-total (mg N/pl)** | Ocorrência das estirpes nos nódulos* |
|-------------------------------|--------------------------------|---------------------|--------------------------------------|
| C-551 | 92 c | 16,1 bc | 100% C-551 |
| C-106 | 270 a | 81,1 a | 100% C-106 |
| GC 26 | 40 e | 26,9 b | 100% GC 29 |
| C-551 + C-106 | 37 e | 21,4 b | 100% GC 551 |
| C-551 + GC 26 | 85 cd | 19,1 bc | 100% GC 551 |
| C-551 + GC 29 | 74 cd | 32,1 b | 70% C-551 + 30% GC 29 |
| C-106 + GC 26 | 116 b | 30,0 b | 60% C-106 + 40% GC 26 |
| C-106 + GC 29 | 111 b | 23,2 b | 20% C-106 + 80% GC 29 |
| GC 26 + GC 29 | 70 d | 19,5 bc | 60% GC 26 + 40% GC 29 |
| C-551 + C-106 + GC 26 + GC 29 | 48 e | 18,8 bc | 85% C-551 + 10% C-106 + 5% GC 29 |
| Testemunha + N | 0 | 32,0 b | 0 |
| Testemunha | 0 | 4,9 c | 0 |

* Foram analisados 30 nódulos, tomando-se dez de cada repetição em cada tratamento.

** Em cada coluna, números com mesmas letras não diferiram estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade.

sença de cada estirpe individualmente nos nódulos após a coleta, verificou-se que a estirpe C-106 foi incapaz de formar nódulos na presença da estirpe C-551; na presença da CEN GC 29, formou 20% do total de nódulos; na presença da CEN GC 26, formou 60%, e submetida a inoculação com as três em conjunto formou apenas 10% do total de nódulos. Dessa forma, a estirpe mais eficiente nos três centrosemas estudados mostrou-se pouco competitiva quando na presença de outras estirpes.

Sua introdução em uma área poderia ser comprometida, dependendo da existência e da capacidade competitiva de estirpes nativas capazes de nodular centrosema.

A estirpe C-551, embora pouco eficiente, foi igualmente capaz de nodular os três centrosemas e mostrou-se altamente competitiva.

Ela foi capaz de inibir totalmente a formação de nódulos pelas estirpes C-106 e CEN GC 26, e predominou significativamente sobre a CEN GC 29 e sobre as três estirpes quando submetida a inoculação conjuntamente.

Os resultados obtidos confirmam mais uma vez a complexidade da interação *Rhizobium* - *Centrosema*. É evidenciada a necessidade de trabalhos paralelos com ambos os simbiontes, para se estabelecer com segurança uma estirpe ou conjunto de estirpes como padrão para inoculante. É particularmente importante o conhecimento do potencial competitivo das estirpes escolhidas.

REFERÊNCIAS

- BOWEN, G.D. Specificity and nitrogen fixation in the *Rhizobium* symbiosis of *Centrosema pubescens* Benth. *Queensl. J. Agric. Sci.*, 16(4):267-82, 1959.
- BOWEN, G.D. & KENNEDY, M.M. Heritable variation in nodulation of *Centrosema pubescens* Benth. *Queensl. J. Agric. Sci.*, 18:161-71, 1961.
- BRADLEY, R.S.; AYARZA, M.A.; MENDEZ, J.E. & MORRIONES, R. Use of undisturbed soil cores for evaluation of *Rhizobium* strains and methods for inoculation of tropical forage legumes in a Colombian Oxisol. *Plant Soil*, 74:237-47, 1983.
- BREMNER, J.M. Total nitrogen. In: BLACK C.A., ed. *Methods of soil analysis*. Madison, Am. Soc. Agron., 1965. part. 2, cap. 83, p.1149-78.
- CAMPÊLO, A.B. & DÖBEREINER, J. Estudo sobre inoculação cruzada de algumas leguminosas florestais. *Pesq. agropec. bras. Sér. Agron.*, Rio de Janeiro, 4: 67-72, 1969.
- DÖBEREINER, J. Inoculação cruzada e eficiência da simbiose de leguminosas tropicais. In: DÖBEREINER, J.; EIRA, P.A. da; FRANCO, A.A. & CAMPÊLO, A. B., eds. *As leguminosas na agricultura tropical*. Rio de Janeiro, IPEACS, 1971. p.181-91.
- DÖBEREINER, J.; ARRUDA, N.B. de & PENTEADO, A. de F. Avaliação da fixação do nitrogênio em leguminosas pela regressão do nitrogênio total das plantas sobre o peso dos nódulos. *Pesq. agropec. bras.*, Rio de Janeiro, 1:233-7, 1966.
- FRANCO, A.A.; SERPA, A. & SOUTO, S.M. Simbiose de estirpes homólogas com linhagens de *Centrosema pubescens*. *Pesq. agropec. bras. Sér. Zoot.*, 8:13-7, 1973.
- FREIRE, J.R.J.; KOLLING, J.; VIDOR, C.; PEREIRA, J. S.; KOLLING, I.G. & MENDES, N.G. Sobrevivência e competição por sítios de nodulação de estirpes de *Rhizobium japonicum* na cultura da soja. *R. bras. Ci. Solo*, 7:47-53, 1983.
- KEYSER, H.H. & MUNNS, D.N. Tolerance of rhizobia to acidity, aluminum, and phosphate. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 43(3):518-23, 1979.
- LOPES, E.S.; LOVADINI, L.A.C.; GARGANTINI, H. & IGUE, T. Número mais favorável e eficiência de *Rhizobium* autóctone para soja perene e siratro em quatro grandes grupos de solos do Estado de São Paulo. *Bragantia*, 31(20):235-48, 1972.
- MIRANDA, C.H.B. Metodologia de avaliação de estirpes de *Rhizobium* em nódulos de leguminosas. Campo Grande, EMBRAPA-CNPQC, 1983. 24p. (EMBRAPA-CNPQC. Documentos, 12).
- NORRIS, D.O. A red strain of *Rhizobium* from *Latonia bainesii* Baker. *Aust. J. Agric. Res.*, 9:629-32, 1958.
- NORRIS, D.O. The legumes and their associated *Rhizobium*. In: DAVIES, E., ed. *Tropical legumes*. London, 1966. p.89-105.
- NORRIS, D.O. Leguminous plants in tropical pastures. *Trop. Grassl.*, 6(3):159-69, 1972.
- SERPA, A. & DE-POLLI, H. Variabilidade genética da simbiose *Centrosema* - *Rhizobium*. *Pesq. agropec. bras. Sér. Zoot.*, Rio de Janeiro, 11(5):29-32, 1976.
- TRINICK, M.J. Nodulation of tropical legumes. I. Specificity in the *Rhizobium* symbiosis of *Leucaena leucocephala*. *Exp. Agric.*, 4:243-53, 1968.
- VINCENT, J.M. A manual for the practical study of the root nodule bacteria. s.l., Blackwell Sci., 1970. 1964p.