

# MÉTODO RÁPIDO DE IDENTIFICAÇÃO DOS NÓDULOS PRODUZIDOS PELO INOCULANTE, EFICIÊNCIA NA FIXAÇÃO DO N<sub>2</sub> E INOCULAÇÃO CRUZADA EM LEGUMINOSAS TROPICAIS<sup>1</sup>

NEWTON PEREIRA STAMFORD<sup>2</sup>

**RESUMO** - Foram conduzidos experimentos em vasos-de-leonard, em vasos com solo, e em campo, para verificar a inoculação cruzada, o uso de estirpes formadoras de nódulos pretos na identificação do *Rhizobium* do inoculante, e sua eficiência na fixação do N<sub>2</sub>. Foram usadas as leguminosas labe-labe (*Lablab purpureus*), kudzu tropical (*Pueraria phaseoloides*), (*Calopogonium mucunoides*), centrosema (*Centrosema pubescens*), e soja perene (*Neotonia wightii*), inoculadas com estirpes formadoras de nódulos pretos e de nódulos de coloração normal. Na inoculação cruzada, centrosema mostrou maior grau de especificidade hospedeira. Labe-labe e calopogônio formaram nódulos pretos com todas as estirpes formadoras de nódulos pretos, centrosema e kudzu tropical com as estirpes C-102 e CM-7, e soja perene não apresentou nódulos com esta característica. As estirpes apresentaram diferença na eficiência da fixação do N<sub>2</sub> com as estirpes formadoras de nódulos pretos, mostrando-se, em geral, mais eficazes. Os resultados indicaram que as estirpes formadoras de nódulos pretos podem ser usadas para identificar os nódulos produzidos pelo *Rhizobium* do inoculante.

Termos para indexação: identificação de *Rhizobium*, nódulos pretos, estirpes, *Centrosema pubescens*, kudzu tropical.

## QUICK METHOD FOR IDENTIFICATION OF INOCULANT NODULES, EFFICIENCY OF N<sub>2</sub> FIXATION AND CROSS INOCULATION OF TROPICAL LEGUMES

**ABSTRACT** - Experiments using leonard jars, soil pots, and field experiments were conducted to observe cross-inoculation in some tropical legumes, the possibility of using black nodule producing strains for identification of *Rhizobium* nodules and also the efficiency of such strains in nitrogen fixation. The tropical legumes used were: glycine (*Neotonia wightii*), lablab (*Lablab purpureus*), centro (*Centrosema pubescens*), tropical kudzu (*Pueraria phaseoloides*) and calopo (*Calopogonium mucunoides*), inoculated with black nodule-producing strains and normal strains. In cross-inoculation behavior certain host specificity was observed in centro. Lablab and calopo formed black nodules with all black nodule-producing strains, centro with C-102 and CM-7, and glycine produced no black nodules. Strains showed differences in nitrogen fixation efficiency and, in a general way, black nodule-producing strains showed highest efficiency in nitrogen fixation. Results indicated that the black nodule-producing strains may be used in *Rhizobium* strain identification.

Index terms: *Rhizobium* identification, black nodule strains, *Centrosema pubescens*, tropical kudzu.

## INTRODUÇÃO

Um dos aspectos de grande importância para o estabelecimento de uma eficiente fixação do di-nitrogênio pelas leguminosas é o estudo da necessidade de inoculação e, mais adiante, a obtenção e seleção de estirpes específicas e mais eficazes para cada leguminosa adaptada à região. Assim, necessária se faz a obtenção de um método simples de identificação dos nódulos produzidos pela bactéria do inoculante, e que permita estudar a competição destas estirpes com as nativas do solo, mais

adaptadas às condições naturais do meio (Date & Vincent 1962).

Os métodos atualmente usados para a identificação das estirpes de *Rhizobium* são o da clorose induzida, o da resistência a antibióticos, e o sorológico. O primeiro é específico para soja anual (*Glycine max*) e baseia-se no temporário amarelamento das folhas (clorose), promovido por determinadas estirpes em certas isolinhas. O segundo e o terceiro, baseados, respectivamente, na resistência a antibióticos e em reações antigênicas específicas ao nível de estirpe, são métodos bastante precisos, porém muito laboriosos, e que necessitam de pessoal especializado.

Trabalhando em condições tropicais, Cloonan (1963), pela primeira vez, observou a ocorrência de nódulos pretos em *Dolichos lablab* e posteriormente, Döbereiner (1964), no Brasil, detectou a

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 9 de dezembro de 1986. Parte da Tese de Mestrado, apresentada pelo primeiro autor, na Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro, em dezembro de 1971.

<sup>2</sup> Prof.-Adjunto, Univ. Fed. Rural de Pernambuco, Dep. de Agron., CEP 50000 Recife, PE, Bolsista do CNPq.

formação de nódulos pretos em *Centrosema pubescens*. Trabalhos conduzidos no Brasil com diversas leguminosas forrageiras sugeriram que estas estirpes poderiam ser usadas para avaliar, com facilidade, o efeito de fatores que interferem na sobrevivência do *Rhizobium* no solo, especialmente na competição entre estirpes com outros microrganismos.

O presente trabalho teve como objetivo verificar a viabilidade do emprego das estirpes que produzem nódulos pretos, como método rápido de identificação dos nódulos formados pelo inoculante, através da simples observação macroscópica da coloração dos nódulos, e avaliar a eficiência destas estirpes na fixação do dinitrogênio, e a inoculação cruzada com diversas leguminosas forrageiras tropicais.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Foi instalado, em casa de vegetação, um experimento com vasos-de-leonard esterilizados (Leonard 1944), um, em vasos de barro com solo, e dois, em campo, sendo um em microparcelsas e um em parcelas tamanho usual.

No experimento em vasos-de-leonard, foram utilizadas as leguminosas *Neotonia wightii* L. (soja perene), *Lablab purpureus* (Labe-labe), *Centrosema pubescens* Benth. (centrosema), *Pueraria phaseoloides* Benth. (kudzu tropical), e *Calopogonium mucunoides* Desv. (calopogônio). Os inoculantes individuais foram preparados com as estirpes pretas (DO-37, CB-756, C-102 e CM-7) e com as estirpes normais (K-28, DO-4b, C-100 e CM-2).

As sementes foram escarificadas com ácido sulfúrico concentrado - exceção feita à labe-labe -, e antes do plantio foram esterilizadas com álcool e HgCl<sub>2</sub> (1:500). As estirpes foram crescidas com agitação em meio 79 líquido, durante cinco dias consecutivos, realizando-se a inoculação oito dias após a germinação das sementes, adicionando-se duas gotas da cultura por planta.

Procedeu-se à colheita lavando cuidadosamente as raízes em água corrente sobre uma peneira e, após separação e observação da cor dos nódulos, as plantas (parte aérea mais raízes) e nódulos foram secadas a 65°C. Posteriormente, foram feitas as determinações do peso de matéria seca das plantas e dos nódulos e a análise do nitrogênio total, como descrito por Bremner (1965).

O experimento em vasos com solo foi realizado com as cinco leguminosas anteriormente citadas, inoculadas com as mesmas estirpes pretas e de coloração normal, mais o tratamento sem inoculação. Utilizou-se um Podzólico Vermelho-Amarelo (Série Itaguaí), colocando-se 2,5 kg de solo por vaso e corrigindo o pH para 6,0, através da adição de 2,1 g de CaCO<sub>3</sub> (P.A.) por vaso. A análise química do solo é apresentada na Tabela 1. Foram aplicados, em todos os vasos, 437 mg de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/kg de solo. Para

o suprimento de magnésio, enxofre e micronutrientes, foram usados 2 ml/kg de solo da solução, contendo por litro: MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O - 150,0 g, CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O - 15,8 g; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O - 8,9 g; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> - 1,0 g; NaMoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O - 7,0 g; ácido cítrico - 20,0 g e Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.7H<sub>2</sub>O - 20,0 g. Com a finalidade de imobilizar o nitrogênio mineral usou-se palha de arroz (2%), como proposto por Broadbent & Nakashima (1965). As demais operações e determinações seguiram o mesmo procedimento dos experimentos em vasos-de-leonard.

No experimento em microparcelsas, foi conduzido o mesmo solo usado no experimento em vasos com solo, utilizando as leguminosas labe-labe, centrosema e kudzu tropical, usando o esquema em parcelas subdivididas. Fez-se a inoculação usando a estirpe preta e a estirpe normal mais eficaz para cada leguminosa, de acordo com os resultados obtidos no experimento em vasos com solo, mais o tratamento sem inoculação. O espaçamento usado foi de 20 cm entre covas e 40 cm entre fileiras, com doze covas por fileira e cinco fileiras por parcela. Nas parcelas foram distribuídos os tratamentos com inoculação, e nas subparcelas, as leguminosas, visando diminuir a contaminação entre as diferentes estirpes. Foi feita a calagem do solo aplicando-se uma dose correspondente a duas toneladas de CaCO<sub>3</sub>/ha, e uma adubação fosfatada na dose de 500 kg/ha de superfosfato simples. Uma semana após o plantio, foi feito desbaste deixando-se três plantas por cova, e as demais operações e determinações de laboratório foram feitas da mesma maneira descrita nos trabalhos conduzidos em casa de vegetação.

O experimento em parcelas usuais foi realizado no solo Podzólico Vermelho-Amarelo (Série Silvicultura), cuja análise química está apresentada na Tabela 1, usando a leguminosa centrosema e os tratamentos de inoculação com a estirpe preta (C-101), com a estirpe normal (C-100), e sem inoculação (testemunha). O espaçamento adotado foi de 30 cm entre covas e 50 cm entre fileiras, semeando-se doze covas por fileira, sendo cada parcela representada por quatro fileiras. A calagem, adubação e inoculação, bem como as determinações e análises, obedeceram ao mesmo procedimento anteriormente descrito.

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos em vasos-de-leonard permitiram estudar a inoculação cruzada entre as leguminosas forrageiras tropicais usadas e, ainda, observar a formação de nódulos pretos, com a finalidade de verificar a possibilidade do uso destas estirpes como método de identificação do *Rhizobium* do inoculante. Nos experimentos com solo observou-se o grau e nível de ocorrência de estirpes com esta característica, complementando o estudo, bem como verificar a eficácia destas estirpes em relação às formadoras de nódulos de coloração normal.

TABELA 1. Resultados das análises químicas dos solos da série Itaguaí e da série silvicultura.

Solo	pH em água (2,5:1)	P	K	Ca	Mg	Al	N	C	C/N
Itaguaí	4,3	2,0	0,14	1,25	0,41	0,20	0,11	0,87	7,9
Silvicultura	4,2	1,0	0,05	0,72	0,70	0,30	0,09	0,82	9,1

Os resultados gerais dos experimentos em vasos-de-leonard encontram-se na Tabela 2. Após 28 dias do plantio já se observou o efeito da inoculação, o qual foi mais evidente com 37 dias.

Soja perene e labe-labe mostraram-se mais promíscuas, formando nódulos com todas as estirpes usadas, embora com grande variação na eficácia e sobressaindo-se as estirpes CB-756 e C-100, o que está de acordo com os resultados obtidos por Guzman & Dobereiner (1969), principalmente com referência aos resultados de peso de nódulos. Kudzu tropical apresentou relativa especificidade hospedeira, não nodulando, o mesmo ocorrendo com as estirpes CM-756 e CM-2, enquanto DO-37 e C-100 foram as mais eficazes. Observou-se que as estirpes isoladas de centrosema nodularam todas as espécies e, por outro lado, constatou-se que esta leguminosa foi a que mostrou maior especificidade hospedeira. Esta especificidade unilateral já foi anteriormente observada por Bowen (1959) e Dobereiner & Coser (s.n.t.), o que permite sugerir que CM-7 e DO-37 sejam estirpes homólogas de centrosema, embora incidentalmente tenham sido isoladas de calopogônio, e por isso consideradas como originária desta espécie. Observou-se que, de maneira geral, nenhuma estirpe se comportou como a mais eficiente para todas as leguminosas estudadas; entretanto, DO-37, CM-756 e C-100 foram quase sempre as mais promissoras, e K-28 e CM-2, as menos eficazes.

A formação de nódulos pretos mostrou variação de acordo com a espécie, apresentando-se o labe-labe e o calopogônio como as espécies mais consistentes, formando nódulos pretos com todas as estirpes com esta característica. Neste sentido, o kudzu tropical foi a leguminosa que apresentou maior especificidade, formando nódulos pretos apenas com as estirpes DO-37 e C-102, seguindo-se centrosema, que, apesar de sua grande especifici-

dade hospedeira, formou nódulos pretos com C-101, C-102 e CM-7.

Com referência à eficácia das estirpes, verificou-se que para cada leguminosa destacou-se uma estirpe preta entre as mais promissoras. Esta afirmação está de acordo com Guzman & Dobereiner (1969) e Dobereiner & Coser (s.n.t.), que consideraram desnecessário fazer seleção de estirpes para leguminosas tropicais a partir de estirpes homólogas, como sugerido por Norris (1967). Entretanto, é conveniente ressaltar que a simples ocorrência de coloração preta não significa maior capacidade de fixação de dinitrogênio, sendo exemplo extremo deste fato a formação de nódulos pretos totalmente ineficientes em *Mimosa caesal piniaefolia* Benth e em *Phaseolus vulgaris* (Stamford et al. 1968). Por outro lado, ficou bastante evidenciado que a nodulação das leguminosas forrageiras tropicais é em maior escala influenciada pela estirpe em si, do que pela origem da estirpe.

Observou-se que, em condições esterilizadas, quando é feita inoculação com uma estirpe que produz nódulos pretos em determinada espécie, não ocorre formação de nódulos de coloração normal. Esta observação e o fato de que, nos experimentos em vasos com solo (Tabela 3) e no campo (Tabela 4) não foi verificada a ocorrência de estirpes formadoras de nódulos pretos no tratamento sem inoculação, permitem concluir que é evidente a possibilidade de utilização destas estirpes na identificação do *Rhizobium* inoculado, sendo, entretanto, esta característica, inerente às leguminosas tropicais, como foi comprovado pelos trabalhos de Stamford et al. (1968), Campelo & Campelo (1970) e Stamford & Neptune (1979).

O pequeno número de nódulos pretos nos três experimentos com solo (Tabelas 3 e 4) mostra a fraca competitividade das estirpes inoculadas com os do solo. Com exceção de calopogônio com

TABELA 2. Nodulação e eficiência das estirpes normais e pretas em inoculação cruzada, no experimento em vasos-de-leonard\*.

Leguminosa Estirpe	Nodulação					Parte aérea + raiz	
	Número**			Peso		Nitrogênio	
	Normal	Preto	Total	Total	Médio	Teor	Total acumulado
	por/vaso			mg/vaso		%	mg/vaso
<b>Soja perene</b>							
Do - 37	91	0	91 a	55 a	0,6	3,0 a	18 a
K - 28	43	0	43 ab	29 a	0,5	2,2 a	13 ab
CB - 756	56	0	56 ab	43 a	0,7	2,6 a	18 a
Do - 4 b	19	0	19 b	7 a	0,3	1,8 a	5 b
C - 102	61	0	61 ab	35 a	0,5	2,8 a	17 ab
C - 100	34	0	34 b	22 a	0,6	2,5 a	10 ab
CM - 7	73	0	73 ab	27 a	0,3	2,4 a	14 ab
CM - 2	28	0	28 b	20 a	0,7	2,3 a	11 ab
<b>Labe-labe</b>							
Do - 37	0	60	60 ab	421 a	17,0	3,0 a	121 ab
K - 28	16	0	16 b	255 b	16,0	1,5 ab	53 cd
CB - 756	0	49	49 ab	337 ab	6,8	2,7 ab	121 ab
Do - 4 b	54	0	54 a	355 ab	6,5	2,8 ab	57 c
C - 102	0	69	69 a	294 ab	6,8	2,5 ab	85 b
C - 100	44	0	44 ab	440 a	10,0	2,5 ab	92 b
CM - 7	0	70	70 a	540 a	7,7	2,9 ab	145 a
CM - 2	15	0	15 b	73 c	4,8	1,2 b	32 d
<b>Centrosema</b>							
Do - 37	44	0	44 a	44 a	1,0	2,4 a	17 ab
K - 28	0	0	0 b	0 b	0,0	1,6 a	8 b
CB - 756	0	0	0 b	0 b	0,0	1,9 a	11 b
Do - 4 b	0	0	0 b	0 b	0,0	1,6 a	11 b
C - 102	9	66	75 a	70 a	1,1	3,1 a	25 a
C - 100	90	0	90 a	103 a	1,0	2,9 a	29 a
CM - 7	7	41	48 a	49 a	1,0	2,1 a	17 ab
CM - 2	0	0	0 b	0 b	0,0	1,6 a	10 b
<b>Kudzu</b>							
Do - 37	0	16	16 a	63 ab	4,0	2,1 a	6 a
K - 28	23	0	23 a	10 b	0,4	1,8 a	7 a
CB - 756	7	0	7 b	77 ab	11,0	1,9 a	6 a
Do - 4 b	15	0	15 a	42 ab	2,8	2,0 a	6 a
C - 102	0	11	11 a	99 a	0,9	2,8 a	8 a
C - 100	21	0	21 a	46 ab	2,0	1,4 a	4 a
CM - 7	19	0	19 a	69 ab	3,6	2,4 a	7 a
CM - 2	0	0	0 b	0 b	0,0	1,1 a	2 a
<b>Calopogônio</b>							
Do - 37	0	147	147 a	23 a	0,1	2,4 ab	17 ab
K - 28	55	0	55 b	8 a	0,1	1,6 ab	6 b
CB - 756	0	110	110 ab	17 a	0,3	3,0 ab	24 a
Do - 4 b	103	0	103 ab	27 a	0,2	2,4 ab	22 a
C - 102	0	156	156 a	18 a	0,1	3,2 a	29 a
C - 100	93	0	93 ab	20 a	0,2	2,1 ab	16 ab
CM - 7	0	116	116 ab	22 a	0,1	2,7 ab	24 a
CM - 2	0	0	0 c	0 a	0,0	1,4 b	7 b
CV (%)			33,2	36,4		10,0	20,4

\* Letras diferentes indicam diferença significativa (Tukey 1%).

\*\* Incluídos como normais, os nódulos jovens em formação.

TABELA 3. Nodulação e eficiência das estirpes em inoculação cruzada, no experimento de vasos com solo\* (médias de quatro repetições).

Espécie de leguminosa	Tratamento com inoculante	Nódulos			Parte aérea + raiz		
		Número de nódulos**		Peso dos Nódulos	Nitrogênio		
		Normal	Preto		Total	Teor	Total acumulado
			por planta		mg/vaso	%	mg/vaso
Soja perene	Testemunha	77	0	77 a	179 a	2,0 b	36 a
	Preto (Do - 37)	59	0	59 a	166 a	2,5 a	52 a
	Normal (CB - 756)	56	0	56 a	175 a	2,3 ab	46 a
Labe labe	Testemunha	71	0	71 a	430 a	1,6 b	77 a
	Preto (Do - 37)	56	5	61 a	581 a	1,8 ab	88 a
	Normal (Do - 4 b)	60	0	60 a	501 a	2,2 a	108 a
Centrosema	Testemunha	53	0	53 a	275 a	2,3 a	32 a
	Preto (C - 102)	38	13	51 a	384 a	2,4 a	34 a
	Normal (C - 100)	36	0	36 a	247 a	1,8 b	25 a
Kudzu	Testemunha	22	0	22 a	260 a	2,5 a	18 a
	Preto (Do - 37)	26	3	29 a	373 a	2,3 a	23 a
	Normal (K - 28)	35	0	35 a	281 a	2,2 a	22 a
Colopogônio	Testemunha	233	0	233 a	198 a	2,9 a	52 a
	Preto (CM - 7)	84	95	179 a	319 a	2,9 a	61 a
	Normal (CM - 2)	181	0	181 a	201 a	2,9 a	49 a
CV (%)			31,0	20,6	5,7	12,0	

\* Incluídos como nódulos normais os ainda em formação (nódulos jovens).

\*\* Letras diferentes indicam diferença significativa (Tukey 5%).

TABELA 4. Nodulação de três leguminosas forrageiras tropicais inoculadas com estirpes formadoras de nódulos normais e pretos e sem inoculação, em condições de campo<sup>1</sup>, microparcela<sup>2</sup> e parcela usual (média de quatro repetições).

Leguminosa	Estirpe do inoculante	Número de nódulos <sup>3</sup>				Peso de nódulos <sup>3</sup>	
		Normais		Pretos		Totais	
		Microparcela	Parcela usual	Microparcela	Parcela usual	Microparcela	Parcela usual
			por cova			mg/cova	
Labe labe	Normal (Do - 4 b)	86 a	—	0	—	1,10 ab	—
	Preto (Do - 37)	47 b	—	4	—	1,45 a	—
	Sem inoculação	53 b	—	0	—	0,72 b	—
Centrosema	Normal (C - 100)	57 b	10 a	0	0	0,19 ab	0,71 a
	Preto (C - 102)	76 a	12 a	12	0	0,37 a	0,51 a
	Sem inoculação	76 a	16 a	0	0	0,17 b	0,69 a
Kudzu	Normal (K - 28)	37 ab	—	0	—	0,18 b	—
	Preto (Do - 37)	44 a	—	10	—	0,27 a	—
	Sem inoculação	22 b	—	0	—	0,22 b	—
CV (%)		(a) = 8,6	37,0			(a) = 7,3	31,1
		(b) = 25,6				(b) = 26,7	

<sup>1</sup> Letras diferentes indicam diferença significativa (Tukey 5%), sendo no experimento em microparcels (a) o coeficiente de variação nas parcelas e (b) nas sub-parcelas.<sup>2</sup> No experimento em parcela usual só foi utilizada a leguminosa centrosema.<sup>3</sup> Valores transformados em  $\sqrt{x+1}$  na análise estatística.

CM-7 (Tabela 3), as estirpes inoculadas não conseguem formar nem a metade dos nódulos.

### CONCLUSÕES

1. Ocorre diferenciação na especificidade hospedeira das leguminosas tropicais colocando-se centrosema e kudzu tropical como as mais específicas, e calopogônio como a mais promíscua.

2. As estirpes pretas só produzem nódulos pretos, e portanto, podem ser usadas na identificação do *Rhizobium* do inoculante.

3. Nos experimentos com solo, tanto em casa de vegetação como no campo, em nenhum caso o tratamento-testemunha apresentou nódulos pretos, o que indica ser muito escassa a ocorrência destas estirpes no solo.

4. A formação de nódulos pretos depende da espécie de leguminosa e da estirpe de *Rhizobium*, e, portanto, o método proposto deverá usar estirpes específicas para cada leguminosa.

5. As estirpes pretas, de maneira geral, foram mais eficazes, e a melhor estirpe para cada espécie foi, sempre, uma produtora de nódulos pretos.

### REFERÊNCIAS

- BOWEN, G.D. Specificity and nitrogen fixation in the *Rhizobium* symbiosis of *Centrosema pubescens* Benth. *Queensl. J. Agric. Sci.*, 16:267-82, 1959.
- BREMNER, J.M. Total nitrogen. In: BLACK, C.A., ed. *Methods of soil analysis*. Madison, American Society of Agronomy, 1965. Parte 2, cap. 83. p.149-78. (Agronomy, 9)
- BROADBENT, F.E. & NAKASHIMA, T. Plant recovery of immobilized nitrogen in greenhouse experiments. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 29(1):55-60, 1965.
- CAMPELO, A.B. & CAMPELO, C.R. Eficiência da inoculação cruzada entre espécies da subfamília mimosoidae. *B. téc. Inst. Pesq. Exp. Agropec. Centro-Sul*, (93), 1970.
- CLOONAN, M.J. Black nodules on dolichos. *Aust. J. Sci.*, 26(4):121, 1963.
- DATE, R.A. & VINCENT, J.M. Determination of the number of root nodules bacteria in presence of other organisms. *Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb.*, 2:5-7, 1962.
- DÖBEREINER, J. Black nodules in *Centrosema pubescens*. *Soil Biol. Int. News Bull.*, 2:33, 1964.
- DÖBEREINER, J. & COSER, A.C. Effectiveness of natural nodulation and cross inoculation of tropical forage legumes. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE MICROBIOLOGIA, 10., México, 1970. *Anais. s.n.t.*
- GUZMAN, I. & DÖBEREINER, J. Effectiveness and efficiency in the symbiosis of four cross-inoculated tropical legumes. *Rev. Lationam. Microbiol. Parasitol.*, 11:137-40, 1969.
- LEONARD, L.T. Methods of testing legume bacteria cultures and results of tests commercial inoculants. *U.S. Dep. Agric. Circ.*, (703), 1944.
- NORRIS, O.D. The inoculants and lime pelleting for tropical legumes. *Trop. Grassl.*, 1(2):107-21, 1967.
- STAMFORD, N.P.; CAMPELO, A.B.; DÖBEREINER, J. Efficient and inefficient black nodules and their cross inoculation in various legumes. In: REUNIÃO LATINO AMERICANA SOBRE INOCULANTES PARA LEGUMINOSAS, 4., Porto Alegre, 1968. *Anais. Porto Alegre, UFRGS*, 1968. p.76-80.
- STAMFORD, N.P. & NEPTUNE, A.M.L. Especificidade hospedeira e competição entre estirpes de *Rhizobium* em inoculação cruzada com quatro cultivares de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Cad. Ômega*, 3(1/2): 25-34, 1979.