

EFEITO DE EXTRATO RADICULAR SOBRE A NODULAÇÃO DE CAUPI¹

FÁBIO F. ARAÚJO² e JOSELITO S. MEDEIROS³

RESUMO - Foram estudados os efeitos do extrato de raiz de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) sobre a nodulação desta espécie em casa de vegetação. Duas estirpes de *Bradyrhizobium* (MAC-2 e RBGm-28) foram pré-tratadas com extrato, e testados os seus desempenhos simbióticos. O extrato radicular alterou significativamente algumas etapas do processo simbiótico na associação caupi RBGm-28. Neste caso, houve uma redução do número de nódulos formados e da massa nodular seca. O tempo de cultivo do inóculo influenciou significativamente a massa nodular seca e a área foliar das plantas.

Termos para indexação: caupi, bactéria, inóculo, fixação do N₂

EFFECT OF ROOT EXTRACT ON NODULATION OF COWPEA

ABSTRACT - This work studied the effects of root extract on nodulation of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) in the greenhouse. Two strains of *Bradyrhizobium* (MAC-2 and RBGm-28) were pre-tested with the extracts of cowpea roots, and their symbiotic performances were analysed. In the association cowpea/RBGm-28, the root extract influenced significantly some of the stages of the symbiotic process. In that case a decrease in the number of nodules formed and in nodule dry weights was observed. The time of inoculum culturing influenced significantly the dry weight and the plant leaf area.

Index terms: cowpea, bacteria, inoculum, N₂ fixation.

INTRODUÇÃO

Rhizobium e *Bradyrhizobium* são gêneros de bactérias do solo, hábeis a infectar e nodular uma ampla variedade de leguminosas, reduzindo nos nódulos o N atmosférico e liberando amônia, a qual é utilizada pela planta (Dart 1974). A fixação simbiótica de N é um processo de múltiplas etapas, e, apesar dos avanços alcançados no estudo deste fenômeno, resta muito a ser investigado sobre ele. Entre as etapas que necessitam ser claramente compreendidas estão as do reconhecimento entre os simbiotes e o desencadeamento do processo de infecção (Bhagwat & Thomas 1983).

Ultimamente, existe grande interesse em desvendar os mecanismos biológicos das etapas

iniciais do processo simbiótico, pela importância que têm na determinação da especificidade hospedeira e a competição entre as bactérias para nodulação. Muitos dos genes bacterianos necessários à nodulação estão presentes em grandes plasmídeos denominados *Sym* (Johnston et al. 1978). Estes plasmídeos contêm vários genes, que codificam a interação inicial e a nodulação, denominados genes *Nod* (Zaat et al. 1988).

Os genes *Nod* em *Rhizobium* são ativados por exsudatos radiculares, onde os indutores de um hospedeiro não são necessariamente idênticos aos de outros hospedeiros do mesmo grupo de inoculação cruzada (Peters & Long 1988). Do mesmo modo, alguns autores citam que uma espécie bacteriana de um grupo de inoculação cruzada pode ser induzida de alguma forma por compostos radiculares de uma espécie vegetal de um grupo diferente (Bhagwat & Thomas 1982).

Os compostos fenólicos vêm, atualmente, sendo identificados como substâncias indutoras das etapas iniciais da interação bactéria/legu-

¹ Aceito para publicação em 13 de setembro de 1991.

² No curso de agronomia, UFRPE, Dep. de Biologia, área de genética, Av. Manoel de Medeiros s/n. CEP 52071, Recife, PE. Bolsista do CNPq.

³ Bioquímico, Ph.D., Prof.-Adjunto, UFRPE, Dep. de Biologia, área de genética.

minosa (Innes et al. 1985 e Peters et al. 1986). Entre as variáveis estudadas na indução, destacam-se a concentração do extrato e o tempo de incubação do extrato com as bactérias noduladoras (Bhagwat & Thomas 1983).

Dentro deste contexto, o presente trabalho objetivou analisar a influência do extrato radicular na nodulação, e a eficácia das estirpes de *Bradyrhizobium* spp isoladas no nordeste, sob condições de casa de vegetação, objetivando a visualização agrônômica de uma técnica de pré-tratamento acessível aos produtores.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Departamento de Biologia da UFRPE, Recife, no período de Dezembro/1988 a Janeiro/1989. Foram utilizadas duas estirpes de *Bradyrhizobium* sp. MAC-2 e RBGM-28, da coleção do setor de Genética do Departamento de Biologia da UFRPE, isoladas e caracterizadas a partir de nódulos de caupi cv. IPA-202, e soja cv. Tropical, respectivamente. Foram determinados os tempos de geração das estirpes utilizadas no experimento, utilizando-se o método de diluição descrito por Vincent (1970).

O método utilizado para a obtenção do extrato radicular fundamentou-se, em algumas etapas, no descrito por Peters & Long (1988), porém foram feitas várias modificações, em face da não-utilização de substâncias puras, para a extração do produto da superfície radicular. Sementes de caupi foram esterilizadas superficialmente em etanol e 70%, por 5 minutos, seguido de hipoclorito de sódio a 0,5%, por 3 minutos. Logo após, foram efetuadas seis lavagens em água destilada e esterilizada (Vincent 1970). As sementes foram, então, transferidas para placas-de-petri com algodão umedecido em água destilada, sendo o conjunto esterilizado anteriormente em autoclave (121.C por 15 minutos). Após a incubação em ambiente escuro (30.C) por três dias, as pontas (5 mm) das radículas de dez plântulas foram cortadas assepticamente e transferidas imediatamente para um tubo de ensaio contendo 10 ml de água destilada estéril; a massa fresca de raiz utilizada somou 6,0 mg. O conteúdo foi agitado por dois minutos com bastão estéril, sendo feita pequena pressão na raiz contra a parede do tubo, sem, contudo, macerá-la totalmente. Logo em seguida, foi centrifugado a 5000 RPM durante cinco minutos. Fo-

ram retirados 5 ml do sobrenadante, o qual foi diluído dez vezes, ficando o Ph em 7,6; a pureza da solução final foi checada microscopicamente, para contaminação bacteriana. Da solução final foram retirados 0,4 ml para cada tubo contendo as estirpes a serem pré-tratadas, 24 horas antes da inoculação.

As estirpes cresceram em meio YM (Vincent 1970) a 20°C, por três, sete e dez dias em tubos com 4 ml de meio. Para o plantio foram utilizados vasos de Leonard contendo areia de rio lavada em água destilada até Ph constante. Os vasos foram esterilizados sob vapor a 121.C por uma hora, por duas vezes alternadas, e transferidos para casa de vegetação. O delineamento experimental usado foi de blocos ao acaso, com quatro repetições, sendo empregado o ensaio fatorial 2 x 3 x 2, com um total de 52 parcelas, incluindo os controles.

Para o plantio, utilizaram-se sementes esterilizadas e germinadas, conforme metodologia citada anteriormente, sendo feita a marcação da ponta da raiz com caneta a prova d'água. Foram plantadas duas plântulas por vaso, a uma profundidade de 3 cm, em seguida adicionou-se 1 ml do inóculo por plântula, cobrindo-as com areia umedecida. A cada três dias adicionou-se aos vasos solução nutritiva modificada de Norris (1964), isenta de N combinado. As adições de água foram feitas com base na diminuição do nível de água na parte inferior do vaso. A coleta do experimento deu-se aos 42 dias após o plantio.

Para determinação do peso de matéria seca, separou-se a parte aérea da raiz das plantas na altura do nó cotiledonar. A parte aérea foi secada em estufa a 70°C até alcançar peso constante. Determinou-se a distribuição espacial dos nódulos, e, posteriormente, foram separados da raiz, secados a 70°C, e, em seguida, pesados. O N total da parte aérea foi determinado pelo método semi-micro Kjeldahl modificado por Tedesco (1978). A área foliar, AF/Planta, foi mensurada com auxílio de régua métrica e aproximação do folíolo a um triângulo, estimando-se com amostragem de duas folhas do terço médio por planta.

O modelo estatístico usado na análise de variância foi:

$$Y_{ijkl} = \bar{X} + S_j + D_k + B_l + ES_{ij} + ED_{ik} + DS_{jk} + EDS_{ijk} + R_{ijkl},$$

onde Y_{ijkl} é o valor do tratamento l e estirpe j , na idade do inóculo k ; \bar{X} é a média geral; E_i mede o efeito do tratamento i ; S_j mede o efeito da estirpe j ; D_k mede o efeito da idade do inóculo k ; B_l mede o efeito do bloco l ; ES_{ij} , ED_{ik} , DS_{jk} e EDS_{ijk} medem os efeitos das interações, e R_{ijkl} é o erro associado com a observação $(ijkl)$.

A importância relativa dos componentes genéticos

de variabilidade simbiótica foi estimado segundo Mytton et al. (1977).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base na contagem de colônias, a partir das diluições do inóculo inicial, foram observados tempos de gerações de 13,6 horas para MAC-2 e 8 horas para RBGm-28. Os inóculos não foram padronizados nas diferentes idades (3, 7 e 10 dias); no tempo 0 apresentavam 2×10^4 bactérias/ml.

Na Tabela 1 é apresentada uma análise dos resultados obtidos. A análise do parâmetro matéria seca da parte aérea (MSPA) não demonstrou diferenças significativas nas médias

de todas as fontes. O pré-tratamento com extrato expressou, em suas médias, superioridades significativas com respeito à porcentagem de nódulos na raiz principal (% NRP) e à altura das plantas. Os efeitos da estirpe MAC-2 foram significativamente superiores aos da RBGm-28 em relação a números de nódulos, N total, área foliar e altura por planta, enquanto a estirpe RBGm-28 produziu significativamente maior massa nodular do que a estirpe MAC-2.

A idade do inóculo influenciou significativamente a massa nodular seca (MNS) e a área foliar (AF). O inóculo de dez dias produziu maior massa nodular seca por planta, e o inóculo de sete dias produziu a menor área foliar por planta. A concentração de 2×10^6 e 1×10^7 , bactéria/ml, para as estirpes MAC-2 e RBGm-28, respectivamente, observada no terceiro dia de crescimento do inóculo, foi sufi-

TABELA 1 - Efeito de extrato estirpe e idade de inóculo em vários parâmetros analisados na simbiose caupi x Bradyrhizobium. Média de 4 repetições.

Tratamento	Nº nódulos (nódulo x planta)	%nódulos na raiz principal	Massa no- dular seca (MG/planta)	Matéria seca parte aérea (G/PL.)	Nitrogênio total (MGN/PL.)	Área foliar (CM2/PL)	Altura (cm)
Extrato							
Radicular							
P.I.S.E. *	5.98 A	49.0 B	149.1 A	1.55 A	66.2 A	821.8 A	78.0 A
P.I.C.E. **	5.07 B	62.1 A	151.7 A	1.65 A	68.4 A	851.7 A	87.1 A
DMS (5%)	0.656	12.8	19.7	0.217	11.3	60.1	8.42
Estirpes							
MAC-2	6.12 A	50.5 A	128.1 B	1.53 A	78.7 A	923.0 A	90.4 A
RBGm-28	4.91 B	61.0 A	172.6 A	1.67 A	55.9 B	751.0 B	74.6 B
DMS (5%)	0.656	12.8	19.7	0.217	11.3	60.1	8.42
Inóculo							
(idade)							
3 dias	5.5 A	50.0 A	149.4 B	1.57 A	64.9 A	899.7 A	87.5 A
7 dias	5.42 A	60.2 A	129.9 B	1.55 A	61.1 A	755.3 B	80.9 A
10 dias	5.72 A	57.0 A	171.8 A	1.68 A	75.9 A	855.2 A	79.1 A
DMS (5%)	0.969	18.9	29.1	0.32	16.6	88.7	12.43
C.V.(%)	20.8	38.0	22.3	23.05	28.5	12.2	17.4

Na mesma coluna, o conjunto de duas ou três linhas com suas médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Conforme teste de Tukey, ao nível de 5%.

* Planta inoculada sem extrato.

** Planta inoculada com extrato.

ciente para promover o número máximo de nódulos/planta, resultado este coincidente com o encontrado por Bhuvanewari et al. (1988), no qual foi observado que a máxima resposta de nodulação por caupi foi a concentração entre 10^6 e 10^7 bactéria/planta. Nota-se, também, que o número de células por inóculo, superior para a estirpe RBGm-28 (crescimento mais rápido), não conseguiu superar a estirpe MAC-2 com relação ao número de nódulos por planta, o que mostra que a correlação simbiótica foi maior para o par homólogo (MAC-2 x Caupi), confirmando especificidade genética esperada.

O resultado encontrado, concernente ao efeito do tratamento com extrato radicular na percentagem de nódulos localizados na raiz principal (acima da marca na raiz), foi semelhante ao encontrado por Bhagwat & Thomas (1982) trabalhando com exsudato radicular de caupi e sua influência para estimular a nodulação acima da referida marca. Estes autores citam que o pré-tratamento provocou maior rapidez para a nodulação em estirpes lentas para infecção da hospedeira. A localização dos nódulos em relação à ponta da raiz marcada no terceiro dia de germinação e inoculada com *Rhizobium* indica a proporção de infecções iniciadas imediatamente após a inoculação. Foi observado que as estirpes que nodularam rapidamente formaram nódulos, principalmente acima da área marcada. Deste modo, pode-se sugerir que uma dispersão dos nódulos na raiz reflete um período mais longo de reconhecimento simbiótico. O mesmo efeito de dispersão foi observado em amendoim (*Arachis hypogea*) por Nambiar et al. (1983) trabalhando com inóculos de diferentes idades sem pré-tratamento.

Com relação ao N total/planta, os resultados obtidos com a estirpe MAC-2 confirmaram o desempenho encontrado por Macedo (1986) com o mesmo hospedeiro. Os resultados obtidos com RBGm-28 são superiores aos encontrados por Montano - Velasco (1989) com a cultivar de caupi IPA-203.

Döbereiner et al. (1966) relatou a existência de nódulos grandes situados nas raízes primárias é uma indicação de uma simbiose eficiente, demonstrando que na maioria dos casos o N fi-

xado está na dependência do tecido nodular formado. Com base nos dados da Tabela 1, observou-se que a estirpe RBGm-28, com relação ao hospedeiro caupi, não superou MAC-2 no valor do N fixado, mas apresentou valores significativamente mais altos de MNS, o que demonstra que, dependendo dos pares simbióticos em questão, não é válido utilizar a MNS como índice de eficiência de fixação simbiótica em leguminosas.

Na Tabela 2, tem-se o desdobramento de todos os efeitos em relação aos sete parâmetros analisados. Com respeito à estirpe MAC-2, não houve nenhum efeito de tratamento desta com o extrato de raiz sobre os parâmetros analisados; entretanto, observando-se os resultados obtidos com a estirpe RBGm-28, nota-se que o extrato de raiz diminuiu significativamente a altura das plantas. Isto pode indicar que, dependendo do par simbiótico em questão, o número de nódulos formados não traduz com garantia uma boa eficiência simbiótica. Vários autores citados por Nambiar et al. (1983) trabalhando com soja observaram que esta leguminosa não respondeu ao aumento da densidade do inóculo inicial, tendo bom desempenho com baixas concentrações de inóculo adicionado, isto variando de acordo com o tipo de substrato utilizado. O mesmo autor relata que a máxima fixação de N foi observada com $2,4 \times 10^5$ de rizóbio/semente em solo, enquanto 10^5 de rizóbios foram requeridos para uma boa fixação em plantas crescidas em areia.

Comparando-se as estirpes (Tabela 2), observa-se que as mesmas, quando não tratadas com extratos de raiz, apresentaram diferenças significativas no N-total, na área foliar e na altura da planta. O tratamento com extrato de raiz foi capaz de alterar o comportamento destas estirpes quando reduziu significativamente o número de nódulos da estirpe RBGm-28 fazendo com que esta nodulação fosse significativamente diferente do número de nódulos formado pela estirpe MAC-2. Este mesmo tratamento aumentou consideravelmente a massa nodular seca formada pela estirpe RBGm-28 em relação à estirpe MAC-2. Foram ainda alterados os parâmetros área foliar e altura das plantas, fa-

TABELA 2 - Desdobramento dos efeitos do extrato sobre a estirpe (E/S) e da estirpe sobre o extrato (S/E) em relação aos 7 parâmetros analisados na simbiose caupi x Bradyrhizobium. Média de 4 repetições.

Desdobramento	Nº nódulos (nódulo x planta)	%nódulos na raiz principal	Massa no- dular seca (MG/planta)	Matéria seca parte aérea (G/PL.)	Nitrogênio total (MGN/PL.)	Área foliar (CM2/PL)	Altura (cm)
MAC-2							
P.I.S.E. *	6.29 A	42.2 A	135.0 A	1.69 A	80.2 A	914.0 A	87.9 A
P.I.C.E. **	5.94 A	58.7 A	122.0 A	1.62 A	77.2 A	932.0 A	92.9 A
E/S	RBG _M -28						
P.I.S.E.	5.71 A	56.8 A	164.0 A	1.41 A	52.2 A	729.0 A	68.0 B
P.I.C.E.	4.02 B	65.2 A	182.0 A	1.65 A	59.6 A	772.0 A	81.3 A
P.I.S.E.							
MAC-2	6.29 A	42.2 A	135.0 A	1.69 A	80.2 A	914.0 A	87.9 B
RBG _M -28	5.71 A	56.8 A	164.0 A	1.41 A	52.2 B	729.0 B	68.0 B
S/E	P.I.C.E.						
MAC-2	5.94 A	58.7 A	122.0 B	1.62 A	77.2 A	932.0 A	92.9 A
RBG _M -28	4.02 B	65.2 A	182.0 A	1.65 A	59.6 B	772.0 A	81.3 A
DMS (5%)	0.928	18.0	27.9	0.31	15.9	85.0	11.9

Na mesma coluna, o conjunto de duas ou três linhas com suas médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Conforme teste de Tukey, ao nível de 5%.

* Planta inoculada sem extrato.

** Planta inoculada com extrato.

zendo com que as diferenças consideráveis que existiam quando as bactérias eram comparadas entre si, sem tratamento, deixassem de existir.

Baseando-se nos dados acima expostos, notam-se respostas simbióticas diferenciais das estirpes aos extratos de raiz. Isto demonstra que a grande variabilidade genética encontrada nas estirpes isoladas no Nordeste, e capaz de nodular caupi (Larocerie 1987 e Montano - Velasco 1989), reflete-se também na resposta ao tratamento com extrato de raiz.

A Análise dos efeitos dos diferentes componentes sobre a variabilidade fenotípica total dos parâmetros estudados neste trabalho revela que o componente estirpe produziu, como esperado, o maior efeito sobre a maioria dos parâmetros, o que vem enfatizar a importância deste componente na seleção de pares simbióticos eficientes (Tabela 3). O maior efeito deste componente foi sobre a área foliar (46,1%), e o

menor, sobre o parâmetro MSPA (1,8%). Isto pode significar que em combinações heterólogas de bactérias com plantas, a análise do parâmetro MSPA não demonstra a grande variabilidade fenotípica existente entre os vários pares simbióticos formados, o que influiu no valor elevado obtido em outros parâmetros avaliados. Os componentes extrato radicular e idade do inóculo (em diferentes concentrações) não tiveram grande contribuição na VFT da maioria dos parâmetros, salientando-se o efeito do componente extrato no número de nódulos (13,9%), o do componente idade do inóculo na massa nodular (14,3%) e área foliar (15,4%). As interações, como efeito não aditivo nos componentes genéticos, apresentaram pouca contribuição na variabilidade, tendo no parâmetro % NRP o maior percentual (interação estirpe x idade do inóculo - 30,1%), enfatizando-se, com isto, que o estado fisiológico da

TABELA 3 - Componentes da variabilidade simbiótica para sete parâmetros vegetais e sua relativa importância no percentual de variabilidade fenotípica total (números em parâmetros).

Componente	Nº nódulos (nódulo x planta)	%nódulos na raiz principal	Massa no- dular seca (MG/planta)	Matéria seca parte aérea (G/PL.)	Nitrogênio total (MGN/PL.)	Área foliar (CM2/PL)	Altura (cm)
E	44.1 (13.9)	57.5 (5.3)	-	-	-	12.8 (0.04)	33.08 (8.3)
S	83.1 (26.2)	36.4 (3.3)	943.8 (36.6)	0.0048 (1.8)	244.5 (28.9)	144.35 (46.1)	116.2 (29.3)
D	-1	-	369.4 (14.3)	-	(35.8) (4.23)	(48.13) (15.4)	6.58 (1.7)
E x S	20.9 (6.6)	-	140.7 (5.5)	0.009 (3.5)	-	-	-
E x D	-	135.1 (12.3)	-	-	-	16.22 (5.16)	34.9 (8.8)
S x D	12.7 (4.0)	329.1 (30.1)	-	0.045 (17.5)	-	-	-
E x S x D	4.10 (1.3)	64.3 (5.9)	-	0.063 (24.4)	199.1 (23.5)	-	-
Ambiente	151.9 (48.0)	471.1 (43.1)	112.3 (43.1)	0.136 (52.8)	366.8 (43.4)	104.63 (33.3)	205.4 (51.9)

E - Extrato

S - Estirpe

D - Idade do nódulo

-1 - Indica um resultado negativo ou igual a zero obtido

bactéria, dentro das várias fases de crescimento, demonstra grande contribuição para nodulação nas raízes primárias da planta.

CONCLUSÕES

1. Os resultados indicam variabilidade entre as estirpes testadas, no que concerne ao efeito do pré-tratamento das estirpes de *Bradyrhizobium* spp. com extrato homólogo da raiz.

2. Foi observado ausência de resposta por parte da estirpe MAC-2 e uma resposta positiva por parte da estirpe RBGm-28, com respeito a número de nódulos/planta e massa nodular seca.

3. Possivelmente, a estirpe que não respondeu ao tratamento em condições normais poderá nodular a planta mais rapidamente do que aquela que respondeu ao tratamento.

4. E de interesse agrônômico que se identifiquem as moléculas existentes nos extratos de raízes e os mecanismos pelos quais elas atuam neste fenômeno visando a sua aplicação na tecnologia da fixação biológica de Nitrogênio.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pelo auxílio no desenvolvimento da pesquisa e do Programa de Fixação Biológica de N₂ no país, e ao Dr. Paulo Miranda, do IPA,

Recife, pela cessão da cultivar IPA-202, utilizada neste experimento.

REFERÊNCIAS

- BHAGWAT, A. A., THOMAS, J. Legume-Rhizobium Interactions: Cowpea root exudate elicits faster nodulations response by Rhizobium species. *Applied and Environmental Microbiology*, v.43, p.800-805, 1982.
- BHAGWAT, A. A.; THOMAS, J. Legume-Rhizobium Interactions: Role of cowpea root exudate in polysaccharide synthesis and infectivity of Rhizobium species. *Archives of Microbiology*, v.136, p.102-105, 1983.
- BHUVANESWARI, T. V., LESNIAK, A. P., BAUER, W. D., Efficiency of nodule initiation in cowpea and soybean. *Plant Physiology*, v.86, p.1210-1215, 1988.
- DART, P. J., The development of root nodule symbioses. The infection process. In: QUISPÉL, A. (Ed.) *Biology of Nitrogen Fixation*. Amsterdam: North Holland Publishing Co., 1974. p.381-429.
- DÖBEREINER, J.; ARRUDA, N. B.; PENTEADO, A. F.; Avaliação da fixação de nitrogênio em leguminosas, pela regressão do nitrogênio total das plantas sobre o peso seco dos nódulos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Rio de Janeiro, v.1, p.233-237, 1966.
- INNES, R. W.; KUEMPEL, P. L.; PLAZINSKI, J.; CREMERS, H. C.; ROLFE, B. G.; DJORDEVIC, M. A. Plant factors induce expression of nodulation and host range genes in *Rhizobium trifolii*. *Molecular General Genetics*, v.201, p.426-432, 1985.
- JOHNSTON, A. W. B.; BEYNON, J. L.; BUCHANON-WOLLASTON, A. V.; SETCHELL, S. M.; HIRSCH, P. R.; BERINGER, J. E. High frequency transfer of nodulation ability between strains and species of rhizobium. *Nature*, v.276, p.634-636, 1978.
- LAROCERIE, M. G. G. Isolamento, caracterização cultural e simbiótica de estirpes nativas de bradyrhizobium spp. de solos do estado de Pernambuco. Recife: UFRP, 1987. Dissertação de Mestrado.
- MACEDO, F. P., Caracterização e eficiência de estirpes nativas de *Rhizobium* spp. em simbiose com cultivares melhoradas de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Recife: UFRP, 1986. 57p. Dissertação de Mestrado.
- MONTANO-VELASCO, J. C., Avaliação de caracteres simbióticos em leguminosas inoculadas com estirpe de *Bradyrhizobium* spp. Recife: UFRP, 1989. Dissertação de Mestrado.
- MYTTON, L. R.; SHERBEENY, M. H.; LAWES, D. A. Symbiotic variability in *Vicia faba* 3. Genetic effects of host plant, Rhizobium strain and host x strain interaction. *Euphytica*, v.26, p.785-791, 1977.
- NAMBIAR, P. T. C.; RAVISHANKAR, H. N.; DART, P. J. Effect of Rhizobium numbers on nodulation and dinitrogen fixation in groundnut. *Experimental Agriculture*, v.19, p.243-250, 1983.
- NORRIS, D. O. Techniques in work with Rhizobium. In: SOME concepts and methods in sub-tropical pasture research. London: Commonwealth Bureau of Pasture and Field Crops, 1964. p.186-198p. (Bull., 47).
- PETERS, N. K.; FROST, J. W.; LONG, S. R., A plant flavone, luteolin induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Science*, v.234, p.977-980, 1986.
- PETERS, N. K.; LONG, S. R.; Alfalfa root exudates and compounds which promote or inhibit induction of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Plant Physiology*, v.88, p.396-400, 1988.
- TEDESCO, M. J., Métodos de análise de N total, amônia, nitrito em solos e tecido vegetal. P. Alegre: Faculdade de Agronomia, UFRGS, 1978. 19p. (Informativo Interno, 01).
- VINCENT, J. M., *Manual of the practical study of root nodule bacteria*. Oxford: Blackwell, 1970. 164p. (Int. Biol. Programme Handb., 15).
- ZAAT, S. A. J.; WIJFFELMAN, C. A.; MULDER, I. H. M.; VAN BRUSSEL, A. N.; LEGTENBERG, B. J. J.; Root exudates of various host plants of *Rhizobium leguminosarum* contain different sets of inducers of Rhizobium nodulation genes. *Plant Physiology*, v.86, p.1298-1303, 1988.