

Respuesta a la inoculación de *Bradyrhizobium* sp. en caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp.) utilizando diferentes sustratos de cultivos alternativos

M.V.B. Figueiredo ^{1*}, H.A. Burity ², A.C.E.S. Mergulhão ², W.M. Araújo ²,
C.R. Salinas ², J.A.G. Silveira ³

¹ EPEAL/IPA - Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado de Alagoas.
Caixa Postal 699, CEP 57025-000 Maceió, AL, Brasil

² IPA - Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária.
Caixa Postal 1022, CEP 50761-000 Recife, PE, Brasil

³ UFC - Universidade Federal do Ceará Caixa Postal 6020, CEP 60451-970 Fortaleza, CE, Brasil
E-mail: mbarreto@elogica.com.br

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar la eficiencia de la inoculación con una cepa de *Bradyrhizobium* en el cultivo del caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp.) respecto a los sustratos, a los medios de inoculación y esterilización del suelo, así como verificar los efectos de suplementación de la turba con sustratos de cultivo disponibles en la región, se llevaron a cabo dos experimentos en invernadero utilizando diferentes sustratos alternativos: turba, compost urbano, diatomita, vermiculita y vinaza seca. Los materiales biológicos fueron el cultivar IPA-205 de caupí y la cepa BR-2001 de *Bradyrhizobium* sp. La preparación de los inoculantes fue 10^9 células viables g^{-1} ; $m^{-0,1}$ MPA. El cultivo del caupí se hizo en suelo Podzólico rojo amarillo. Los resultados muestran que el método de inoculación del suelo fue significativamente superior al método de inoculación de la semilla, sugiriendo que es posible mejorar el desempeño de los inoculantes con el estudio de los métodos de inoculación. La esterilización del suelo también afectó al comportamiento de la nodulación y a la productividad de las plantas. En el estudio de los sustratos, la diatomita produjo una mayor productividad en las plantas de caupí. La suplementación de los sustratos de cultivo con turba al 20 % proporcionó una mejor eficiencia simbiótica.

Palabras clave: vehiculante, *Vigna unguiculata*, turba, esterilización

* Autor para correspondencia

Recibido: 28-9-00

Aceptado para su publicación: 21-9-01

INTRODUCCIÓN

La turba es el sustrato más usado en la producción de inóculos comerciales. No se encuentra con facilidad en muchos países, y en ocasiones no tiene las características de un buen vehículo; o sea, alta retención de humedad, facilidad de procesamiento, ausencia de toxicidad para las bacterias, facilidad de esterilización, grandes cantidades disponibles, bajo costo y buena adhesión en las semillas (Burton, 1981; Figueiredo *et al.*, 1995; Balatti, 1992; Balatti y Freire, 1996). Además, se detectan diferencias físicas, químicas y biológicas en las turbas, dependiendo del material de origen, en respuesta a los métodos de esterilización utilizados. Por estas limitaciones están siendo investigados otros sustratos alternativos y sus combinaciones (Date, 1991 y 1996; Figueiredo *et al.*, 1995; Lopes *et al.*, 1996; Denardin *et al.*, 1999).

Los aditivos en los sustratos de cultivo más utilizados en el mundo, además de la turba, son vermiculita, agua, aceite, suelo mineral, gránulos con arcilla de sulfato de calcio, polisacáridos y perlita porosa. Existen además co-polímeros que aumentan la absorción del inoculante y otros aditivos, como los inhibidores de la síntesis de etileno y sustancias que incrementan la nodulación (Paau, 1991). También han sido descritas moléculas que aumentan la aptitud fisiológica de las cepas, incluyendo inductores de los genes de nodulación (Paau, 1991; Hungria y Stacey, 1997). Sin embargo, no ha habido mucho progreso con respecto a los sustratos de cultivo para inoculación (Vargas y Hungria, 1997). En este contexto, la eficiencia de la inoculación con una cepa de *Bradyrhizobium* competitiva y eficaz dependerá del sustrato utilizado. Fracasos en las inoculaciones, entre otras causas, pueden ser producidos por el inadecuado número de células viables (NCV) adicionadas y/o bajo número de bacterias supervivientes al período entre la inoculación y el inicio de la nodulación (Mirza *et al.*, 1990; Figueiredo *et al.*, 1999; Diouf *et al.*, 2000; Abaidoo *et al.*, 2000). De esta manera, son ideales aquellos sustratos que contengan un elevado NCV y puedan conferir una protección contra las adversidades en el campo.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficiencia de la inoculación con *Bradyrhizobium* en el cultivo del caupí (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) en relación con el sustrato, el método de inoculación y esterilización del suelo, así como también evaluar los efectos de la suplementación de la turba en sustratos de cultivo disponibles en la región.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para evaluar los efectos de sustratos alternativos en la eficiencia del *Bradyrhizobium*, se realizaron dos experimentos en invernadero. En el primer experimento se empleó un diseño experimental aleatorizado con combinación factorial $5 \times 2 \times 3$ con cuatro repeticiones. La varianza de los datos fue analizada y las medias comparadas por la prueba de Tukey ($P < 0,05$). Se utilizó la cepa BR-2001 (CNPAB, Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia, Río de Janeiro (RJ), y la variedad IPA-205 de caupí (*Vigna unguiculata*). Las semillas del caupí esterilizadas (Vincent, 1970) fueron impregnadas con solución azucarada (10 % p/v), secadas al aire e inoculadas. Fueron seleccionadas en el ensayo dos plantas por maceta. El origen de los sustratos utilizados fue: turba (CNPAB, RJ), diatomita [Carro Quebrado, Río Grande do Norte (RN)], vermiculita [Eucatex S/A, São Pau-

lo (SP)], vinaza seca [Fábrica de azúcar Estreliana, Ribeirão, Pernambuco (PE)] y compost urbano [fábrica de azúcar de tratamiento basura de la ciudad de Recife, (PE)]. Después de secar los sustratos y pasarlos por cedazo de 200 mesh (0,074mm) se procedió a los análisis físicos y químicos. El pH de los distintos sustratos fue corregido (pH 7,0) a través de la adición de calcio (para sustrato ácido) y ácido cítrico (para sustrato alcalino). La esterilización de los sustratos fue efectuada en autoclave. El cultivo del caupí se realizó en un suelo Podzólico rojo amarillo (3 kg suelo.maceta⁻¹, pH 6,5), y en la esterilización del suelo se emplearon dos tipos de agentes: el bromuro de metilo (fumigación con 10 ml del producto/100 kg del suelo) y calor húmedo bajo presión (autoclave 101 kPa, 1 hora.día⁻¹ durante tres días consecutivos). El testigo fue suelo sin esterilización. Los inoculantes formulados (10⁹ cfu g⁻¹) presentaron niveles de humedad equivalentes a $\theta_m - 0,1$ MPa. Se utilizaron dos métodos de inoculación: en la semilla y en el suelo (por suspensión líquida del vehiculante en la profundidad de 2,5 cm por debajo de la semilla).

El segundo experimento se efectuó según un esquema factorial en bloques al azar, con cuatro repeticiones. Los factores fueron sustratos alternativos (los mismos utilizados en el experimento anterior) y nivel de suplementación con turba (20, 40 y 60 % v/v). Los materiales biológicos utilizados fueran los mismos del primer experimento y el suelo utilizado fue Podzólico rojo amarillo (3 kg suelo.maceta⁻¹, pH 6.5). El riego se suplementó con una solución de Hoagland y Arnon (1950), 2 ml.kg⁻¹ aplicada semanalmente. Durante el experimento la humedad fue mantenida al 80 % de capacidad de campo.

Se efectuó la cosecha a los 45 días después de la inoculación en ambos experimentos y fueron realizadas las siguientes determinaciones: actividad nitrogenasa (N₂ase), materia seca de la parte aérea (MSPA), materia seca de la raíz (MSR), nódulos (MSnod), nitrógeno acumulado en la parte aérea (Cn), y número (N.º nod) y tamaño (Tnod) de nódulos. Los datos fueron analizados mediante el análisis de la varianza, y las medias fueron comparadas por la prueba de Tukey (P < 0,05).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La inoculación con la cepa BR-2001 en turba suplementada tuvo efecto sobre el n.º de nódulos dependiendo del sustrato utilizado. La suplementación con compost urbano (76,7 nódulos por planta) y vinaza seca (70,6 nódulos por planta) no difirieron en el número de nódulos. Éstos fueron significativamente superiores a los tratamientos con diatomita (58,8 nódulos por planta) y con vermiculita (58,4 nódulos por planta). Se detectaron respuestas para las variables MSPA, MSR, MSnod y Cn, dependiendo del tipo y nivel de suplementación (Tabla 1). En cuanto a la MSPA y el Cn, los mejores resultados se consiguieron con la suplementación con diatomita en la mayoría de los casos.

Para la MSR, el compost urbano, la vermiculita y la vinaza seca provocaron disminuciones significativas con un 60 % de suplementación. En cambio, la diatomita al 60 % mantuvo una producción de MSR significativamente más alta. En la MSNod se observó un comportamiento diferenciado en relación al sustrato utilizado.

En las suplementaciones de diatomita y vinaza seca al 60 % mostraron también disminución de MSnod. La vermiculita, al contrario, provocó aumento de MSnod conforme se incrementaba la suplementación.

Tabla 1

Producción de materia seca de la parte aérea, raíz, nódulos y contenido de nitrógeno en caupí (*Vigna unguiculata* L. Walp.) inoculado con *Bradyrhizobium*. Efecto de la suplementación de la turba con diferentes sustratos (segundo ensayo)

Tratamiento	Materia seca			Contenido de nitrógeno (Cn)
	Parte aérea	Raíz	Nódulos	
Sustrato-Suplemento	-g maceta ⁻¹ -		-mg maceta ⁻¹ -	
	20% Turba			
Compost urbano	4,02bcde	1,60abc	80,87cde	97,71bc
Diatomita	4,25a	1,68abc	90,16ab	109,04a
Vermiculita	4,10abcd	1,66abc	79,54de	101,60b
Vinaza seca	4,17ab	1,72ab	87,63abcd	94,04c
	40% Turba			
Compost urbano	3,95defg	1,56bc	95,06a	86,30d
Diatomita	4,12abc	1,53cd	87,39abcd	97,94bc
Vermiculita	3,99cdef	1,71ab	92,80ab	96,25bc
Vinaza seca	4,01bcdef	1,74a	88,36abcd	77,04e
	60% Turba			
Compost urbano	3,82gh	1,26e	84,81bcde	74,94e
Diatomita	3,94efg	1,64abc	80,44cde	85,28d
Vermiculita	3,68h	1,29e	89,12abc	74,94e
Vinaza seca	3,85fg	1,38de	77,25e	71,32e
DMS_{0,05}	0,16	0,17	8,89	5,95

En la columna, las medias seguidas de la misma letra no difieren estadísticamente entre sí por el test de Tukey ($P < 0,05$), media de cuatro repeticiones. DMS: diferencia mínima significativa.

Los resultados muestran que los inoculantes con mayor eficiencia nodular no siempre tuvieron un efecto en Nac y MSPA (Tabla 1). Posiblemente, el compost urbano y la vinaza seca no dieron protección suficiente para la cepa BR-2001, favoreciendo la nodulación por rizobios autóctonos con poca actividad fijadora de N₂. El mayor énfasis en recientes investigaciones de fijación del N₂ con *Bradyrhizobium japonicum* se han centrado en el desarrollo de técnicas de ingeniería genética para modificaciones de rizobios con el propósito de aumentar la capacidad de fijación de N₂. Sin embargo, la incapacidad para introducir una cepa seleccionada o modificada en suelo donde existen poblaciones nativas se atribuye a un problema de competencia (Balatti y Freire, 1996; Date, 1996). La población nativa de los suelos, generalmente en número elevado y caracterizada por la ineficiencia en fijación de N₂ y alta capacidad competitiva, es también un factor limitante de la nodulación con estirpes más eficientes. Sin embargo, diversos experimentos han mostrado respuestas positivas a la inoculación, representando un estímulo a la práctica de la inoculación y a la continuidad de los estudios de la selección de bacterias y plantas con más capacidad de respuesta a la Fijación Biológica de Nitrógeno (Hungria y Stacey, 1997; Hungria *et al.*, 1999).

En trabajos realizados por Figueiredo *et al.* (1991), el compost urbano y la vinaza seca disminuyeron la eficiencia de fijación de N₂ de la cepa SEMIA-6053 en plantas de *Clitoria ternatea* L., cultivadas en arena-lavada-esterilizada. Esto puede apoyar una hipótesis adicional de que sustancias inhibitoras de la fijación simbiótica de N₂ son parte de estos sustratos. De las combinaciones examinadas, aquellas con 20 y 40 % de diatomita y de vermiculita proporcionaron una mejor eficiencia en la cepa BR-2001.

Los resultados mostraron que el método de inoculación en el suelo fue significativamente superior a la inoculación realizada en la semilla para n.º nod y MSnod. Esto sugiere la posibilidad de mejorar la eficacia de los inoculantes con estudios del modo de aplicación. Trabajos desarrollados por Scudder (1974) corroboraron los resultados encontrados en este experimento, donde el inoculante disminuye su riqueza en células viables durante las etapas que preceden a la inoculación, así como las posteriores a la inoculación y siembra de la leguminosa hospedadora en el suelo. Al compararla con los diferentes métodos de inoculación y formulaciones, este autor obtuvo resultados insatisfactorios cuando el inoculante era mezclado directamente con la semilla, tanto en el sistema tradicional como en la mezcla inoculante con las semillas en el sembrado. La nodulación y el rendimiento en granos fueron significativamente superiores cuando el inoculante fue aplicado directamente al suelo. Trabajos desarrollados por Labandera *et al.* (1986) y Elegba y Rennie (1995) relatan que la supervivencia de los rizobios sobre la semilla es menor que en los inoculantes.

Tabla 2

Efecto del método de inoculación de *Bradyrhizobium* sobre el número y contenido de materia seca de nódulos en planta de caupí (primer ensayo)

Tratamiento	Nódulos	
	Número *	Materia seca
	Nod. maceta ⁻¹	mg. maceta ⁻¹
Inoculación en la semilla	47,98b	77,72b
Inoculación en el suelo	58,67a	93,24a
CV%	8,83	32,41

* Valores transformados en $(x)^{1/2}$ para análisis de varianza.

En la columna, las medias seguidas de la misma letra no difieren estadísticamente entre sí por el test de Tukey (P<0,05), media de cuatro repeticiones. CV: coeficiente de variación.

Respecto al estudio sobre tratamientos del suelo, se observó que la esterilización del suelo con bromuro de metilo afectó al desempeño de la nodulación donde se han desarrollado plantas con MSnod y Tnod significativamente menores en relación con aquellas cultivadas en un suelo autoclavado. Sin embargo, las ventajas y desventajas de los diversos vehículos transportadores han sido revisadas por diferentes investigadores e indican que el tipo de esterilización y de vehículo, tales como cepa y número de rizobios viables, pueden explicar la amplia variabilidad en la eficiencia de los inoculantes (Hungria *et al.*,

Tabla 3
Efecto de la esterilización del suelo sobre el contenido de materia seca y tamaño medio de los nódulos en plantas de caupí (primer ensayo)

Tratamiento	Nódulos	
	Materia seca	Tamaño medio
	mg. maceta ⁻¹	mg. nod ⁻¹
Suelo-Autoclavado	52,54b	1,101b
Suelo-Bromuro de metilo	24,10c	0,698c
Suelo-Testigo	179,80a	2,431a
CV%	32,31	36,71

En la columna, las medias seguidas de la misma letra no difieren estadísticamente entre sí por el test de Tukey ($P < 0,05$), media de cuatro repeticiones. CV: coeficiente de variación.

Tabla 4
Efecto de la interacción esterilización del suelo x sustrato en la materia seca, contenido de nitrógeno en la parte aérea, número de nódulos y actividad de la nitrogenasa en plantas de caupí (primer ensayo)

Tratamiento	Parte aérea		Número de nódulos * (nód. maceta ⁻¹)	Actividad nitrogenasa ($\mu\text{mol C}_2\text{C}_4$ $\text{h}^{-1}\text{maceta}^{-1}$)
	Materia seca (g.maceta ⁻¹)	Cn (g.maceta ⁻¹)		
Suelo-Autoclavado				
Compost urbano	2,91ab	75,27ab	42,61a	41,73bc
Diatomita	3,24a	84,99a	46,72a	55,59a
Turba	3,16a	83,48a	46,54a	44,55b
Vermiculita	2,98ab	80,31a	52,04a	38,71bc
Vinaza seca	2,60b	68,55b	47,20a	37,22c
Suelo-Bromuro de metilo				
Compost urbano	1,50ab	46,75bc	29,44bc	42,09b
Diatomita	1,89a	56,76a	37,12ab	49,79a
Turba	1,86a	57,52a	48,09a	44,54ab
Vermiculita	1,58ab	48,84ab	38,05ab	39,47b
Vinaza seca	1,22b	37,76c	25,10c	41,60b
Suelo-Testigo				
Compost urbano	2,32b	75,43b	69,95b	61,05a
Diatomita	2,97a	94,22a	81,05ab	64,59a
Turba	2,70ab	84,55ab	77,96ab	63,69a
Vermiculita	2,80a	91,56a	83,91a	65,72a
Vinaza seca	2,90a	93,64a	70,48ab	63,78a
CV%	10,64	8,41	8,83	18,84

* Valores transformados en $(x)^{1/2}$ para el análisis de varianza.

En la columna, las medias seguidas de la misma letra no difieren estadísticamente entre sí por el test de Tukey ($P < 0,05$), media de cuatro repeticiones. CV: coeficiente de variación. Cn: contenido en nitrógeno.

1999). En el estudio del sustrato en relación con la esterilización del suelo, la turba y la diatomita no difirieron en contenido de materia seca. En la actividad de la nitrogenasa, la diatomita fue superior a los demás sustratos, revelándose con un gran potencial en la utilización de inoculantes para leguminosas.

CONCLUSIONES

La suplementación de los sustratos de cultivo con una concentración del 20 % de turba proporcionaron la mejor eficiencia simbiótica con la estirpe de *Bradyrhizobium* BR-2001.

El inoculante formulado con el sustrato diatomita proporcionó la mayor productividad en las plantas de caupí.

La esterilización con bromuro de metilo causó inhibición en la nodulación y productividad del caupí.

La inoculación del suelo proporcionó la mejor nodulación y productividad, pudiendo mejorarse la eficacia de los inoculantes con el modo de aplicación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil) y FACEPE (Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, Brasil) por la financiación de los proyectos dentro de los que se realizó este trabajo.

SUMMARY

Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) response to *Bradyrhizobium* sp. inoculation on different substrates

We have evaluated the efficiency of cowpea inoculation with *Bradyrhizobium* in relation to the type of substrate, way of inoculation, and soil sterilisation, in two greenhouse experiments with different substrates (peat, urban waste compost, diatomite, vermiculite, and dry vinasse). The effect of peat supplementation with available carriers in the region was also evaluated. The biological materials used were the cultivar IPA-205 of cowpea and strain BR-2001 of *Bradyrhizobium*. The inoculant was prepared at a concentration of 10^9 cfu g⁻¹; m⁻¹ -0.1 MPa and cowpea seeds were sown in soil Red Yellow Podzolio. The results showed that soil inoculation was significantly better than seed inoculation, suggesting the possibility of improving the inoculant performance by selecting the application method. Soil sterilization also affected plants nodulation and productivity. Among the different substrates assayed, diatomite increased the cowpea plants productivity. Finally, supplementing the carriers with 20 % peat improved their symbiotic efficiency.

Key words: inoculant carrier, *Vigna unguiculata*, peat, sterilisation

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAIDOO R., KEYSER H., SINGLETON P., BORTHAKUR D., 2000. *Bradyrhizobium* spp.(TGx) isolates nodulating the new soybean cultivares in Africa are diverse and distinct from *Bradyrhizobium* that nodulate North American soybeans. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 225-234.
- BALATTI A., 1985. Inoculants production. En: Freire, J. R. J. & Falcão, C. P. de B. Workshop on *Rhizobium/legume* Inoculantes, Porto Alegre, R. G. do Sul. UNEP/UNESCO/FAO/MIRCEN. p. 157-184.
- BALATTI A., 1992. Producción de inoculantes para leguminosas- Tecnología de las fermentaciones aplicada a los generos *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*. Sta Rosa, Argentina, Noviembre. p. 152.
- BALATTI A., FREIRE J., 1996. Legume Inoculants. Selection and Characterization of strains. Production, use and Management p.148.
- BREMNER J., 1965. Total nitrogen. En Black, C. A. ed. Methods of soil analysis chemical and microbiological properties. Soc. Am. Agron. (Part 2). p. 1149-1178.
- BURTON J., 1981. *Rhizobium* inoculant for developing countries. *Tropical Agriculture* 58, 291-303
- DATE R., 1996. Selection of strains for inoculant production. En Balatti A. P. & Freire J.R. J. Legume Inoculants. Selection and Characterization of strains. Production, use and Management, p. 1-10.
- DATE R., HURSE L., 1991. Intrinsic antibiotic resistance and serological characterization of populations of indigenous *Bradyrhizobium* isolated from nodules of *Desmodium intortum* and *Macropitilium atropurpureum* in three soil of S.E. Queensland. *Soil Biol. Biochem.* 23, 551-561.
- DENARDIN N., NITSCHKE M., FREIRE J., 1999. Sobrevivência de estirpes de *Bradyrhizobium* em inoculantes formulados à base de goma xantana. XX Congresso Brasileiro de Microbiologia, Salvador, out., p. 293.
- DIOUF A., LAJUDIE P., NEYRA M., KERSTERS K., GILLOS M., MARTÍNEZ-ROMERO E., GUEYE M., 2000. Polyphasic characterization of rhizobia that nodulate *Phaseolus vulgaris* in West Africa (Senegal and Gambia). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 159-170.
- ELEGBA M., RENNIE R., 1995. Legume inoculation. *Can. Soil Sci.* 64, 631-636.
- FIGUEIREDO M., BALATTI A., DE FRANÇA F., BURITY H., 1995. Sobrevivência do *Bradyrhizobium* sp. quando submetido a diferentes temperaturas de Crescimento. *Pesq. Agropec. Bras.* 30, 1233-1238.
- FIGUEIREDO M., STAMFORD N., BURITY H., VIDOR C., 1991. Sobrevivência do *Bradyrhizobium* em substratos alternativos esterilizados. *Pes. Agropec. Bras.* 26, 1404-1414.
- FIGUEIREDO M., STAMFORD N., VILAR J., BURITY H., 1995. Effectiveness of *Bradyrhizobium* sp. inoculants on different substrates. *Revista de Microbiologia* 26, 160-164.
- FIGUEIREDO M., VILAR J., BURITY H., DE FRANÇA F., 1999. Alleviation of water stress effects in cowpea by *Bradyrhizobium* spp. inoculation. *Plant and soil* 207, 67-75.
- HOAGLAND O.R., ARNON O.I., The water culture method for growing plants without soil. *Agriculture Experimental, California*, 1950, 32 p.
- HUNGRIA M., STACEY G., 1997. Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: basic aspect and potential application in agriculture. *Soil Biology and Biochemistry*. Oxford.
- HUNGRIA M., VARGAS M., ANDRADE D., CAMPO R., CHUEIRE L., FERREIRA M., MENDES I., 1999. Fixação Biológica do nitrogênio em leguminosas de grão. En: Siqueira *et al* Inter-relação fertilidade, Biologia de Solo e Nutrição de plantas, Sociedade Brasileira de Ciências do Solo- Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG. p. 597-620.
- LABANDERA C., MILIAN A., BARAIBAR A., PASTORINI D., 1986. Calidad de los inoculantes y su efecto en la implantación y persistencia de las leguminosas, XII Reunión Latinoamericana de Rhizobiología- Panamá.
- LOPES A., STAMFORD N., FIGUEIREDO M., BURITY H., FERRAZ E., 1996. Resposta da aplicação de composto de lixo urbano, nitrogênio mineral e produtos mineralizantes na fixação do N₂ e no rendimento do caupi. *R.Bras. Ci. Solo* 20, 55-62.
- MIRZA N., BOHLOOL B., SOMASEGARAN P., 1990. Non-destructive chlorophyll assay for screening of strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *Soil. Biol. Biochem.* 22, 203-207.
- PAAU A., 1991. Improvement of *Rhizobium* inoculants by mutation, genetic engineering and formulation. *Biotechnology Advance* 9, 173-184.
- SCUDDER W., 1974. *Rhizobium* inoculation of soybeans for subtropical and tropical soils. I. Initial field trials. *Soil and Crop Science Society of Florida Proceedings* 34, 79-82.
- VARGAS M., HUNGRIA M., 1997. Biologia dos Solos dos Cerrados EMBRAPA-CPAC Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Planaltina, Brasília, p. 524.
- VINCENT J.M., 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. Oxford: Blackwells Scientific Publications. 164 pp.