

# EFICIÊNCIA DE INOCULANTES COMERCIAIS DE ESTIRPES NATIVAS DE RHIZOBIUM PARA SEIS LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS EM UM SOLO DE CERRADO<sup>1</sup>

MILTON ALEXANDRE T. VARGAS e ALLERT ROSA SUHET<sup>2</sup>

**RESUMO** - Experimento de campo num solo virgem de cerrado, em Brasília, DF, com as leguminosas: *Centrosema pubescens*, *Stylosanthes capitata*, *Macroptilium atropurpureum*, *Galactia striata* e *Calopogonium mucunoides*, com o fim de estudar a eficiência de inoculantes comerciais e de estirpes nativas de *Rhizobium*. O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, com quatro repetições, utilizando-se um fatorial completo de 3 x 6. Os tratamentos foram: a) testemunha, b) inoculação, e c) inoculação + 75 kg/ha de N. Não foi feita calagem do solo, mas foi incluído um tratamento adicional de 1 t/ha de calcário, em duas leguminosas. A inoculação nas leguminosas estudadas não produziu efeito benéfico, exceto na *Centrosema pubescens*, na qual elevou a nodulação, o N total e a produção de massa seca, em relação à testemunha. O tratamento com adubação nitrogenada obteve os melhores resultados em *Centrosema pubescens*, *Macroptilium atropurpureum*, *Calopogonium mucunoides* e *Galactia striata*, indicando que a simbiose foi pouco efetiva nessas espécies. No baixo nível de fertilização usado no experimento, a simbiose com as estirpes nativas foi suficiente para suprir todo o nitrogênio necessário à *Stylosanthes capitata* e à *S. bracteata*. A adição de calcário aumentou a nodulação, o N total e a produção de forragem da *Centrosema pubescens* e do *Stylosanthes capitata*. Os resultados indicam que os inoculantes comerciais testados não foram eficientes para as espécies estudadas. O nível de atividade da nitrogenase nas parcelas que não receberam inoculação indicou a presença no solo de uma microflora autóctone com habilidade de fixar N<sub>2</sub>. A seleção de estirpes de *Rhizobium* dentro desta população nativa apresenta-se como um método promissor para a obtenção de inoculantes mais adequados para a região dos cerrados.

Termos para indexação: leguminosas forrageiras, inoculação, *Rhizobium*, estirpes nativas, cerrado.

## EFFICIENCY OF COMMERCIAL INOCULANTS AND NATIVE RHIZOBIUM STRAINS IN SIX FORAGE LEGUMES ON A CERRADO SOIL

**ABSTRACT** - A field experiment was carried out with the legumes *Centrosema pubescens*, *Stylosanthes capitata*, *S. bracteata*, *Macroptilium atropurpureum*, *Galactia striata* and *Calopogonium mucunoides* in a virgin cerrado soil in order to study the efficiency of commercial inoculants and of native *Rhizobium* strains. The statistical design was a complete factorial 3 x 6 in randomized blocks. The treatments were: a) check, b) inoculation and c) inoculation + 75 kg/ha N. The soil was not limed, but an additional treatment of 1 t/ha of lime was included with two of the legumes. The inoculation had no effect on the forage legumes studied except for the *Centrosema pubescens*, where inoculation increased the nodulation, dry weight and total N of the plants, compared to the check. The treatment receiving nitrogen was the best for *C. pubescens*, *Macroptilium atropurpureum*, *Calopogonium mucunoides* and *Galactia striata* indicating that symbiosis was not efficient in these species. Under the low soil fertility conditions of the experiment, the symbiosis with the native strains was sufficient to supply all the nitrogen necessary to *Stylosanthes capitata* and *S. bracteata*. The addition of lime to *Centrosema pubescens* and *Stylosanthes capitata* improved the nodulation, total N and dry weight of plants. The results indicate that the commercial inoculants tested were not satisfactory for the species studied. The nitrogenase activity level in the treatments that received no inoculation indicates the presence of a native nitrogen-fixing microflora in the soil. The selection of *Rhizobium* strains from within the native population is suggested as a promising method to obtain more adequate inoculants for the "cerrados" region.

Index terms: forage legumes, inoculation, native strains, *Rhizobium*, cerrado.

## INTRODUÇÃO

Vários autores (Adegbola & Onayinka 1966, Horrel & Court 1965, Chandapillai 1972) têm men-

cionado a ocorrência de nódulos efetivos em plantas não inoculadas de *Stylosanthes guyanensis* em diferentes regiões de clima tropical. Nos cerrados, tanto em áreas virgens quanto em cultivadas, é frequentemente observada a ocorrência natural de nódulos em plantas de várias espécies de leguminosas forrageiras. Entretanto, não há informações sobre a contribuição desta nodulação em termos de ni-

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 4 de outubro de 1980.

<sup>2</sup> Eng.<sup>o</sup> Agr.<sup>o</sup> M.Sc., Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados (CPAC) - EMBRAPA, Caixa Postal 70/0023, CEP 73.300 - Planaltina, DF.

trogênio para as plantas. Também não existem dados que comprovam algum efeito da inoculação de leguminosas forrageiras nos cerrados.

Date (1977) classifica as espécies dos gêneros *Calopogonium*, *Galctia*, *Macroptilium* e *Stylosanthes* como promíscuas (grupo PE), ou seja, nodulam efetivamente com estirpes de *Rhizobium* do grupo "Cowpea". Segundo Norris (1956), as estirpes desse grupo estão tão disseminadas em solos tropicais, que as leguminosas do grupo PE raramente respondem à inoculação. Contudo, Souto et al. (1972) observaram que o *Stylosanthes guyanensis* variedade IRI-1022 apresenta certa especificidade ao *Rhizobium*, pois não foi capaz de nodular com a maioria das estirpes do grupo "Cowpea" testadas em vasos Leonard. Franco & Döbereiner (1971) trabalhando com esta mesma variedade, observaram efeito negativo da inoculação com uma mistura de estirpes desse grupo. Ao contrário das espécies mencionadas acima, a *Centrosema pubescens* é classificada por Date (1977) como pertencente ao grupo PI, definido como o de leguminosas que nodulam com um grande número de estirpes, mas que apresentam uma simbiose efetiva apenas com um número limitado delas. Bowen (1959) e Döbereiner (1970) verificaram que esta espécie apresenta uma especificidade hospedeira mediana.

Lopes et al. (1971) trabalhando com *Macroptilium atropurpureum* e *Glycine wightii*, observaram que estirpes nativas de *Rhizobium* presentes em dois solos de cerrado foram capazes de nodular essas leguminosas, mas com eficiência inferior à de estirpes comerciais. Vargas et al. (1979) em trabalho desenvolvido visando determinar a eficiência de inoculantes comerciais para as leguminosas *Pueraria phaseoloides*, *Galactia striata*, *Centrosema pubescens*, *Glycine wightii* e *Macroptilium atropurpureum*, evidenciaram a ocorrência de estirpes ineficientes nativas em um solo aluvial, que competiram com o *Rhizobium* introduzido, impedindo o seu estabelecimento.

Date (1976) enfatiza a importância de se comprovar a necessidade de inoculação, como um pré-requisito para se iniciar um programa de seleção de estirpes em determinada região. O autor cita que, através de experimentos simples, pode-se obter informações sobre a capacidade de estirpes nativas em fixar dinitrogênio, e sobre a contribuição de es-

tirpes comerciais na produção de leguminosas, bem como sobre a capacidade dessas estirpes em competir, por sítios de infecção nodular, com as estirpes nativas.

Foi objetivado com este trabalho o estudo do comportamento de inoculantes comerciais para as leguminosas forrageiras *Centrosema pubescens*, *Stylosanthes capitata*, *S. bracteata*, *Macroptilium atropurpureum*, *Galactia striata* e *Calopogonium mucunoides* e da capacidade das estirpes nativas do solo de fixar dinitrogênio em associação com as leguminosas testadas, tendo como referência um tratamento com N mineral. Foi planejado também o estudo da viabilidade do cultivo de leguminosas forrageiras sem a correção da acidez do solo.

#### MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em condições de campo no Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados (CPAC), Brasília, DF, em solo virgem, classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo, textura argilosa. A análise química do solo indicou os seguintes valores: pH = 4,75; 0,40mE  $Al^{3+}$ /100cc; 0,57mE  $Ca^{2+} + Mg^{2+}$ /100cc; 1 ppm de P e 37 ppm de K. O solo foi preparado por meio de uma aração, duas gradagens, uma rastelagem mecânica e uma catação manual de raízes. Foi efetuada uma adubação a lanço, com 80 kg/ha de  $P_2O_5$  (superfosfato simples), 60 kg/ha de  $K_2O$  (cloreto de potássio) e 20 kg/ha de FTE (BR - 10), incorporados com uma grade pesada. Não foi feita a calagem em virtude da tendência atual de se direcionar a pesquisa para espécies e variedades de forrageiras tolerantes à acidez dos solos de cerrados, (W. Couto<sup>3</sup>).

O delineamento experimental usado foi o de blocos ao acaso, com quatro repetições, utilizando-se um fatorial completo de 3 x 6 como modelo estatístico. Testaram-se três tratamentos: a) testemunha, b) inoculação e c) inoculação + N mineral, e as leguminosas: *Centrosema pubescens*, *Stylosanthes capitata* CIAT 1078, *S. bracteata* CPAC 139, *Macroptilium atropurpureum* cv. Siratro, *Galactia striata* e *Calopogonium mucunoides*. Foi incluído um tratamento adicional com 1 t/ha de calcário dolomítico (PRNT 100%), aplicado junto com a adubação básica, para as leguminosas *Stylosanthes capitata* e *Centrosema pubescens*. Esta calagem elevou o pH para 4,90 e o  $Ca^{2+} + Mg^{2+}$  para 1,27mE/100cc, e reduziu o  $Al^{3+}$  para 0,10mE/100cc. A inoculação foi efetuada com 1 kg de inoculante/14 kg de semente. Os inoculantes utilizados foram provenientes de uma firma comercial. A análise dos mesmos revelou uma população de *Rhizobium* acima de  $10^8$  células/g, pela contagem em meio sólido (Fred & Waksman 1928) e acima de  $10^6$  células/g, pelo

<sup>3</sup> Comunicação pessoal.

processo de infecção de plantas (Vincent 1970). A adubação nitrogenada foi de 75 kg/ha de N (uréia), dividida em três épocas (aos 14, 77 e 99 dias após o plantio).

As parcelas tiveram as dimensões de 2 m x 4 m, e o espaçamento entre as linhas foi de 0,50 m. As sementes de *Stylosanthes* foram escarificadas com ácido sulfúrico concentrado (10 minutos) e as das demais leguminosas, com água a 100°C (alguns segundos). A semeadura foi efetuada em covas espaçadas de 40 cm. Após a emergência, efetuou-se o desbaste deixando-se uma planta por cova.

Foram avaliados o peso e o número dos nódulos, a atividade da nitrogenase, o nitrogênio total e o peso da parte aérea, aos 125 dias após o plantio, coletando-se oito plantas por parcela.

Para a avaliação da atividade da nitrogenase, as raízes e os nódulos de quatro plantas foram colocadas em frascos de 260 ml (2 frascos/parcela) e incubadas com acetileno (10% do volume do frasco) por uma hora, à temperatura ambiente. Após o período de incubação, o etileno evoluído foi determinado em um cromatógrafo de gás CG-27 Instrumentos Científicos, com coluna Poropak N e nitrogênio como gás de arraste. A atividade da nitrogenase foi expressa em etileno evoluído por planta por hora (Hardy et al. 1973).

Para a avaliação do número e peso dos nódulos, estes foram destacados das raízes após a determinação da atividade da nitrogenase, secos à 65°C por 48 horas, contados e pesados. A parte aérea das plantas foi também seca, para a determinação do seu peso e do teor de nitrogênio pelo método micro-Kjeldahl (Tedesco 1978). Para a análise estatística todos os dados foram transformados em média por planta, tomando-se por base as oito plantas coletadas por parcela.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão apresentados os dados referentes às avaliações efetuadas aos 125 dias, o coeficiente de variação e o teste de normalidade segundo Shapiro & Wilk (1965). A análise estatística foi feita por espécie e iniciada pelo teste de normalidade dos dados. Nos casos em que os dados não apresentaram distribuição normal, foi feito um estudo da distribuição dos resíduos (Neter & Wasserman 1974) identificando e excluindo da análise os pontos "outliers" que prejudicavam a distribuição uniforme dos resíduos. Mediu-se a eficiência desta eliminação aplicando-se novamente o teste de normalidade, e manteve-se a eliminação apenas nos casos em que a probabilidade elevou-se para mais de 50%. Na Tabela 1 está indicado entre parênteses o número de observações eliminadas em cada caso. Nos casos em que esta probabilidade ficou abaixo

de 50%, foi efetuada uma transformação dos dados, segundo recomendação de Snedecor & Cochran (1973), e novamente aplicado o teste de normalidade para verificar os benefícios da transformação. Estes benefícios só foram verificados com a transformação para  $\sqrt{x+1}$  dos dados referentes ao peso da parte aérea do *Stylosanthes capitata*. Os dados de N total do *Stylosanthes bracteata*, do peso da parte aérea do *Macroptilium atropurpureum* e do peso dos nódulos da *Galactia striata* foram transformados para  $\sqrt{x+1}$ , mas mesmo assim não apresentaram uma distribuição normal. Assim, estes dados estão incluídos na Tabela 1, mas não foram analisados estatisticamente. A análise de variância e o teste de comparação entre os tratamentos foram feitos apenas para os casos em que a probabilidade dos dados estarem dentro da distribuição normal era maior do que 50%.

Os tratamentos foram comparados com o tratamento com inoculação, aplicando-se o teste t de Student (Steel & Torrie 1960) aos contrastes formados pelo tratamento "inoculação" e cada um dos outros tratamentos. A análise estatística mostrou-se bastante rigorosa, provavelmente por causa do baixo grau de liberdade do resíduo e do elevado erro residual. Assim, chamaremos atenção para algumas diferenças expressivas mesmo não tendo sido estatisticamente significativas ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste t. Deve ser enfatizado que o experimento foi conduzido em um solo com baixo nível de fertilidade e sem calagem. Resultados bem diferentes poderiam ser obtidos se fosse efetuada a correção da acidez do solo e aplicado um nível adequado de fertilização.

Observando-se os dados da Tabela 1, verifica-se que o tratamento com adubação nitrogenada foi superior ao tratamento com inoculação para o peso da parte aérea e do nitrogênio total das espécies *Centrosema pubescens*, *Galactia striata*, *Calopogonium mucunoides* e *Macroptilium atropurpureum*, embora em alguns casos as diferenças não tenham sido estatisticamente significativas. Isto indica que a simbiose não foi capaz de suprir satisfatoriamente estas espécies com nitrogênio, e que os inoculantes comerciais, possuindo estirpes reconhecidamente eficientes para estas quatro espécies, não foram capazes de produzir uma nodulação satisfatória

TABELA 1 — Efeito da inoculação e da adubação nitrogenada em seis leguminosas forrageiras. Dados médios de 32 plantas (oito plantas por repetição)<sup>a</sup>.

Espécie	Tratamentos	Nódulos/planta		$\mu$ moles C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> por planta/h	Parte aérea/planta	
		Número	Peso (mg)		Peso (g) <sup>b</sup>	N Total (mg)
<i>C. pubescens</i>	Testemunha	3,6	14,6*	1,37	1,53	58
	Inoculação	7,5	30,1	1,95	1,97	77
	Inoc. + N	1,4	0,7*	0,04(1)*	5,32(1)*	219 (2)*
	Inoc. + Calc.	10,3	45,9*	2,96(1)	3,45(1)*	129 (1)*
	Coef. de variação (%)	71	43	46	11	18
T. de normalidade (%)	91	85	97	68	97	
<i>S. capitata</i>	Testemunha	12,9	1,6	0,39	2,70	94
	Inoculação	12,3 (1)	1,3	0,27	1,98	67
	Inoc. + N	5,3*	0,6	0,04	1,98	71
	Inoc. + Calc.	15,7(1)	2,3	0,57(2)	3,66	118
	Coef. de variação (%)	21	55	84	22	57
T. de normalidade (%)	70	91	86	50	82	
<i>S. bracteata</i>	Testemunha	39,1(1)	11,1	5,06(1)	7,28	238
	Inoculação	36,2(1)	8,1	3,25	8,34	254
	Inoc. + N	6,6*	1,1*	0,70(1)*	6,20	209
	Coef. de variação (%)	39	47	39	48	47
	T. de normalidade (%)	76	64	64	74	45
<i>M. stropurpureum</i>	Testemunha	2,8	12,3	1,78(1)	17,92	477(1)
	Inoculação	3,9	21,0	1,86	16,72	487(1)
	Inoc. + N	3,4	12,2	0,43(1)	26,71	794
	Coef. de variação (%)	76	70	45	34	27
	T. de normalidade (%)	96	71	83	3	97
<i>G. striata</i>	Testemunha	32,0(1)*	61,7	9,30	10,29	386
	Inoculação	27,5(1)	56,2	8,22	10,01	377
	Inoc. + N	10,8*	6,0	1,18	15,31	560
	Coef. de variação (%)	7	36	39	30	29
	T. de normalidade (%)	89	37	60	67	90
<i>C. mucunoides</i>	Testemunha	37,7	18,3	3,37(2)	6,84	205(1)
	Inoculação	46,7	19,8	3,24	8,78	245
	Inoc. + N	26,0	11,4	1,08*	17,25*	562(1)*
	Coef. de variação (%)	34	55	11	14	12
	T. de normalidade (%)	97	75	75	58	99

<sup>a</sup> As médias seguidas de asterisco diferem significativamente do tratamento com inoculação, pelo teste de Student ao nível de 5%. A análise estatística foi efetuada por espécie de leguminosa. Os valores entre parênteses indicam o número de observações eliminadas do tratamento.

<sup>b</sup> Para análise estatística os dados referentes ao *Stylosanthes capitata* foram transformados em  $\sqrt{x + 1}$ .

<sup>c</sup> Teste de normalidade segundo Shapiro & Wilk (1965). Os dados que apresentaram valores superiores a 50% para esse teste foram considerados como apresentando uma distribuição normal.

com estas leguminosas, em razão de algum fator do solo ou da competição com o *Rhizobium* nativo. Isto sugere a necessidade de seleção de estirpes adaptadas às condições de cerrado e de estudos ecológicos do *Rhizobium* associado a estas espécies. Nas espécies de *Stylosanthes*, a adubação com 75 kg/ha de nitrogênio não elevou a produção de massa seca e nitrogênio total, indicando que, nas condições de baixo nível de fertilidade do experimento, a associação do *Rhizobium* com essas leguminosas foi capaz de suprir o nitrogênio num nível satisfatório para as plantas. Contudo, em virtude do pouco desenvolvimento do *S. capitata*, os resultados obtidos com esta espécie não podem ser considerados conclusivos. A cultivar CIAT 1078, usada neste trabalho, apresenta crescimento lento na fase inicial do seu ciclo, tendo o período experimental (125 dias), provavelmente, sido insuficiente para que as plantas apresentassem uma produção razoável.

Na comparação do tratamento testemunha com o tratamento com inoculação notam-se três situações distintas, ou seja: um efeito negativo, um efeito positivo e nenhum efeito da inoculação, conforme a espécie analisada. O efeito negativo foi evidenciado nas espécies *Stylosanthes capitata* e *Galactia striata*. Na *G. striata* houve uma redução na nodulação, mas que não se refletiu em redução de peso da parte aérea e de nitrogênio total, o que sugere uma maior eficiência das estirpes do inoculante comercial do que das estirpes nativas. Já no *Stylosanthes* houve uma redução no peso da parte aérea e do nitrogênio total, embora não tenha havido uma redução na nodulação. Esta redução pode ser atribuída à presença de estirpes de *Rhizobium* sp nativas no solo, mais eficientes para esta espécie do que as presentes no inoculante comercial, que sofreram a competição destas últimas, favorecidas pela maior concentração e proximidade das raízes. Franco & Döbereiner (1971) obtiveram resultados semelhantes com o *S. guyanensis* IRI-1022.

Na *Centrosema pubescens* notou-se um efeito positivo da inoculação, consistente em todas as avaliações, embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significativas, exceto para o peso de nódulos. Este efeito positivo está de acordo com o que se esperava para esta espécie que, segundo Bowen (1959) e Döbereiner (1970), possui uma

mediana especificidade hospedeira e, segundo Date (1977), apresenta uma simbiose efetiva apenas com um grupo restrito de estirpes de *Rhizobium*, havendo necessidade de inoculação mesmo quando é cultivada em um solo com alta população de *Rhizobium*. Pode-se verificar na Tabela 1 que o aumento no peso e no número de nódulos desta espécie foi de mais de 100%.

Nas espécies *Stylosanthes bracteata*, *Macroptilium atropurpureum* e *Calopogonium mucunoides*, as diferenças entre os tratamentos testemunha e com inoculação não chegaram a ser expressivas, havendo apenas um aumento do peso de nódulos do *M. atropurpureum* com a inoculação. Estes dados confirmam as observações de Norris (1956) sobre a larga distribuição de estirpes de *Rhizobium* do grupo "Cowpea" em solos tropicais, responsáveis pela ausência de resposta à inoculação de leguminosas do grupo PE (Date 1977).

O tratamento adicional de 1t/ha de calcário elevou significativamente o peso de nódulos e o nitrogênio total da parte aérea da *C. pubescens* em relação ao tratamento com inoculação. Para o *Stylosanthes capitata*, a adição de calcário promoveu um aumento em todas as variáveis avaliadas, embora as diferenças não tenham sido estatisticamente significativas. Estes dados indicam a necessidade da adição de calcário ao solo, mesmo para leguminosas nativas da região, como o *S. capitata*, e concordam com as observações de Vargas & Döbereiner (1974) que encontraram efeito significativo da calagem na nodulação e no nitrogênio total do *S. guyanensis* IRI-1022.

O nível da atividade da nitrogenase, verificado nas plantas das parcelas que não receberam inoculantes, em todas as leguminosas, indica a presença de estirpes de *Rhizobium* sp nativas no solo, com habilidade em fixar dinitrogênio. Para o *S. guyanensis* já se tinha verificado a ocorrência de nódulos efetivos em plantas que não tinham sido inoculadas, em diferentes regiões do mundo (Adegbola & Onayinka 1966, Horrel & Court 1965, Chandapillai 1972). Isto sugere a possibilidade da seleção de estirpes eficientes de *Rhizobium* sp, a partir da população nativa no solo, visando a obtenção de inoculantes mais adequados para o uso em solos de cerrados.

Tendo em vista a variação de resposta das dife-

rentes espécies, os autores concordam com Date (1976) que enfatiza a importância de se comprovar a necessidade da inoculação e de se estudar a capacidade de estirpes comerciais de competir por sítios de infecção nodular com as estirpes nativas, reunindo informações que irão determinar os critérios a serem seguidos num programa de seleção de estirpes para as diferentes espécies forrageiras.

### CONCLUSÕES

1. A simbiose com as estirpes nativas foi suficiente para suprir as necessidades de nitrogênio do *Stylosanthes bracteata* e *S. capitata*.

2. Os inoculantes comerciais testados não foram eficientes para a *Centrosema pubescens*, *Galactia striata*, *Macroptilium atropurpureum* e *Calopogonium mucunoides*, quando comparados com o tratamento que recebeu nitrogênio mineral.

3. A presença de uma microflora autóctone capaz de fixar N<sub>2</sub> em associação com as leguminosas testadas, possibilita a seleção de estirpes adaptadas às condições dos cerrados, visando a produção de inoculantes mais adequados para a região.

4. A adição de calcário tem um efeito expressivo no comportamento da *Centrosema pubescens* e do *Stylosanthes capitata*.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Técnico de Laboratório Ademildo Santos da Silva, ao Auxiliar de Laboratório Emílio Taveira e ao Técnico Agrícola Osmar Teago pelo valioso auxílio na instalação e condução do experimento.

### REFERÊNCIAS

- ADEGBOLA, A. A. & ONAYINKA, B. Some observations on the responses of *Stylosanthes gracilis* to seed inoculation. *Niger. Agric.*, 3: 35-8, 1966.
- BOWEN, G. D. Specificity and nitrogen fixation in the *Rhizobium* symbiosis of *Centrosema pubescens* Benth. *J. Agric. Sci.*, 16: 267-82, 1959.
- CHANDAPILLAI, M.M. Studies on the nodulation of *Stylosanthes guyanensis* Aubl. I. Effect of added organic matter in four types of Malaysian soil. *Trop. Agric., Trinidad.*, 49 (3): 205-13, 1972.
- DATE, R. A. Inoculation of tropical pasture legumes. Hawaii, University. Coop. Ext., 1977. p.299-311. (University Coop. Ext., Publ. Misc., 145).
- DATE, R. A. Principles of *Rhizobium* strain selection In: NUTMAN, P.S., ed. *Symbiotic nitrogen fixation in plants*. s.l. Cambridge Univ. Press. 1976. p.137-50.
- DOBEREINER, J. Inoculação cruzada e eficiência na simbiose de leguminosas tropicais. In: SEMINÁRIO SOBRE METODOLOGIA E PLANEJAMENTO DE PESQUISA COM LEGUMINOSAS TROPICAIS. Rio de Janeiro, IPEACS, 1970. Anais... Rio de Janeiro, IPEACS, 1970. p.181-92.
- FRANCO, A. A. & DOBEREINER, J. Eficácia da nodulação natural de cinco leguminosas forrageiras tropicais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 12, Curitiba, 1969. Anais... Guanabara. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Equipe de Pedologia e Fertilidade do Solo. 1971. p.35-6.
- FRED, E. B. & WAKSMAN, S. *Laboratory manual of general microbiology*. New York, McGraw Hill, 1928.
- HARDY, R. W. H.; BURNS, R. C. & HOLSTEN, R. D. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biol. Biochem.*, 5: 47-81, 1973.
- HORREL, C. R. & COURT, M. N. Effect of the legume *Stylosanthes gracilis* on pasture yields at Serere, Uganda. *J. Br. Grassl. Soc.*, 20: 72-6, 1965.
- LOPES, E. S.; LOVADINI, L.A.C.; GARGANTINI, H.; MIYASAKA, S. & LEON, J.C.C. Capacidade fixadora de nitrogênio de *Rhizobium* autóctone associado a soja perene e siratro, em dois solos do Estado de São Paulo. *Bragantia, Campinas*, 30: 145-54, 1971.
- NETER, J. & WASSERMAN, W. *Applied linear statistical models*. Illinois, R.D. Irwin Inc., 1974. 842p.
- NORRIS, D. O. Legumes and the *Rhizobium* symbiosis. *Emp. J. Exp. Agric.* 24: 247-70, 1956.
- SHAPIRO, S.S. & WILK, M.B. An analysis of variance test for normality. *Biometrika*, 52: 591-611, 1965.
- SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, G.G. *Statistical methods*. 6.ed. s.l. Iowa State University Press, 1973. 593p.
- SOUTO S. M.; CÔSER, A.C. & DOBEREINER, J. Especificidade de uma variedade nativa de alfafa do Nordeste (*Stylosanthes gracilis*) na simbiose com *Rhizobium* sp. *Pesq. agropec. bras. Sér. Zootec.*, 7: 1-5, 1972.
- STEEL, R.G.D. & TORRIE, J.H. *Principles and procedure of statistics*. New York, McGraw-Hill Book Comp. 1960. 481p.
- TEDESCO, M.J. Métodos de análise de nitrogênio total, amônia nítrito e nítrito em solos e tecido vegetal. Porto Alegre, Faculdade de Agronomia, Dept.º de Solos, 1978. 19p. (Informativo Interno, 1).
- VARGAS, A.A.T.; DESSAUNE FILHO, N. & ZANGRANDE, M.B. Avaliação da necessidade de inoculação de cinco leguminosas em um solo aluvial do Espírito Santo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 31, Fortaleza, CE. 1979. Anais... São Paulo, SBPC, 1979. p.518-9.
- VARGAS, M.A.T. & DOBEREINER, J. Efeito de níveis crescentes de calagem, manganês, magnésio e boro na simbiose e desenvolvimento vegetativo do *Stylosanthes guyanensis*. *Pesq. agropec. bras. Sér. Zootec.* 9: 21-8, 1974.
- VINCENT, J. M. *A manual for the practical study of the root-nodule bacteria*. Great Britain, Blackwell, 1970. 164p.