

EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ESTIRPES HUP⁺, HUP^{HR} E HUP⁻ DE *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* E *BRADYRHIZOBIUM ELKANII* EM CULTIVARES DE CAUPI¹

ALESSANDRA ALVES DE SOUZA², HÉLIO ALMEIDA BURITY³, MÁRCIA DO VALE BARRETO FIGUEIREDO⁴, MARIA LUIZA RIBEIRO BASTOS DA SILVA⁵, MAELI MELOTTO⁶ e SIU MUI TSAI⁷

RESUMO - A eficiência das estirpes de *Bradyrhizobium* com características Hup⁺ (SR e USDA-110), Hup⁻ (29W) e Hup^{hr} (SEMIA-587) foi avaliada em caupi (*Vigna unguiculata* L.), cultivares IPA-202, BR-3 e VITA-4. Os resultados mostraram que VITA-4, em relação à nodulação, revelou-se superior às demais, e apresentou interação efetiva com as estirpes SEMIA-587 e USDA-110. Entretanto, quanto à eficiência nodular, a combinação IPA-202 x SEMIA-587 alcançou maior atividade da nitrogenase (ARA) com eficiência relativa próxima a 1,0. A ARA detectada nas estirpes SR e SEMIA-587 foi similar, porém, superior às estirpes USDA-110 e 29W, evidenciando que as estirpes Hup⁺ e Hup^{hr} alcançaram maiores atividades enzimáticas. Os teores de leghemoglobina (Lb) detectados nas estirpes SR e USDA-110 foram positivamente relacionados com as respectivas ARA, contudo, a relação entre teor de Lb e ARA obtido para 29W-Hup⁻ foi variável, sugerindo que, na ausência da hidrogenase, o sistema da nitrogenase fica afetado podendo influir no fluxo de Lb ao bacteróide. A avaliação do teor de N mostrou que não houve diferença entre cultivares, entretanto, foi detectada diferença significativa entre as estirpes. As estirpes Hup⁺ obtiveram maiores acúmulos de N, evidenciando que os sistemas simbióticos que menos liberam H₂, acumulam mais N no hospedeiro.

Termos para indexação: Hup, hidrogenase, fixação de N₂, nodulação, *Vigna unguiculata*.

SYMBIOTIC EFFICIENCY OF HUP⁺, HUP^{HR} AND HUP⁻ *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM* AND *BRADYRHIZOBIUM ELKANII* STRAINS IN COWPEA CULTIVARS

ABSTRACT - The effectiveness of *Bradyrhizobium* strains with characteristics Hup⁺ (SR and USDA-110), Hup⁻ (29W) and Hup^{hr} (SEMIA-587), was evaluated in cowpea (*Vigna unguiculata* L.), cultivars IPA-202, BR-3 and VITA-4. Results showed that nodulation in VITA-4 was superior, with a positive interaction when inoculated with strains SEMIA-587 and USDA-110. However, when comparing nodule efficiency, the combination IPA-202 x SEMIA-587 presented the highest nitrogenase activity, with a relative efficiency around 1.0. Nitrogenase activities were similar in plants inoculated with the strains SR and SEMIA-587, and higher, with strains USDA-110 and 29W. These results indicate that strains with Hup⁺ and Hup^{hr} were able to achieve higher enzymatic activities. Leghemoglobin (Lb) content detected in strains SR and USDA-110 was positively correlated to nitrogenase activity. However, correlations between Lb and nitrogenase activity were highly variable in nodules containing strain 29W-Hup⁻, indicating that imbalances in the nitrogenase system in the absence of hydrogenase may affect the flow of Lb to the bacteroids. Significant differences on the plant N content were found among the strains studied, but not among cultivars. Plant inoculated with Hup⁺ strains were more efficient to accumulate N, indicating that N-fixing systems retaining H₂ may accumulate additional N in the host.

Index terms: Hup, hydrogenase, N₂ fixation, nodulation, *Vigna unguiculata*.

¹ Aceito para publicação em 29 de setembro de 1998.

² Bióloga, Centro de Citricultura, IAC, Rod. Anhangüera, Km 158, Caixa Postal 4, CEP 13490-000 Cordeirópolis, SP. Bolsista RHAE/CNPq.

³ Eng. Agr., Ph.D., Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA), Caixa Postal 1022, CEP 50761-000 Recife, PE. Bolsista do CNPq. E-mail: burity@ipa.br

⁴ Bióloga, Dr^a, IPA. Bolsista do CNPq.

⁵ Bióloga, Estudante de mestrado, Dep. de Solos, UFRPe, Caixa Postal 1022, CEP 50761-000 Recife, PE.

⁶ Bióloga, M.Sc., Estudante de doutorado, Michigan State University, A378 PSSB, East Lansing, MI 48824, USA. E-mail: melottom@pilot.msu.edu

⁷ Eng^a Agr^a, Dr^a, Laboratório de Biologia Celular e Molecular, CENA-USP, Av. Centenário, 303, CEP 13416-000 Piracicaba, SP. E-mail: tsai@cena.usp.br

INTRODUÇÃO

Na redução da molécula de N_2 a NH_3 , no processo biológico da fixação do N_2 , é inevitável a liberação do H_2 , envolvendo, assim, um gasto adicional de energia-ATP e de outros redutores, que são fornecidos pelo metabolismo do hospedeiro. Entretanto, quando a inoculação rizobiana é realizada com estirpes de *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* que possuem atividade da hidrogenase positiva Hup^+ , a oxidação do H_2 liberado pela nitrogenase é realizada através de uma reação independente de ATP, reciclando H^+ e liberando ATP, produzindo, desta forma, uma economia substancial de substratos de carbono (McRae et al., 1978), e, conseqüentemente, uma economia energética da fixação biológica do N_2 .

Segundo Mellor & Werner (1990), a inoculação de estirpes Hup^+ em leguminosas reduziu as perdas do fluxo de elétrons para a atividade da nitrogenase de 30% para 4%. O contrário foi observado com as estirpes denominadas Hup^- (Siqueira & Franco, 1988). Outros autores sugerem que a quantidade de H_2 liberado na síntese da enzima nitrogenase e hidrogenase depende da bactéria (Dixon, 1967; Carter et al., 1978). Lima (1981) verificou uma relação positiva entre eficiência relativa dentro das cultivares, dentro das estirpes, e da interação destes com o teor de N das plantas, e é confirmado por Hungria & Neves (1986), que concluíram, em trabalhos com feijoeiro, que a liberação do H_2 pelos nódulos segue a atividade da nitrogenase, e os sistemas simbióticos que liberam maior quantidade de H_2 acumularam menores teores de N fixado nos tecidos, e houve efeito da cultivar e da estirpe na eficiência relativa dos elétrons destinados à nitrogenase.

Em relação ao transporte de N, Hungria et al. (1989), utilizando estirpes isogênicas com diferenças em relação ao gene *hup*, concluíram que a eficiência do nódulo formado (mg N_2 fixado por grama de nódulo em peso de matéria seca) foi significativamente maior para as estirpes Hup^+ , o que confirma diferenças no metabolismo do nódulo. A inoculação com estirpes Hup^+ pode otimizar o processo de fixação de N_2 , reduzindo a perda de N em

folhas senescentes, com conseqüente aumento da eficiência de translocação de N para as sementes (Neves & Hungria, 1987).

Em feijoeiro, segundo Pahwa & Dogra (1983), os efeitos resultantes da utilização de estirpes contendo hidrogenase mostraram aumentos da ordem de 14-53% e 21-65% no peso da matéria seca e no N total das plantas, respectivamente, em relação às plantas inoculadas com estirpes que não apresentavam hidrogenase.

Kalia et al. (1985), em trabalhos com soja infectada com estirpes Hup^+ e Hup^- , afirmam que a maior eficiência da estirpe com hidrogenase está relacionada apenas a uma maior atividade específica da nitrogenase, sendo indiferente se a enzima hidrogenase está presente ou não.

Existe um efeito do genótipo da planta hospedeira sobre a atividade Hup , que tem sido identificado em experimentos feitos com diferentes espécies de leguminosas infectadas com a mesma estirpe de rizóbio. Por uma razão qualquer, não conhecida, o fenótipo Hup^+ é reprimido de acordo com o hospedeiro. Sendo assim, um terceiro fenótipo em termos de expressão da atividade da hidrogenase tem sido estabelecido: Hup^{hr} (hydrogen uptake host-regulated) (Van Berkum, 1990).

Rodrigues (1992) chama a atenção para os resultados que indicam a influência dos hospedeiros na expressão da enzima hidrogenase, porque isto poderia levar a conclusões errôneas sobre a caracterização da estirpe quanto ao gene *hup*, e sugere que a enzima hidrogenase provavelmente apresenta funções diferentes, de acordo com a espécie estudada, e os benefícios de sua atividade seriam variáveis conforme o macrossimbionte.

Há diferentes hipóteses e controvérsias sobre a influência da inoculação de estirpes Hup^+ e Hup^- na eficiência do processo da fixação simbiótica do N_2 . O presente trabalho foi elaborado com o objetivo de determinar a eficiência de algumas estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium elkanii* com características Hup^+ , Hup^{hr} e Hup^- no desenvolvimento do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.).

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado em casa de vegetação, no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), utilizando-se vasos de Leonard (1,0 L), com vermiculita e sílica, na proporção 2:1, autoclavados por uma hora, a 120°C. Todos os vasos receberam semanalmente 750 mL de solução nutritiva (Hoagland & Arnon, 1950) modificados por Contado (1990), e completados com água esterilizada ou solução nutritiva, quando necessário.

Foram utilizadas quatro estirpes de *Bradyrhizobium*, com características definidas, sendo duas Hup⁺, denominadas SR e USDA-110 (ambas *B. japonicum*), uma Hup⁻, denominada 29W (*B. elkanii*), e uma Hup^{hr}, denominada SEMIA-587 (*B. elkanii*), que apresenta a característica Hup⁺ regulada pelo hospedeiro.

As estirpes cresceram em meio sólido YM, e, posteriormente, em meio líquido (Vincent, 1970), a 28°C, com agitação até alcançarem uma população de 10⁸ células/mL.

As cultivares utilizadas foram: IPA-202 (Empresa IPA); BR-3 (Embrapa-CNPAF); VITA-4 (Embrapa-CPATU). As sementes foram esterilizadas com hipoclorito de sódio 10%, pré-germinadas, e, após quatro dias, transplantadas para os vasos. Em seguida, procedeu-se à inoculação, nelas, de 1 mL da suspensão bacteriana. Após cinco dias, foi realizado o desbaste, ficando duas plantas por vaso, e estas receberam nova inoculação e foram cobertas com uma camada de areia autoclavada, para evitar contaminação. A coleta foi realizada 45 dias após o plantio, seccionando-se a planta 10 cm acima do nível do solo; a parte aérea das plantas foi acomodada em sacos de papel e levada para secagem em estufa (65°C) até atingir peso constante. O N foi determinado pelo método de Kjeldahl, descrito por Bremner (1965). Na análise da atividade da nitrogenase, foi utilizado o método da redução de acetileno, proposto por Hardy et al. (1968). O etileno foi determinado em um cromatógrafo modelo Beckmann CG-65 com detector de ionização de chama. Na atividade da hidrogenase utilizou-se o método descrito por Saito (1978); a liberação do H foi determinada por meio de um cromatógrafo Varian, modelo 3700, usando-se o detector de condutividade térmica. A seguir, foi avaliada a nodulação.

O teor de leghemoglobina (Lb) nos nódulos foi mensurado segundo Wilson & Reisenaur (1963). A Eficiência Relativa (ER) dos elétrons destinados à atividade da nitrogenase foi calculada pela equação $ER = (1 - H_2 \text{ liberado})/C_2H_2 \text{ reduzido}$, de acordo com Schubert & Evans (1976).

Os resultados foram submetidos à análise de variância, conforme o delineamento experimental em blocos ao acaso, com arranjo fatorial 4 x 3 (estirpes x cultivares), com três repetições. Para a separação entre médias, foi aplicado o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A inoculação da estirpe SEMIA-587 (Tabela 1) proporcionou maior número de nódulos, alcançando valor médio de 115 nódulos por planta, enquanto a inoculação da estirpe 29W de característica Hup⁻ alcançou valores médios de 65 nódulos por planta, sendo similar à nodulação proporcionada pela inoculação com a estirpe SR denominada como Hup⁺. Em relação à comparação entre as cultivares testadas, os resultados demonstraram, de modo geral, comportamento superior da cultivar VITA-4 em relação às demais, com uma nodulação significativamente maior em comparação às cultivares IPA-202 e BR-3. Ressalva-se a interação efetiva entre a cultivar VITA-4 com as estirpes SEMIA-587 e USDA-110.

Na Tabela 1, onde são apresentadas as interações cultivar x estirpe nas determinações da nitrogenase e no número de nódulos, observou-se que os resultados mais significativos foram observados na segunda amostragem (65 dias após o plantio), com destaque para as cultivares VITA-4 e IPA-202. O número de nódulos aumentou significativamente nessa época, em comparação com a primeira amostragem aos 45 dias. Entretanto, as interações do número de nódulos em resposta às diferentes estirpes foram observadas já aos 45 dias na cultivar VITA-4, com destaque para as estirpes SEMIA-587 e USDA-110, que apresentaram, em média, 180 nódulos por planta. Aos 65 dias, essas estirpes quase duplicaram a nodulação, nessa variedade. Quanto à atividade da nitrogenase, observou-se aos 65 DAP, uma baixa resposta varietal da BR-3, tanto em relação à estirpe quanto à época de amostragem, o que demonstra uma baixa eficiência na FBN dessa cultivar.

Aos 45 dias, não foram observadas interações significativas nos parâmetros de desenvolvimento da planta (matéria seca e acúmulo de N da parte aérea e teor de leghemoglobina nos nódulos), porém aos 65 dias, fortes interações foram observadas nesses parâmetros (Tabelas 1 e 2), provavelmente devi-

TABELA 1. Número de nódulos, atividade da nitrogenase e teor de leghemoglobina de três cultivares de caupi (*Vigna unguiculata*) em que foram inoculadas estirpes de *Bradyrhizobium* aos 45 e 65 DAP. Média de três repetições.

| Estirpes | Número de nódulos | | | Atividade da nitrogenase ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_2/\text{vaso/hora}$) | | | Teor de leghemoglobina (mg/g de nódulos) | | | |
|-----------|-------------------|--------|--------|--|--------|--------|---|---------|---------|---------|
| | 45 DAP | 65 DAP | 65 DAP | 45 DAP | 65 DAP | 65 DAP | 45 DAP | 65 DAP | 65 DAP | |
| | IPA-202 | VITA-4 | BR-3 | IPA-202 | BR-3 | VITA-4 | IPA-202 | BR-3 | VITA-4 | BR-3 |
| SEMIA-587 | 141aB | 357aA | 194aB | 326aB | 653aA | 220aB | 5,27aA | 2,05abB | 3,21aB | 7,88abA |
| SR | 109aA | 89bA | 149aA | 210aA | 343bA | 253aA | 4,37abA | 3,81aA | 2,91aA | 8,18aA |
| USDA-110 | 121aB | 359aA | 122aB | 357aB | 748aA | 274aB | 2,70bAB | 3,80aA | 2,39aB | 4,19bcA |
| 29W | 112aA | 155bA | 125aA | 340aA | 383bA | 242aA | 3,32abA | 0,97bB | 1,26aAB | 3,65cA |
| CV (%) | 31 | 26 | 34 | 29 | - | 15 | | | | |

¹ Valores seguidos de uma mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

do ao substancial incremento da nodulação após o primeiro período de amostragem. De forma geral, as estirpes Hup⁺ proporcionaram os aumentos mais significativos, apesar da forte interação observada com os hospedeiros.

Quanto à eficiência nodular, os resultados sugerem que a interação entre as cultivares e as estirpes Hup⁺ e Hup^{hr} apresentaram ER igual à unidade, o que indica o funcionamento da atividade da enzima hidrogenase, e, possivelmente, ausência da hidrogenase na estirpe 29W (Hup⁻), em associação com as três cultivares (Tabela 3). Segundo Hungria & Neves (1986), valores de ER acima de 0,75 correspondem a uma ação da enzima hidrogenase com liberação de elétrons para o processo de fixação de N₂.

Analisando o efeito das estirpes, a atividade da nitrogenase detectada com as estirpes SR e SEMIA-587 foi similar, mas superior às estirpes USDA-110 e 29W. Porém, as estirpes com característica Hup⁺ e Hup^{hr}, quando inoculadas nas cultivares IPA-202 e VITA-4, evidenciaram maiores atividades enzimáticas do que a estirpe 29W com característica Hup⁻ (Tabela 1). Observou-se, também, que a estirpe 29W apresentou ER bastante inferior ao limite citado por Hungria & Neves (1986); conseqüentemente, ocorreu liberação de H₂ na reação catalizada pela nitrogenase para redução de N₂ atmosférico (Tabela 3). Os valores da ER alcançados com a estirpe 29W variaram entre 0,43 a 0,0, significativamente inferiores às demais estirpes.

Os teores de Lb aos 65 DAP detectados na interação entre as estirpes e as variedades, estão correlacionados com a atividade da nitrogenase, na qual foram observados os maiores teores de Lb nas associações com as estirpes contendo Hup⁺ (SR e USDA-110) e Hup^{hr} (SEMIA-587). A relação entre o teor de Lb e a atividade da nitrogenase encontrada em nódulos contendo a estirpe 29W (Hup⁻) foi inferior às demais interações. Pela determinação do N acumulado, evidenciou-se que não houve diferença entre as cultivares estudadas; entretanto, foi detectada diferença significativa entre as estirpes avaliadas. As estirpes com características Hup⁺ obtiveram maiores acúmulos de N (Tabela 2), o que evidencia que os sistemas simbióticos que menos liberam H₂ podem acumular maiores quantidades de N no hospedeiro.

TABELA 2. Peso da matéria seca (M.S.) e N-total da parte aérea de três cultivares de caupi (*Vigna unguiculata*), infectadas com estirpes de *Bradyrhizobium* aos 65 DAP. (Média de três repetições)¹.

| Estirpes | M.S. (g/vaso) | | | N-total (mg/vaso) | | |
|-----------|---------------|---------|---------|-------------------|-----------|-----------|
| | IPA-202 | VITA-4 | BR-3 | IPA-202 | VITA-4 | BR-3 |
| SEMIA-587 | 6,70aA | 5,50abA | 6,39abA | 105,54aA | 145,06abA | 175,21aA |
| SR | 5,32aA | 6,78aA | 7,67aA | 160,97aA | 193,53aA | 220,09aA |
| USDA-110 | 7,55aA | 7,55aA | 5,33abA | 194,40aA | 215,00aA | 167,27aA |
| 29W | 5,45aA | 3,23bA | 4,17bA | 188,25aA | 77,59bB | 123,60aAB |
| CV (%) | 21 | | | 25 | | |

¹ Letras maiúsculas lêem-se na horizontal, para comparação de estirpes dentro das cultivares; letras minúsculas lêem-se na vertical, para comparação da cultivar dentro das estirpes; valores seguidos de uma mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

TABELA 3. Evolução de H₂ e eficiência relativa (ER) em plantas de *Vigna unguiculata* em que foram inoculadas estirpes Hup⁺, Hup⁻ e Hup^{hr} de *Bradyrhizobium*, colhidas com 45 e 65 dias após a germinação. (Média de três repetições).

| Cultivares | SEMIA-587 | | USDA-110 | | SR | | 29W | |
|---------------------------|-----------------------------|----|----------------|----|----------------|----|----------------|------|
| | H ₂ ¹ | ER | H ₂ | ER | H ₂ | ER | H ₂ | ER |
| 45 dias após a germinação | | | | | | | | |
| IPA-202 | 0,0 | 1 | 0,0 | 1 | 0,0 | 1 | 5,6 | 0,43 |
| VITA-4 | 0,0 | 1 | 0,0 | 1 | 0,0 | 1 | 2,4 | 0,08 |
| BR-3 | 0,0 | 1 | 0,0 | 1 | 0,0 | 1 | 5,2 | 0,0 |
| 65 dias após a germinação | | | | | | | | |
| IPA-202 | 0,0 | 1 | 0,0 | 1 | 0,0 | 1 | 15,2 | 0,0 |
| VITA-4 | 0,0 | 1 | 0,0 | 1 | 0,0 | 1 | 11,0 | 0,0 |
| BR-3 | 0,0 | 1 | 0,0 | 1 | 0,0 | 1 | 7,1 | 0,0 |

¹ Atividade da hidrogenase em µmol H₂/vaso/hora.

Resultados similares foram encontrados por Pahwa & Dogra (1983), segundo os quais, os efeitos resultantes da utilização de estirpes contendo hidrogenase mostraram aumentos no peso da matéria seca (14-53%) e no N total das plantas (21-65%), em relação às plantas nas quais foram inoculadas estirpes que não apresentam hidrogenase. La Favre & Focht (1983), com feijão-guandu, não obtiveram resultados conclusivos sobre a superioridade da estirpe Hup⁺ durante a simbiose, porém foi uma estirpe contendo a enzima hidrogenase a que obteve o

rendimento mais significativo de N-total da parte aérea em relação aos demais tratamentos.

Rodrigues (1992), em trabalhos com soja inoculada com estirpes Hup⁺ e Hup^{hr}, não encontrou diferenças significativas quanto à atividade da nitrogenase total e atividade da nitrogenase específica. Contudo, as mesmas estirpes Hup⁺ apresentaram maiores contrastes nos valores em N-total e matéria seca em caupi, com diferenças significativas em relação aos mesmos parâmetros estudados em soja. Assim, uma demonstração de que a enzima

hidrogenase provavelmente apresenta funções diferentes de acordo com a espécie estudada, e que desta forma os benefícios de sua atividade seriam variáveis de acordo com o hospedeiro. Outros autores (Dixon, 1967; Carter et al., 1978) sugerem que a quantidade de H₂ liberado depende da bactéria, uma vez que ela possui informações genéticas para a síntese das enzimas nitrogenase e hidrogenase. Efeitos da eficiência da interação foram encontrados por Lima (1981) e Hungria & Neves (1986).

Neste trabalho, foi possível diferenciar o desempenho simbiótico, tanto entre as cultivares de caupi como entre as estirpes de *B. japonicum* e *B. elkanii*, com adicional efeito de interação. As estirpes de características Hup⁺, porém, apresentaram maiores eficiências simbióticas.

CONCLUSÕES

1. A inoculação das estirpes de característica Hup⁺, nas cultivares de caupi IPA-202 e VITA-4, apresenta as maiores eficiências na fixação de N₂ e contribui para ganhos significativos de nitrogênio acumulado na planta.

2. A estirpe de *B. elkanii* com característica Hup^{hr} (SEMIA-587) comporta-se como Hup⁺ nas cultivares de caupi IPA-202, VITA-4 e BR-3.

REFERÊNCIAS

- BREMNER, J.M. Total nitrogen. In: BLACK, C.A. (Ed.). **Methods of soil analysis: chemical and microbiological properties**. Madison: American Society of Agronomy, 1965. Part. 2, Ch.83, p.1149-1178. (Agronomy, 9).
- CARTER, K.R.; JENNINGS, N.T.; HANUS, J.; EVANS, H.J. Hydrogen evolution and uptake by nodules of soybeans inoculated with different strains of *Rhizobium japonicum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v.24, p.304-311, 1978.
- CONTADO, G.L. **Relações das atividades de fosfoenolpiruvato carboxilase e glutamina sintetase com a fixação simbiótica de N₂ em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp)**. Piracicaba: ESALQ-USP, 1990. 75p. Dissertação de Mestrado.
- DIXON, R.O.D. Hydrogen uptake and exchange by pea root nodules. **Annals of Botany**, v.31, p.179-188, 1967.
- HARDY, R.W.F.; HOSTEN, R.D.; JACKSON, E.K.; BURNS, R.C. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluations. **Plant Physiology**, Rockville, v.43, p.1185-1207, 1968.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. The water culture method for growing plants without soil. **California Agricultural Experimental Station Bulletin**, Berkeley, v.347, p.1-39, 1950.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P. Interação entre cultivares de *Phaseolus vulgaris* e estirpes de *Rhizobium* na fixação e transporte de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.21, n.2, p.127-140, fev. 1986.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P.; DÖBEREINER, J. Relative efficiency on ureide transport and harvest index in soybean inoculated with isogenic HUP mutants of *Bradyrhizobium japonicum*. **Biology and Fertility of Soils**, v.7, p.325-329, 1989.
- KALIA, V.C.; DREVON, G.G.; SALSAC, L. Nitrogenase and uptake hydrogenase activities of *Rhizobium japonicum* during the life cycle of *Glycine max* (L.) Merr. **Plant Science**, Amsterdam, v.39, p.17-24, 1985.
- LA FAVRE, J.S.; FOCHT, D.D. Comparison of N₂ fixation and yields in *Cajanus cajan* between hydrogenase - positive and hydrogenase - negative rhizobia by *in situ* acetylene reduction assay and direct ¹⁵N partitioning. **Plant Physiology**, v.72, p.971-977, 1983.
- LIMA, M.H. **Eficiência da fixação simbiótica do nitrogênio x evolução do H₂ x respiração dos nódulos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Piracicaba: ESALQ-USP, 1981. 190p. Dissertação de Mestrado.
- McRAE, R.E.; HANUS, F.J.; EVANS, H.G. Properties of hydrogen system in *Rhizobium japonicum* bacteroids. **Biochemical and Biophysics Research Communication**, New York, v.80, n.2, p.384-390, 1978.
- MELLOR, R.B.; WERNER, D. Legume nodule biochemistry and function. In: GRESSHOFF, P.M. (Ed.). **Molecular biology of symbiotic nitrogen fixation**. Boca Raton: CRC, 1990. p.111-131.
- NEVES, M.C.P.; HUNGRIA, M. The physiology of nitrogen fixation in tropical grain legumes. **CRC**

- Critical Review in Plant Sciences**, v.6, n.3, p.267-320, 1987.
- PAHWA, K.; DOGRA, R.C. Uptake hydrogenase system in urd bean (*Vigna mungo*) *Rhizobium* in relation to nitrogen fixation. **Journal of Applied Bacteriology**, New York, v.54, p.405-408, 1983.
- RODRIGUES, G.L.M. **As nodulinas pep-carboxilase e glutamina sintetase e sua relação na fixação de N₂ em caupi e soja inoculados com *Bradyrhizobium japonicum***. Piracicaba: CENA-USP, 1992. 131p. Dissertação de Mestrado.
- SAITO, S.M.T. **Relações entre a fixação de ¹⁵N₂, evolução de hidrogênio e redução de C₂H₂ em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Piracicaba: ESALQ-USP, 1978. 98p. Tese de Doutorado.
- SCHUBERT, K.R.; EVANS, H.G. Hydrogen evolution: a major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. **Proceedings of the National Academy of Sciences the United States of America**, Washington, DC, v.73, n.4, p.1207-1211, 1976.
- SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. **Biotechnologia do solo: fundamentos e perspectivas**. Brasília: MEC, 1988. 235p.
- VAN BERKUM, P. Evidence for a third uptake hydrogenase phenotype among the soybean bradyrhizobia. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.56, n.12, p.3835-3841, 1990.
- VINCENT, G.M. **Manual of the practical study of root nodule bacteria**. Oxford: Blackwell, 1970. 163p. (International Biology Program, 15).
- WILSON, D.O.; REISENAUR, H.M. Determination of leghemoglobin in legume nodule. **Analytical Biochemistry**, v.6, n.1, p.27-30, 1963.