

SELEÇÃO INICIAL E CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DE RIZÓBIOS DE TABULEIROS COSTEIROS QUANDO ASSOCIADOS AO GUANDU⁽¹⁾

M. F. FERNANDES⁽²⁾ & R. P. M. FERNANDES⁽³⁾

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi selecionar e caracterizar parcialmente rizóbios de tabuleiros costeiros com alta capacidade de fixação biológica do N, quando associados ao guandu. Dezesesseis isolados de rizóbios de diferentes regiões desse ecossistema foram avaliados em casa de vegetação da Embrapa Tabuleiros Costeiros (Aracaju, SE). Quatro isolados destacaram-se quanto ao N acumulado (N_{ac}), matéria seca da parte aérea (MSPA), área foliar (AF) e matéria seca de nódulos (MSN). A MSN correlacionou-se com a MSPA, AF e N_{ac} . A relação N-ureído/N-total na seiva xilemática correlacionou-se com N_{ac} e MSN. Três desses isolados foram caracterizados (R1, R5 e R11) e apresentaram crescimento rápido e acidificaram o meio de cultura com manitol. Comparado ao R1 e R5, o isolado R11 foi o mais sensível aos antibióticos e o menos tolerante ao Al e às temperaturas elevadas.

Termos de indexação: alumínio, antibiótico, N-ureído, temperatura, *Cajanus cajan*.

SUMMARY: INITIAL SCREENING AND PARTIAL CHARACTERIZATION OF RHIZOBIA FROM A BRAZILIAN COASTAL TABLELAND WHEN ASSOCIATED TO PIGEONPEA

The aim of this study was to select and partially characterize efficient nitrogen-fixing rhizobia associated to pigeonpea from coastal tableland areas in the Northeast of Brazil. Sixteen rhizobia from different coastal tableland areas were evaluated under greenhouse condition, at the Embrapa Coastal Tablelands (Aracaju, Sergipe, Brazil). Four isolates performed better than the others in relation to shoot N content (NC), shoot dry weight (SDW),

⁽¹⁾ Trabalho financiado pela Fundação Banco do Brasil. Recebido para publicação em novembro de 1999 e aprovado em abril de 2000.

⁽²⁾ Pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros. Av. Beira Mar 3250, CEP 49025-040 Aracaju (SE). E-mail: marcelo@cpatc.embrapa.br

⁽³⁾ Professora Assistente do Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe - UFS. CEP 49100-000 São Cristóvão (SE).

leaf area (LA) and nodule dry weight (NDW). NDW showed high correlation with SDW, LA and NC. Xylem sap N-ureide/N-total ratio showed high correlation with NC and NDW. The three chosen isolates (R1, R5 and R11) showed fast growth rate and acidified culture medium with mannitol. Compared to R1 and R5, the isolate R11 was more sensitive to the antibiotics and less tolerant to Al and high temperature.

Index terms: aluminum, antibiotic, N-ureide, temperature, Cajanus cajan.

INTRODUÇÃO

Em estudos realizados em área do ecossistema de tabuleiro costeiro de Sergipe, observou-se que a inoculação de leguminosas com estirpes recomendadas para outras regiões do País falhou em incrementar o crescimento vegetal, os teores de N e a nodulação das plantas (Barreto & Fernandes, 1998). Possíveis causas da ausência de resposta à inoculação estão relacionadas com a baixa capacidade dessas estirpes em colonizar efetivamente as raízes, quando introduzidas em solo com uma população de rizóbios nativos estabelecida (Thies et al., 1991), ou com a baixa adaptabilidade das estirpes às condições edafoclimáticas da região.

Desse modo, para que a inoculação com rizóbios seja bem-sucedida, a estirpe deve apresentar, além de alta eficiência simbiótica, características de sobrevivência no solo e habilidade competitiva com a população rizobiana nativa (Brockwell, 1981). Tais características têm sido freqüentemente relacionadas com a maior resistência das estirpes a antibióticos, ao Al e a temperaturas elevadas, dentre outros fatores (Oliveira & Graham, 1990; Wolff et al., 1991; Xavier et al., 1998).

O objetivo deste estudo foi selecionar e caracterizar estirpes de rizóbios dos tabuleiros costeiros de Sergipe adaptadas às condições locais e com alta capacidade de fixação biológica do nitrogênio (FBN), visando obter inoculante eficiente para guandu.

MATERIAL E MÉTODOS

Raízes de guandu (*Cajanus cajan*), feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) e caupi (*Vigna unguiculata*) foram coletadas em diferentes áreas de tabuleiros costeiros de Sergipe (Quadro 1). O isolamento dos rizóbios a partir dos nódulos foi realizado em meio YMA com vermelho Congo, de acordo com Vincent (1970).

O efeito da inoculação do guandu com 16 isolados de rizóbios sobre o crescimento vegetal e FBN foi avaliado em experimento instalado em casa de vegetação, da Embrapa Tabuleiros Costeiros (Aracaju, SE). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, com seis repetições.

Quatro tratamentos adicionais sem inoculação e com adição de doses crescentes de N foram incluídos. Utilizaram-se vasos de Leonard com capacidade de 1 L em cada compartimento. Nos vasos dos tratamentos inoculados com rizóbios e nos da testemunha absoluta (sem inoculação e sem adição de N mineral), o compartimento superior foi preenchido com vermiculita, e o inferior, com solução nutritiva livre desse nutriente (Weaver & Frederick, 1982). Nos tratamentos com N mineral, a solução nutritiva foi a mesma, porém acrescida de NH_4NO_3 nas concentrações de 50, 100 ou 150 mg L^{-1} de N.

Três sementes de guandu desinfestadas com hipoclorito de sódio 6% (6 min) foram plantadas por vaso. Após uma semana do plantio, foi realizado o desbaste, deixando-se apenas uma planta por vaso. A inoculação com as estirpes de rizóbios foi feita no momento de plantio, utilizando-se 3 mL de suspensões de rizóbios por vaso. O inóculo foi padronizado para um valor de absorvância ($\lambda = 600 \text{ nm}$) igual a 1,0, após centrifugação das culturas por três min a 4.000 rpm. Os vasos dos tratamentos não inoculados receberam 3 mL de uma suspensão de rizóbio previamente autoclavada. Os compartimentos inferiores dos vasos de Leonard foram completados a cada três dias com a solução nutritiva livre de N.

O experimento foi coletado 60 dias após o plantio, cortando-se as plantas na altura do nó cotiledonar. A seiva xilemática exsudada na região do corte foi coletada por 30 min. Os teores de N-ureídeos (Vogels & van der Drift, 1970) e N-total (Bohley, 1967, citado por Hungria, 1994) da seiva foram determinados para estimar a percentagem de N-ureído na seiva do xilema $[(\text{N-ureído}/\text{N-total}) \times 100]$.

A área foliar (AF) foi obtida utilizando-se um aparelho Li-Cor. A matéria seca da parte aérea (MSPA) e a matéria seca de nódulos (MSN) foram determinadas após secagem desses materiais em estufa a 65°C, por 72 h.

Os teores de N na parte aérea foram analisados pelo método de Kjeldhal para obtenção dos valores de N acumulado (N_{ac}).

Os isolados R1, R5 e R11 foram selecionados para a etapa de caracterização, por estarem entre os mais promissores, de acordo com os resultados obtidos em vasos de Leonard.

Alíquotas de diluições seriadas de culturas dos isolados crescidos em YM líquido (28°C) foram

Quadro 1. Isolados de rizóbios nativos de tabuleiros costeiros de Sergipe e respectivas espécies hospedeiras e locais de origem⁽¹⁾

Isolado	Espécie	Local
R1	Guandu	N.S. Dores
R2	Guandu	Aracaju
R3	Guandu	Umbaúba
R4	Feijão-de-porco	Lagarto
R5	Feijão-de-corda	Aracaju
R6	Guandu	Aracaju
R7	Guandu	Umbaúba
R8	Feijão-de-corda	Umbaúba
R9	Guandu	Umbaúba
R10	Feijão-de-corda	Lagarto
R11	Guandu	Lagarto
R12	Feijão-de-corda	Aracaju
R13	Feijão-de-porco	Lagarto
R14	Feijão-de-porco	Lagarto
R15	Feijão-de-corda	Umbaúba
R16	Guandu	Umbaúba

⁽¹⁾ Os isolados de mesma espécie e mesmo local foram obtidos de nódulos provenientes de plantas distintas, localizadas a, pelo menos, 50 m entre si.

plaqueadas, a cada intervalo de duas horas de incubação, em meio YMA, para determinar o tempo de geração das bactérias. Após incubação das placas de YMA (36 h, 28°C), procedeu-se à contagem das unidades formadoras de colônias sob microscópio estereoscópico. Para calcular o tempo de geração, consideraram-se apenas os valores de concentração bacteriana incluídos na fase logarítmica da curva de crescimento.

A reação ácida ou básica durante o crescimento das bactérias foi avaliada em meio YMA com azul de bromotimol aos dois e quatro dias de incubação a 28°C.

A tolerância dos três isolados ao Al e a diferentes temperaturas foi avaliada pela medição do diâmetro das colônias crescidas em meio YMA, após quatro dias de incubação. Para o ensaio com Al, o meio YMA foi acrescido de sulfato de alumínio em quantidades suficientes para obtenção de concentrações aproximadas de 0, 5, 10, 20 e 50 mg L⁻¹ de Al, sendo a incubação das culturas realizada a 28°C. Para o ensaio de temperatura, avaliou-se o crescimento dos isolados a 28, 32 e 42°C.

A resistência intrínseca dos três isolados de rizóbios aos antibióticos tetraciclina, ampicilina, kanamicina, cloranfenicol, estreptomina e ácido nalidíxico foi determinada pela técnica de gradiente de concentração em placa. Utilizou-se meio YMA com gradiente de concentrações de antibióticos variando de 0 a 500 mg L⁻¹. A avaliação foi feita após quatro dias de incubação a 28°C. Atribuíram-se notas de 0 a 3, caso o crescimento bacteriano ocorresse,

respectivamente, em faixas de concentrações de antibióticos de 0 a 125; 126 a 250; 251 a 375 ou 376 a 500 mg L⁻¹.

Determinaram-se, por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida (Laemmli, 1970), os perfis de proteínas solúveis totais dos três isolados nativos e de duas estirpes de crescimento lento provenientes da Embrapa Agrobiologia (Seropédica, RJ), sendo uma recomendada para guandu e outra para caupi. As amostras de proteínas para aplicação ao gel de poliacrilamida foram preparadas de acordo com protocolo proposto por R.S. Araújo (Hungria et al., 1994). A quantidade de proteína (Bradford, 1976) adicionada em cada poço foi ajustada para 10 a 20 µg.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre os isolados avaliados, R1, R8 e R11 promoveram os maiores incrementos da MSPA e da AF, com destaque para o primeiro. Estes isolados, juntamente com o R5, resultaram em maiores valores de N_{ac} (Quadro 2), superando o tratamento com a maior dose de N mineral (150 mg L⁻¹). Considerando o reduzido valor do N_{ac} de plantas não inoculadas e livres de N mineral (4 mg planta⁻¹ de N), admitiu-se que praticamente todo o N na MSPA foi resultante da FBN. Quanto à MSN por planta, estes quatro isolados foram superiores a todos os outros, observando-se, assim, a mesma tendência ocorrida para o N_{ac}. Diferenças na eficiência de estirpes de rizóbios em promover estes benefícios às plantas são freqüentemente encontradas na literatura (Santillana et al., 1998; Carvalho & Stamford, 1999).

As três culturas isoladas de nódulos de feijão-de-porco apresentaram nodulação e eficiência simbiótica inexpressivas para o guandu, não se diferenciando do tratamento não inoculado e não adubado com N mineral. Segundo este resultado, pode ocorrer, entre alguns rizóbios tropicais, determinado grau de especificidade com os hospedeiros quanto à nodulação e eficiência de promover o crescimento das plantas. Thies et al. (1991) observaram que rizóbios isolados de caupi apresentaram capacidade diferenciada de nodular siratro, amendoim e feijão-lima.

Correlações altamente significativas foram observadas entre a massa de nódulos e as variáveis MSPA, AF e N_{ac} (Figura 1).

A extração de seiva xilemática para quantificação de N-ureído e N-total, visando estimar a eficiência da FBN, foi possível em apenas 24% das plantas amostradas. Esta dificuldade de extração da seiva é relatada como sendo uma das principais desvantagens deste método (Peoples et al., 1989). Correlações significativas foram encontradas entre

Quadro 2. Área foliar (AF), matéria seca da parte aérea (MSPA), matéria seca dos nódulos (MSN) e N total acumulado (N_{ac}) na parte aérea de plantas de guandu (*Cajanus cajan*), submetidas a tratamentos com doses crescentes de N mineral ou inoculadas com dezesseis isolados de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros

Tratamento	AF	MSPA	MSN	N_{ac}
	cm ² planta ⁻¹	g planta ⁻¹	— mg planta ⁻¹ —	
0 N	50 g*	0,27 g	0 d	4 d
50 N	266 efg	1,63 efg	0 d	31 d
100 N	537 cde	3,74 cde	0 d	65 c
150 N	539 cd	4,11 cd	0 d	74 c
R1	1.035 a	7,08 a	497 a	186 a
R2	191 fg	1,06 fg	101 cd	26 d
R3	393 defg	2,30 defg	254 bc	63 c
R4	19 g	0,14 g	5 d	3 d
R5	810 bc	5,23 bc	449 a	151 b
R6	312 def	1,80 def	153 bc	68 c
R7	417 def	2,49 def	210 bc	67 c
R8	875 ab	6,04 ab	436 a	155 ab
R9	223 efg	1,31 efg	66 cd	54 cd
R10	567 def	3,08 def	284 b	87 c
R11	980 a	6,99 a	433 a	191 a
R12	35 g	0,22 g	4 d	3 d
R13	26 g	0,17 g	10 d	4 d
R14	25 g	0,23 g	0 d	3 d
R15	72 g	0,37 g	39 d	9 d
R16	97 g	0,58 g	39 d	19 d

Médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5%.

a relação N-ureído/N-total na seiva e as variáveis MSN e N_{ac} (Figura 2). De acordo com Neves et al. (1985) e Hungria & Neves (1986), as associações entre rizóbios eficientes e cultivares de soja ou feijão com alto potencial de FBN resultaram no transporte de uma concentração maior do N-total sob a forma de N-ureído na seiva xilemática destas plantas.

Dentre os isolados de rizóbios selecionados quanto à FBN em vasos de Leonard, os três escolhidos para a caracterização foram R1, R5 e R11, visto que ocorreram dificuldades técnicas durante a tentativa de caracterização do isolado R8.

Os tempos de geração dos isolados R1, R5 e R11 foram de 1,59; 1,20 e 1,25 h, respectivamente, estando estes valores bem abaixo daqueles de 2,5 a 4,0 h, normalmente citados para bactérias do gênero *Rhizobium* (Giller & Wilson, 1991).

Após sete dias de incubação, as colônias de R1 e R5 apresentaram grande quantidade de um muco de consistência aquosa, com características semelhantes ao muco do tipo I, descrito por Martins et al. (1997) e Xavier et al. (1998), ao passo que colônias de R11 apresentaram muco menos abundante e de consistência semelhante à do muco do tipo II.

Os isolados R1 e R5 apresentaram resistência elevada ao ácido nalidixico, ao cloranfenicol e à ampicilina e, ainda, resistência moderada à kanamicina (Quadro 3). O isolado R11, no entanto,

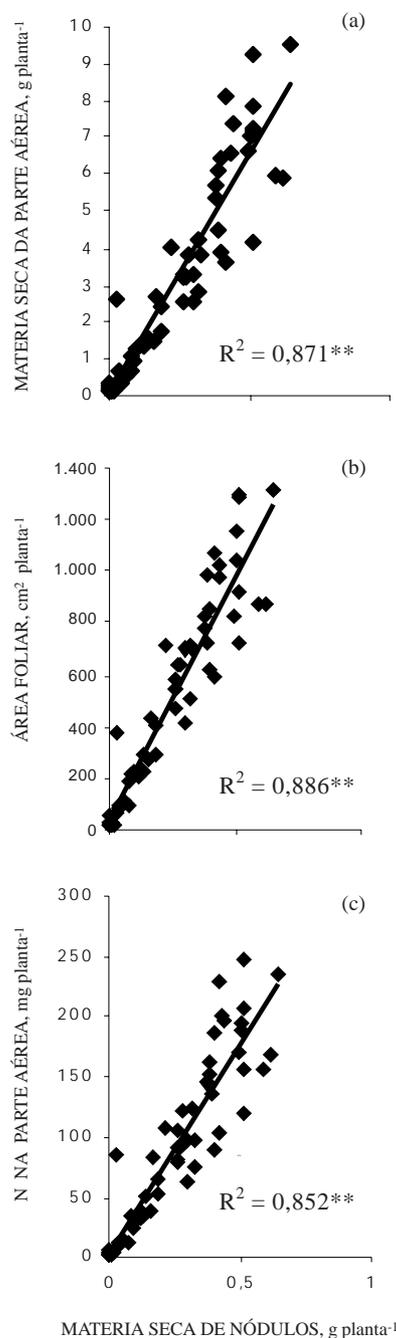


Figura 1. Correlações entre a matéria seca de nódulos por planta e as variáveis matéria seca de parte aérea (a), área foliar (b) e N acumulado na parte aérea (c) de plantas de guandu, submetidas à inoculação com diferentes rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros. Os dados dos tratamentos sem inoculação não foram considerados.

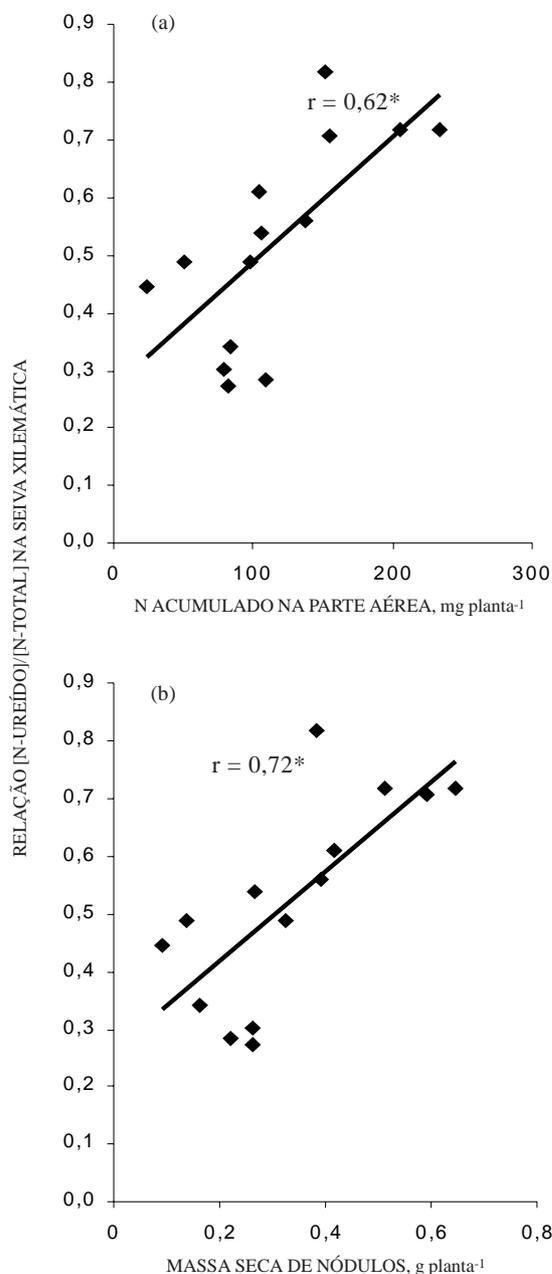


Figura 2. Correlação entre os valores de [N-ureído]/[N-total] na seiva xilemática de guandu e as variáveis N total acumulado na parte aérea (a) e matéria seca de nódulos por planta (b).

caracterizou-se por sua alta suscetibilidade a todos os antibióticos, com exceção ao ácido nalidíxico. Observou-se, assim, relação direta entre resistência a antibióticos e produção de muco, como relatado por Sinclair & Eaglesham (1984).

Xavier et al. (1998) observaram que estirpes de rizóbios com resistência a antibióticos têm sido mais freqüentemente isoladas em solo com Al, o que pode indicar a existência de uma relação entre estas duas características em rizóbios. Esta tendência também foi encontrada neste trabalho, cujos dados indicam que R1 e R5, isolados com maior resistência a antibióticos, também foram os mais tolerantes ao Al. Tais isolados apresentaram crescimento em meio com concentrações de até 20 mg L⁻¹ de Al, o mesmo não acontecendo para R11, cujo crescimento foi observado apenas até 10 mg L⁻¹ de Al.

De acordo com alguns autores, a alta produção de muco por estirpes de rizóbio estaria ainda associada à capacidade destas bactérias em tolerar altas temperaturas (Osa-Afiana & Alexander, 1982; Hollingsworth et al., 1985). Esses resultados são corroborados pelos dados obtidos neste estudo, que indicam maior tolerância dos isolados R1 e R5 à elevação da temperatura de incubação, comparativamente ao R11. As colônias dos isolados R1 e R5, incubados a 32°C, apresentaram cerca de 75% do diâmetro das colônias crescidas a 28°C, temperatura considerada ótima para o crescimento de rizóbios. A 42°C, o diâmetro das colônias desses isolados foi reduzido para apenas 12% do observado a 28°C. A temperatura de incubação de 32°C foi suficiente para inibir por completo o crescimento do isolado R11.

Quanto à alteração no pH do meio de cultura que continha manitol, os três isolados promoveram a acidificação do meio YMA. Tal acidificação foi observada aos dois dias de incubação, para R1 e R5, e aos quatro dias, para R11.

As características de rápido crescimento, a acidificação do meio de cultura com manitol e a grande produção de muco foram observadas em 13 das 16 estirpes avaliadas (resultados não mostrados), o que pode indicar que este seja um padrão freqüente de rizóbios nativos dos solos de tabuleiros costeiros capazes de nodular o guandu, o feijão-de-porco e o caupi.

Quadro 3. Resistência intrínseca a antibióticos de três isolados de rizóbios nativos dos tabuleiros costeiros, determinada pelo método do gradiente em placa, com concentrações variando de 0 a 500 mg L⁻¹

Isolado	Ac. nalidíxico	Estreptomicina	Kanamicina	Cloranfenicol	Tetraciclina	Ampicilina
R1	3	0	1	3	0	3
R5	3	0	1	3	0	3
R11	2	0	0	0	0	0

0: resistente de 0 a 125 mg L⁻¹; 1: resistente de 126 a 250 mg L⁻¹; 2: resistente de 251 a 375 mg L⁻¹; 3: resistente de 376 a 500 mg L⁻¹.

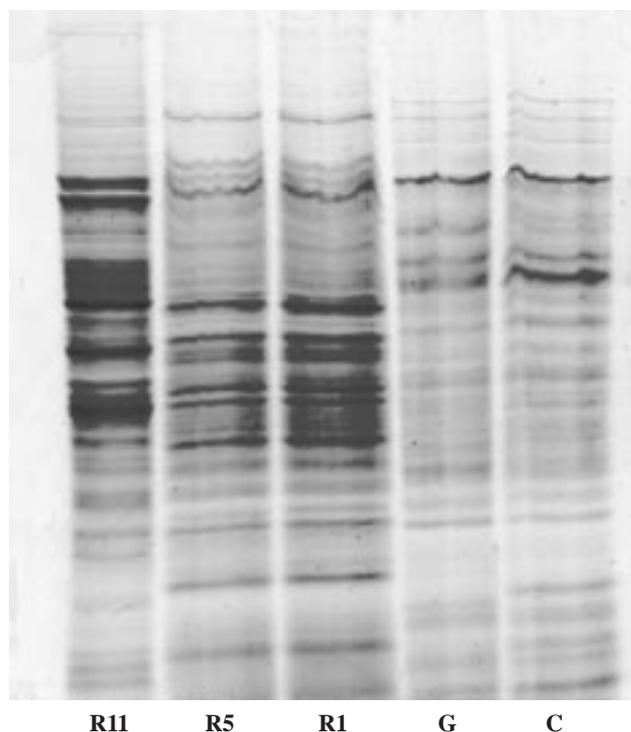


Figura 3. Perfil eletroforético de proteínas totais solúveis dos isolados de rizóbios R1, R5 e R11 e de estirpes de crescimento lento, recomendadas para guandu (G) e caupi (C), provenientes da Embrapa Agrobiologia.

A semelhança entre R1 e R5 e as diferenças entre estes e R11 também foram comprovadas pela avaliação do perfil eletroforético de proteínas totais dessas bactérias (Figura 3).

CONCLUSÃO

Dois isolados de rizóbios nativos de tabuleiros costeiros obtidos neste estudo (R1 e R5) revelaram grande potencial de utilização como inoculante de guandu, por apresentarem alta capacidade de fixação biológica do N e características que favorecem a sobrevivência no solo.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Banco do Brasil, pelo financiamento deste trabalho; ao Assistente de Pesquisa Jadson Alves do Nascimento e aos estagiários Carlos Aurélio Alves Oliveira e Hosanaide Batista dos Santos, pelo apoio dado na realização dos experimentos.

LITERATURA CITADA

- BARRETO, A.C. & FERNANDES, M.F. Recomendação de leguminosas para adubação verde em solos dos tabuleiros costeiros. Aracaju, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1998. 5p. (EMBRAPA - CPATC. Comunicado Técnico, 28)
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254, 1976.
- BROCKWELL, J. Can inoculant strains ever compete successfully with established soil populations? In: GIBSON, A.H. & NEWTON, W.E., eds. *Current perspectives in nitrogen*. Amsterdam, North Holland/Elsevier, 1981. p.277-315.
- CARVALHO, F.G. & STAMFORD, N.P. Fixação do N₂ em leucena (*Leucaena leucocephala*) em solo da região semi-árida brasileira submetido à salinização. *R. Bras. Ci. Solo*, 23:237-243, 1999.
- GILLER, K.E. & WILSON, K.J. *Nitrogen fixation in tropical cropping systems*. Wallingford, C.A.B. International, 1991. 313p.
- HOLLINGSWORTH, R.; SMITH, E. & AHMAD, M.H. Chemical composition of extracellular polysaccharides of cowpea rhizobia. *Arch. Microbiol.*, 142:18-20, 1985.
- HUNGRIA, M. Metabolismo do carbono e do nitrogênio nos nódulos. In: HUNGRIA, M. & ARAÚJO, R., eds. *Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola*. Brasília, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1994. p.249-279.
- HUNGRIA, M.; VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R.; PERES, J.R.R. & MENDES, I. C. Identificação de parâmetros relacionados com a eficiência e capacidade competitiva do rizóbio. In: HUNGRIA, M. & ARAÚJO, R., eds. *Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola*. Brasília, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1994. p.285-325.
- HUNGRIA, M. & NEVES, M.C.P. Ontogenia da fixação biológica do nitrogênio em *Phaseolus vulgaris*. *Pesq. Agropec. Bras.*, 21:715-730, 1986.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685, 1970.
- MARTINS, L.M.V.; XAVIER, G.R.; NEVES, M.C.P. & RUMJANEK, N.G. Características relativas ao crescimento em meio de cultura e a morfologia de colônias de "rizóbio". Seropédica, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1997. 14p. (Embrapa-CNPAB. Comunicado Técnico, 19)
- NEVES, M.C.P.; DIDONET, A.D.; DUQUE, F.F. & DÖBEREINER, J. *Rhizobium* strain effects on nitrogen transport and distribution in soybeans. *J. Exp. Bot.*, 36:1179-1192, 1985.
- OLIVEIRA, L.A. & GRAHAM, P.H. Evaluation of strain competitiveness in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* using a nod+ fix- natural mutant. *Arch. Microbiol.*, 54:305-310, 1990.
- OSA-AFIANA, L.O. & ALEXANDER, M. Clays and the survival of *Rhizobium* during desiccation. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 46:285-288, 1982.

- PEOPLES, M.B.; HEBB, D.M.; GIBSON, A.H. & HERRIDGE, D.F. Development of the xylem ureide assay for measurement of nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.). *J. Exp. Bot.*, 40:535-542, 1989.
- SANTILLANA, N.; FREIRE, J.R.J.; SÁ, E.L.S. & SATO, M. Avaliação de estirpes de rizóbios para a produção de inoculantes para trevo vermelho. *R. Bras. Ci. Solo*, 22:231-237, 1998.
- SINCLAIR, M.J. & EAGLESHAM, A.R.J. Intrinsic antibiotic resistance in relation to colony morphology in three populations of west African cowpea rhizobia. *Soil Biol. Biochem.*, 16:247-251, 1984.
- THIES, J.E.; BOHLOOL, B.B. & SINGLETON, P.W. Subgroups of the cowpea miscellany: symbiotic specificity within *Bradyrhizobium* spp. for *Vigna unguiculata*, *Phaseolus lunatus*, *Arachis hipogaea* and *Macroptilium atropurpureum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57:1540-1545, 1991.
- VINCENT, J.M. Manual for the practical study of root nodule bacteria. Oxford, Blackwell, 1970. 164p.
- VOGELS, G.D. & van der DRIFT, C. Differential analysis of glyoxilate derivatives. *Anal. Biochem.*, 33:143-157, 1970.
- WEAVER, R.W. & FREDERICK, L.R. Rhizobium In: PAGE, A.L.; MILLER, R.H. & KEENEY, D.R. Methods of soil analysis - Part 2 - Chemical and microbiological properties. 2 ed. Madison, American Society of Agronomy, 1982. p.1043-1070.
- WOLFF, A.B.; STREIT, W.; KIPE-NOLT, J.A.; VARGAS, H. & WERNER, D. Competitiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* strains in relation to environmental stress and plant defense mechanisms. *Biol. Fertil. Soils*, 12:170-176, 1991.
- XAVIER, G.R.; MARTINS, L.M.V.; NEVES, M.C.P. & RUMJANEK, N.G. Edaphic factors as determinants for the distribution of intrinsic antibiotic resistance in a cowpea rhizobia population. *Biol. Fertil. Soils*, 27:386-392, 1998.

