

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 apresentam 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		45 DAP		65 DAP		45 DAP		65 DAP				
	IPA-202	VITA-4	BR-3	IPA-202	VITA-4	BR-3	IPA-202	VITA-4	BR-3	IPA-202	VITA-4	BR-3			
SEMIA-587	141aB	357aA	194aB	326aB	653aA	220aB	5,27aA	2,05abB	3,21aB	7,88abA	4,29bcB	3,14aB	3,43abA	2,07cB	2,75aA
SR	109aA	89bA	149aA	210aA	343bA	253aA	4,37abA	3,81aA	2,91aA	8,18aA	8,64aA	1,95aB	3,82aA	3,72abA	2,27aB
USDA-110	121aB	359aA	122aB	357aB	748aA	274aB	2,70bAB	3,80aA	2,39aB	4,19bcA	6,39abA	0,86aB	3,11abB	4,05aA	2,54aB
29W	112aA	155bA	125aA	340aA	383bA	242aA	3,32abA	0,97bB	1,26aAB	3,65cA	2,39cA	2,80aA	2,83bA	3,08bA	2,15aB
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.