

# SELEÇÃO DE RIZÓBIO PARA *LOTUS PEDUNCULATUS* EM SOLO ÁCIDO<sup>1</sup>

EDEMAR BROSE<sup>2</sup>

**RESUMO** - Trabalho realizado em laboratório e casa de vegetação. Teve como objetivo selecionar estirpes de *Rhizobium* sp. em *Lotus pedunculatus* para condições ácidas. Treze estirpes de rizóbio foram testadas quanto ao crescimento em meio líquido com pH 4,5, 4,7, 4,9 e 5,2. O limite de tolerância para as estirpes testadas foi pH 4,7 com apenas duas delas apresentando crescimento neste pH (EEL 7784 e 7984). No pH 5,2 todas as estirpes cresceram. Em casa de vegetação, estas estirpes foram testadas num Latossolo Bruno distrófico (Haplohumox) em pH 5,1. Nestas condições, evidenciaram-se dois grupos distintos de estirpes quanto à eficiência simbiótica com base na nodulação, produção de matéria seca e acúmulo de nitrogênio na parte aérea. As estirpes mais eficientes foram a SEMIA 839, USDA 3469, EEL 883, 1083, 4284 e 4484. Uma estirpe EEL 40 - de mesma origem da USDA 3469 (=CC 814s) - e a USDA 3470 apresentaram boa nodulação, no entanto, foram ineficientes. Como estas duas estirpes são reconhecidamente eficientes, os resultados obtidos sugerem uma provável perda da eficiência.

Termos para indexação: *Rhizobium*, pH.

## RHIZOBIA SELECTION FOR *LOTUS PEDUNCULATUS* IN ACID SOIL

**ABSTRACT** - A laboratory and glasshouse trial was conducted with the aim of selecting *Rhizobium* sp. for *Lotus pedunculatus* in acid conditions. Thirteen rhizobia strains were tested for their growing capacity in liquid media with pH 4.5, 4.7, 4.9 and 5.2. The limiting pH for these strains was 4.7, with only two strains growing in this pH (EEL 7784 and 7984). In pH 5.2 all the strains grew. In glasshouse these strains were tested in a Haplohumox soil with pH 5.1. In this soil it was possible to distinguish two groups of strains by their symbiotic efficiency based on nodulation, dry matter production and nitrogen accumulation in the shoot. The most efficient strains were SEMIA 839, USDA 3469, EEL 883, 1083, 4284 and 4484. The strain EEL 40 - with the same origin as USDA 3469 (=CC 814s) - and the strain USDA 3470 produced good nodulation but they were inefficient. Since these strains are considered efficient, this result suggest a possible loss of their efficiency.

Index terms: *Rhizobium* sp., pH.

## INTRODUÇÃO

A consorciação de gramíneas forrageiras com uma leguminosa é indiscutivelmente mais vantajosa devido a sua melhoria na qualidade desta pastagem, bem como no incremento do N através da simbiose *Rhizobium*/leguminosa. Além das espécies de trevo-branco, trevo-vermelho e cornichão, já tradicionalmente conhecidas, é importante a busca de novas alternati-

vas em espécies de leguminosas que apresentem boa adaptação às condições de solo, especialmente ácidos. Nestas condições de solo com baixo pH, deve ser assegurada também uma boa nodulação da leguminosa para que não seja prejudicado o seu potencial de fixação do N<sub>2</sub>. Tem sido observado que em solos com presença de Al e Mn a nodulação em leguminosas é ausente, ou, se ocorre, é geralmente ineficiente (Cabeda & Freire 1968, Scholles et al. 1981, Vidor et al. 1983).

A espécie *Lotus pedunculatus* tem sido utilizada com sucesso em solos úmidos e ácidos na Nova Zelândia e nos Estados Unidos (Levy 1970, Lambert et al. 1974). Na Escócia, esta planta tem demonstrado bom potencial em so-

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 28 de julho de 1991.

Trabalho conduzido na Estação Experimental da EMPASC em Lages, financiado pela EMBRAPA e convênio FINEP (PADCT)/EMPASC.

<sup>2</sup> Eng.-Agr., M.Sc., EMPASC/Estação Experimental de Lages, Caixa Postal 181, CEP 88500 Lages, SC.

los montanhosos úmidos, inclusive solos turfosos (Charlton 1975).

Foi constatado por Brock (1973) que o *L. pedunculatus* teve menor rendimento de matéria seca do que o trevo-branco em alto nível de P, porém no baixo nível de P superou o trevo-branco em 30%. Nordmeyer & Davis (1977) observaram também que as quantidades de P exigidas para o máximo crescimento do trevo-branco foi o dobro do exigido pelo *L. pedunculatus* e, depois de bem estabelecido, a produção de matéria seca desta espécie foi de três a dez vezes maior que do trevo-branco. Estes mesmos autores constataram, ainda, que o trevo-branco teve maior proporção e teor de Al transportado para a parte aérea do que o *L. pedunculatus*.

As estirpes de rizóbio para o *L. pedunculatus* apresentam uma característica diferente das estirpes para o cornichão (*L. corniculatus*), que são conhecidas por terem um crescimento rápido e como acidificantes do meio padrão de Vincent (1975). Elas são de crescimento mais lento e alcalinizantes do meio, ocorrendo também do tipo acidificante (crescimento mais rápido). Wood & Cooper (1985) estudaram estes dois tipos de rizóbio quanto à tolerância a pH e Al, e ambos os tipos foram mais tolerantes a 50  $\mu\text{M}$  de Al no pH 5,5 do que as estirpes de rizóbio para trevo-branco. Porém no pH 4,5, as estirpes de crescimento lento para esta espécie não se desenvolveram (Cooper 1982, Cooper et al. 1985).

Quanto à população de rizóbio no solo para o *Lotus*, foi constatado por Greenwood & Pankhurst (1977) que nos solos da Nova Zelândia as estirpes para *L. pedunculatus* ocorrem com muito mais frequência e mais distribuídas do que as de cornichão. Nas condições do Planalto de Santa Catarina constata-se exatamente o inverso. Isto ocorre, provavelmente, porque esta espécie ainda não é de uso corrente pelos produtores como ocorre na Nova Zelândia. Desta forma, uma boa seleção de estirpes e a recomendação de infectar as sementes para esta espécie tornam-se imprescindíveis.

O objetivo deste trabalho foi de selecionar estirpes de rizóbio para *L. pedunculatus* que sejam eficientes em fixar  $\text{N}_2$  simbioticamente e com boa capacidade de nodular a planta em condições de baixo pH.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram testadas treze estirpes de *Rhizobium* sp. para *L. pedunculatus* cv. Maku em laboratório quanto a tolerância a pH e em casa de vegetação em solo quanto ao potencial de fixação simbiótica do  $\text{N}_2$ . As estirpes utilizadas no experimento, com sinônimo EEL, são isolamentos a partir de nódulos provenientes da região do Planalto do estado de Santa Catarina; a estirpe EEL 40 (=NPZ 2307) foi recebida da Nova Zelândia (=CC 814, Austrália); as estirpes USDA 3469 e USDA 3470 foram recebidas da USDA Belville Rhizobium Culture Collection, Estados Unidos (=ATCC 33669, Marrocos) e a SEMIA 839 foi recebida da Coleção de Culturas do IPAGRO/MIRCEN, Porto Alegre, RS (=NZP 2021, Nova Zelândia).

No laboratório, as estirpes foram testadas em meio líquido segundo Keyser & Munns (1979) em quatro níveis de pH: 4,5, 4,7, 4,9 e 5,2. O P do meio foi usado numa concentração de 10  $\mu\text{M}$  e para o tamponamento deste meio foi usado o glutamato de sódio na concentração e 1,8 g/l, após ter sido autoclavado separadamente. As estirpes bacterianas, depois de desenvolvidas em meio de ágar-manitol com extrato de levedura segundo Vincent (1975), foram suspensas em água estéril a uma concentração de dez a dez células/ml e adicionada uma gota em 5 ml de meio em cada um dos tratamentos. Após sete dias de incubação foi feita observação visual da turbidez do meio para avaliar o crescimento das estirpes.

Em casa de vegetação, foi usado um Latossolo Bruno distrófico (unidade de mapeamento Vacaria). Foi feita uma correção do solo com aplicação do equivalente a 6 t/ha de  $\text{CaCO}_3 + \text{MgCO}_3$  na proporção de 3:1 e uma adubação (em mg/vaso) de 198 de P ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), 400 de K (KCl), 130 de S ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) e 1,36 de Mo ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ). As condições originais da fertilidade do solo eram de pH 4,8, 1 ppm de P, 4,2 meq/100  $\text{cm}^3$  de Al e 6% de matéria orgânica. No final do experimento, o solo estava com pH 5,1, P 6,5 ppm e Al 0,9 meq/100  $\text{cm}^3$ .

As sementes foram desinfectadas com hipoclorito de sódio a uma concentração de 1,7% do princípio ativo do Cl e pré-germinadas em placa. As sementes

pré-germinadas foram transplantadas para vasos, mantendo-se quatro plantas por vaso. O delineamento experimental foi de blocos com sorteio sistemático dos vasos a cada dois ou três dias, com quatro repetições.

Além das treze estirpes bacterianas testadas em casa de vegetação, foram adicionados mais dois tratamentos sem inoculação: um, sem N mineral, e outro, com adição de 425 mg de N/vaso na forma de  $NH_4NO_3$ . Este N foi parcelado em quantidades de 25 mg/vaso a intervalos de uma semana, iniciando-se as aplicações a partir de 26 dias após a implantação do experimento. As variáveis observadas foram produção de matéria seca, percentagem de N e N total no tecido da parte aérea em três cortes (78, 107 e 148 dias após o transplante). No último corte fez-se também a avaliação da nodulação.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados na Tabela 1, observa-se que a faixa limitante de pH para o rizóbio de *L. pedunculatus* está entre 4,7 a

**TABELA 1.** Tolerância a pH de estirpes de *Rhizobium* sp. para *Lotus pedunculatus* em meio líquido segundo Keyser & Munns (1979) e reação de pH em meio sólido com manitol e extrato de levedura (YMA).

Estirpes	pH do meio				PP YMA
	5,2	4,98	4,7	4,5	
NZP 2307 (=CC 814s)	+	+/-	-	-	Al
EEL 40 (=CC 814s)	+	-	-	-	Al
EEL 39 (=NZP 2021)	+	-	-	-	Al
EEL 4284	+	+	-	-	N
EEL 4484	+	-	-	-	Al
EEL 8084	+	+	-	-	Ac
EEL 7984	+	+	+	-	Ac
EEL 7784	+	+	+	-	Ac
EEL 1183	+	+	-	-	Al
USDA 34369 (=CC 814s)	+	-	-	-	Al
USDA 3470 (=ATCC 33669)	+/-	-	-	-	Al
EEL 7884	+/-	-	-	-	N
EEL 3583	+/-	-	-	-	Al

+ Crescimento pleno; +/- crescimento regular; - sem crescimento; N sem alteração no pH do meio; Al reação alcalina; Ac reação ácida.

4,9. Das treze estirpes testadas no pH 4,7, apenas duas cresceram (EEL 7784 e 7884). No pH 4,9, mais duas estirpes (EEL 8084 e 4284) cresceram bem, e duas (NZP 2307 e EEL 1183) cresceram razoavelmente. Também observou-se certa relação entre tolerância a pH e característica taxonômica de reação ácida ou alcalina no meio padrão de manitol e extrato de levedura. As estirpes de reação ácida tiveram a tendência de apresentar maior tolerância ao baixo pH, cujo resultado confirma as observações de Cooper (1982), ou seja, todas as estirpes de rizóbio para o *L. pedunculatus* de reação ácida por ele testadas foram tolerantes a baixo pH, e as de reação alcalina suscetíveis.

Os resultados da produção de matéria seca, percentagem de N e N total no tecido da parte aérea (Tabelas 2, 3 e 4 respectivamente) evidenciaram dois grupos bem distintos de estirpes, a partir do segundo corte, em termos de eficiência. Considerando o terceiro corte, quando as reservas de N mineralizado do solo já estavam esgotadas, as diferenças foram bem mais contrastantes. Das treze estirpes testadas, oito foram eficientes, e cinco, ineficientes.

As estirpes EEL 883, 4284 e 4484, comparadas com a SEMIA 839 - recomendada para produção de inoculante - tiveram uma tendência de maior produção de matéria seca e N total, mas as diferenças não foram estatisticamente significativas. A estirpe EEL 4284 foi 11% e 15% superior à SEMIA 839 em N total e produção de matéria seca, respectivamente, e com a vantagem de ser um pouco mais tolerante a baixo pH (Tabelas 1, 2 e 4).

As estirpes EEL 40 (=CC 814s), SEMIA 839 (=NZP 2021), USDA 3469 e USDA 3470 (=ATCC 33669) são estirpes reconhecidamente eficientes em *L. pedunculatus*; entretanto, observa-se, pelos resultados nas Tabelas 2, 3 e 4, que algumas delas perderam a eficiência. As estirpes EEL 40 e USDA 3469 têm a mesma origem - CC 814s - com a diferença de terem chegado ao presente destino por caminhos diferentes. A EEL 40 foi recebida da Nova Zelândia, enviada para Porto Alegre, e retornou novamente ao nosso laboratório.

**TABELA 2. Produção de matéria seca de *Lotus pedunculatus* cv. Maku em três cortes e peso de módulos no último corte inoculados com estirpes de *Rhizobium* sp. em solo com pH 5,1. Médias de quatro repetições.**

Estirpes	Produção de M.S. (g/vaso)				Peso de Nód. (g/vaso)
	1º corte	2º corte	3º corte	Soma	
EEL 40 (= CC 814s)	3,79 abc	1,30 de	0,90 e	5,98 g	0,92 d
SEMIA 839 (= NPZ 2021)	3,50 bcd	2,95 abc	5,62 ab	12,07 cd	1,43 bcd
EEL 883	3,91 abc	3,09 abc	5,73 a	12,73 abcd	1,49 bc
EEL 4284	4,16 ab	3,38 a	6,36 a	13,90 a	1,58 b
EEL 4484	3,94 abc	3,24 ab	6,16 ab	13,34 abc	1,43 bcd
EEL 3583	3,66 abcd	2,72 c	5,62 ab	12,00 d	1,90 b
EEL 8084	4,32 ab	1,24 ab	1,06 c	6,62 fg	0,22 e
EEL 7984	4,12 ab	1,41 de	0,90 e	6,43 fg	0,08 e
EEL 7784	4,26 ab	1,14 e	1,53 de	6,93 efg	0,96 cd
EEL 1083	3,59 abcd	2,89 bc	5,88 a	12,36 bcd	1,46 bcd
EEL 1183	3,10 cd	2,94 abc	5,51 d	11,54 d	1,40 bcd
USDA 3469 (= CC 814s)	2,90 d	3,00 abc	5,93 a	11,83 d	1,46 bcd
USDA 3470 (= ATCC 33669)	4,06 ab	1,51 d	2,47 c	8,22 e	2,54 a
Test.	4,06 ab	1,20 e	2,21 cd	7,47 ef	1,42 bcd
Test. + N*	4,46 a	3,40 a	5,82 a	13,63 ab	0,44 e

\* Aplicação de N (em mg/vaso) no 1º corte = 125; no 2º corte = 100 e no 3º corte = 205.

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ).

**TABELA 3. Percentagem de N no tecido da parte aérea de *Lotus pedunculatus* em três cortes inoculados com *Rhizobium* sp. em solo com pH 5,1. Médias de quatro repetições.**

Estirpes	1º corte	2º corte	3º corte	Soma
	----- % -----			
EEL 40 (= CC 814s)	2,94 a-e	1,94 fg	1,47 b	6,35 c
SEMIA 839 (= NPZ 2021)	3,44 ab	4,21 ab	3,25 a	10,90 a
EEL 883	3,16 abc	4,48 a	3,06 a	10,70 a
EEL 4284	3,18 abc	4,18 ab	3,10 a	10,46 a
EEL 4484	3,15 a-d	3,92 bc	3,25 a	10,32 a
EEL 3583	3,33 ab	3,69 c	3,33 a	10,35 a
EEL 8084	2,47 de	2,16 ef	1,84 b	6,47 c
EEL 7984	2,79 b-e	1,79 g	1,49 b	6,07 c
EEL 7784	2,50 cde	2,11 f	2,81 a	7,42 bc
EEL 1083	2,98 a-e	4,00 abc	3,33 a	10,31 a
EEL 1183	2,97 a-e	4,07 abc	3,13 a	10,17 a
USDA 3469 (= CC 814s)	3,68 a	4,16 abc	3,30 a	11,14 a
USDA 3470 (= CC 33669)	2,44 e	3,16 d	2,82 a	8,42 b
Test.	2,59 cde	2,33 e	3,31 a	8,23 b
Test. + N*	3,84 a	3,12 d	3,15 a	10,11 a

\* Aplicação de N (em mg/vaso) no 1º corte = 125; no 2º corte = 100 e no 3º corte = 205.

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ).

**TABELA 4.** Nitrogênio total no tecido da parte aérea de *Lotus pedunculatus* em três cortes inoculados com estirpes de *Rhizobium* sp. em solo com pH 5,1. Médias de quatro repetições.

Estirpes	1º corte	2º corte	3º corte	Soma
	----- mg/vaso -----			
EEL 40 (= CC 814s)	109 bcd	24 f	13 e	147 f
SEMIA 839 (= NPZ 2021)	117 bcd	125 ab	182 a	424 abc
EEL 883	124 bc	138 a	175 a	437 ab
EEL 4284	133 b	142 a	198 a	472 a
EEL 4484	124 bc	127 ab	199 a	450 ab
EEL 3583	119 bcd	100 d	187 a	406 bc
EEL 8084	104 bcd	27 f	19 de	150 f
EEL 7984	115 bcd	25 f	13 e	154 ef
EEL 7784	102 bcd	25 f	45 cd	172 def
EEL 1083	107 bcd	115 bcd	194 a	417 abc
EEL 1183	90 d	119 bc	171 a	380 c
USDA 3469 (= CC 814s)	108 bcd	124 bc	193 a	424 abc
USDA 3470 (= CC 33669)	98 cd	53 e	70 bc	221 d
Test.	105 bcd	28 f	72 b	205 de
Test. + N*	172 a	105 cd	182 a	460 ab

\* Aplicação de N (em mg/vaso) no 1º corte = 125; no 2º corte = 100 e no 3º corte = 205.

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ).

rio. A USDA 3469 foi recebida dos Estados Unidos, e sua eficiência foi semelhante à da SEMIA 839 em nodulação, produção de matéria seca e N total. A EEL 40 apresentou grande quantidade de nódulos, porém, pequenos e de coloração esbranquiçada, características de nódulos ineficientes, ao contrário do que ocorreu na USDA 3469, que se caracterizou por apresentar nódulos grandes, rosados e em menor número. A USDA 3470, embora tenha apresentado o maior peso de nódulos, foi ineficiente (Tabela 2). Estes resultados, não esperados, indicam a provável influência de algum fator causando a perda da eficiência destas estirpes. Em vista destes resultados, novos experimentos foram conduzidos em laboratório, cujos resultados serão discutidos em próximos números. A ocorrência de perda da eficiência de estirpes de rizóbio por mutações já tem sido reportada (Rolfe et al. 1980, Zurkowski 1982). Também tem sido constatado que os genes *nif*, responsáveis pela fixação simbiótica do  $N_2$ , estão localizados em plasmídeos da célula bacteriana (Zurkowski 1982, Mathis et

al. 1985, Leyva et al. 1987). Desta forma, qualquer alteração ou perda de algum destes plasmídeos poderá ocorrer em alteração ou perda de eficiência das estirpes.

O que se deseja no trabalho de seleção de estirpes de rizóbio é aliar as características de tolerância - como das estirpes EEL 7784 e 7984, que infelizmente foram ineficientes -, com as características de eficiência como da estirpe EEL 4284. Como as estirpes de rizóbio para *L. pedunculatus* possuem características bem variadas em termos de tempo de multiplicação das células e metabolismo em meio de cultura, é importante ter melhores conhecimentos com relação à competição entre estas estirpes, e acerca da especificidade hospedeira quando elas estão em mistura. A este respeito, já tem sido observado por Cooper et al. (1985) que estirpes de rizóbio de crescimento rápido, tolerantes a pH 4,5, e estirpes de crescimento lento, suscetíveis a pH 4,5, tiveram a mesma capacidade de nodular o *L. pedunculatus* em solução nutritiva a pH 4,5. Entretanto, quando estas estirpes de crescimento diferente, foram

usadas em mistura 1:1, as estirpes de crescimento rápido predominaram na formação dos nódulos tanto no pH 4,5 (93%) como no pH 6,7 (66%).

As estirpes mais eficientes identificadas neste trabalho também deveriam ser melhor estudadas quanto à capacidade de competição e sobrevivência nas condições de campo em diferentes níveis de pH.

### CONCLUSÕES

1. O presente estudo permitiu separar dois grupos bem distintos de estirpes quanto à eficiência de fixação simbiótica do N<sub>2</sub>. As estirpes mais eficientes, com base no N total, foram a SEMIA 839, a USDA 3469, a EEL 883, a 4284, a 4484 e a 1083.

2. A estirpe EEL 40 - de mesma origem da USDA 3469 - e a USDA 3470 sugerem a possível perda de eficiência.

### AGRADECIMENTOS

Ao colega Tássio Dresch Rech, M.Sc., pela revisão do texto e pelas sugestões.

### REFERÊNCIAS

- BROCK, J.C. Growth and nitrogen fixation of pure stands of three pasture legumes with high/low phosphate. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, v.16, n.6, p.483-491, 1973.
- CABEDA, M.S.V.; FREIRE, J.R.J. Informe preliminar sobre os efeitos da toxidez de Mn e Al sobre a nodulação e a fixação do nitrogênio em soja em solo do Rio Grande do Sul. In: REUNIÃO LATINO AMERICANA SOBRE INOCULANTES PARA LEGUMINOSAS, 4., 1968, Porto Alegre, RS. *Anais*. . . Porto Alegre: Secretaria da Agricultura/Fac. de Agron. e Veterinária, 1968. p.282-294.
- CHARLTON, J.F.L. The potential value of birdsfoot trefoils (*Lotus* spp.) for improvement of natural pastures in Scotland. 2. Marsh birdsfoot trefoil (*Lotus uliginosus* L.). *Journal of the British Grassland Society*, v.30, p.251-257, 1975.
- COOPER, J.E. Acid production, acid tolerance and growth rate of *Lotus rhizobia* in laboratory media. *Soil Biology & Biochemistry*, v.14, p.127-131, 1982.
- COOPER, J.E.; WOOD, M.; BJORSON, A.J. Nodulation of *Lotus pedunculatus* in acid rooting solution by fast-and slow-growing rhizobia. *Soil Biology & Biochemistry*, v.17, n.4, p.487-492, 1985.
- GREENWOOD, R.M.; PANKHURST, C.E. The *Rhizobium* component of the nitrogen-fixing symbiosis. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*, v.38, n.1, p.167-174, 1977.
- KEYSER, H.H.; MUNNS, D.N. Tolerance of rhizobia to acidity, aluminium, and phosphate. *Soil Science Society of America Journal*, v.43, p.519-523, 1979.
- LAMBERT, J.P.; BOYD, A.F.; BROCK, J.L. An evaluation of five varieties of *Lotus pedunculatus* Cav. compared with 'Grasslands Huia' white clover under grazing at Kaikohe. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, v.2, p.359-363, 1974.
- LEVY, E.B. *Grasslands of New Zealand*. 3.ed., Wellington: [s.n.], 1970. 374p.
- LEYVA, A.; PALACIOS, J.M.; RUIZ-ARGUESO, T. Conserved plasmid hydrogen-uptake (hup)-specific sequences within Hup + *Rhizobium leguminosarum* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, v.53, n.10, p.2539-2543, 1987.
- MATHIS, J.N.; BARBOUR, W.M.; ELKAN, G.H. Effect of *Sym* plasmid curing on symbiotic effectiveness in *Rhizobium fredii*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.49, n.6, p.1385-1388, 1985.
- NORDMEYER, A.H.; DAVIS, M.R. Legumes in high-country development. *Proceedings of New Zealand Grassland Association*, v.38, n.1, p.119-125, 1977.
- ROLFE, B.G.; GRESSHOFF, P.M.; SHINE, J.; VINCENT, J.M. Interaction between a non-nodulating and an ineffective mutant of *Rhizobium trifolii* resulting in effective (nitrogen-fixing) nodulation. *Applied and Environ-*

- mental **Microbiology**, v.39, n.2, p.449-452, 1980.
- SCHOLLES, D.; KOLLING, J.; FREIRE, J.R.J. Necessidade de inoculação e de aplicação do calcário em leguminosas forrageiras tropicais em solos ácidos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.5, n.2, p.97-102, 1981.
- VIDOR, C.; KOLLING, J.; FREIRE, J.R.J.; SCHOLLES, D.; BROSE, E.; PEDROSO, M. HT. **Fixação biológica do nitrogênio pela simbiose entre *Rhizobium* e legumi- nosas**. Porto Alegre: Inst. Pesq. Agron., 1983. 52p. (Bol. técnico, 11).
- VINCENT, J.M. **Manual práctico de rizobiología**. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 1975. 200p.
- ZURKOWSKI, W. Molecular mechanism for loss of nodulation properties of *Rhizobium trifolii*. **Journal of Bacteriology**, v.150, n.3, p.999-1007, 1982.
- WOOD, M.; COOPER, J.E. Screening clover and *Lotus* rhizobia for tolerance of acidity and aluminium. **Soil Biology & Biochemistry**, v.17, n.4, p.493-497, 1985.