

ESPECIFICIDADE SIMBIÓTICA ENTRE RIZÓBIOS E ACESSOS DE FEIJÃO-CAUPI DE DIFERENTES NACIONALIDADES

Gustavo Ribeiro Xavier

Pesquisador, Embrapa Agrobiologia, BR 465, Km 7, Seropédica, RJ, CEP. 23890-000, E-Mail:
Gustavo@Cnpab.Embrapa.Br

Lindete Miria Vieira Martins

Professora, Universidade Estadual Da Bahia, Av. Edgard Chastinet, S/Nº, Juazeiro, BA, CEP. 48900-000, E-
Mail: Mirialind@Yahoo.Com.Br

José Roberto de Assis Ribeiro

Estudante de doutorado CPGCS/UFRRJ, BR 465, Km 7, Seropédica, RJ, CEP. 23890-000, e-mail:
jbetous@yahoo.com

Norma Gouvêa Rumjanek

Pesquisadora, Embrapa Agrobiologia, BR 465, Km 7, Seropédica, RJ, CEP. 23890-000, e-mail:
norma@cnpab.embrapa.br

RESUMO - Este trabalho teve como objetivo avaliar a taxa de ocupação nodular de estirpes de rizóbio inoculadas em acessos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) oriundos do Brasil, EUA e Nigéria e sua relação com a especificidade simbiótica. A ocupação dos nódulos foi determinada pelo ensaio indireto de imunoadsorção com enzima conjugada (ELISA-indireto). Observou-se que o número e o peso de nódulos foi influenciado pela origem dos acessos de feijão-caupi. A inoculação foi capaz de promover um aumento significativo no número de nódulos ocupados pela estirpe de rizóbio pertencente ao sorogrupo do inoculante. Os acessos brasileiros apresentaram as maiores taxas de ocupação nodular, seguido dos da Nigéria e dos EUA. A maior percentagem de ocupação em 6 dos 10 acessos de feijão-caupi testados foi decorrente da inoculação com a estirpe BR 3273, e a menor foi devido a estirpe BR 3269 em 8 dos 10 acessos de feijão-caupi. Esses dados sugerem uma especificidade entre essas estirpes e os acessos de feijão-caupi.

Palavras-Chave: *Vigna unguiculata*, FBN, competitividade, ELISA.

SYMBIOTIC SPECIFICITY BETWEEN RHIZOBIUM STRAINS AND COWPEA ACCESSES FROM DIFFERENT NATIONALITIES

ABSTRACT - This work aimed to evaluate nodular occupancy rate of rhizobium strains inoculated in different cowpea accesses (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) from Brazil, USA and Nigeria and their relationship with the symbiotic specificity. The identification of strains in nodules was done using Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Indirect-ELISA). It was observed that the nodule number and weight were influenced by the origin of cowpea accesses. The inoculation was able to promote a significant increase in the number of nodules occupied by serogroup of inoculant strain. In agreement with the cowpea accesses origin, the Brazilian accesses presented the largest of nodule occupancy rates, followed by those of Nigeria and USA. The largest occupation percentage, in 6 of the 10 tested cowpea, was due to the inoculation with the BR 3273 strain, and the smallest one was due to BR 3269 strains, in 8 of the 10 cowpea accesses. These data suggests that specificity exists between rhizobium inoculant strains and cowpea accesses.

Keywords: *Vigna unguiculata*, BNF, competitiveness, ELISA.

INTRODUÇÃO

A interação entre leguminosas e rizóbio é um exemplo de associação biológica intensamente estudada, cujos benefícios para a sustentabilidade agrícola são reconhecidos devido ao processo de Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN). Além

dos fatores edafo-climáticos, esse processo é também influenciado pelas características genótípicas do macro e microssimbionte e modulado por uma intensa troca de sinais moleculares, refletindo nas diferentes respostas em relação a faixa hospedeira, especificidade e

eficiência simbiótica (HARTWIG, 1998).

Em ambientes tropicais, a importância da FBN está relacionada com a baixa disponibilidade de nitrogênio nos solos, agravada pela lixiviação desse macronutriente. No entanto, a otimização da FBN requer estudos de seleção de associações eficientes e adaptáveis às condições regionais.

No semi-árido do Nordeste do Brasil as condições de estresses hídrico, térmico e, por vezes, salinos, caracterizam esse ambiente. Nesta região, o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) se destaca como cultura adaptada e de importância sócio-econômica para pequenos e médios agricultores (FREIRE FILHO *et al.*, 2005). Essa leguminosa é capaz de ser nodulada facilmente com um grupo de rizóbio presente no solo, designado como grupo miscelânea feijão-caupi ou rizóbio tropical, característica encontrada também em várias outras leguminosas de ocorrência nos trópicos (RUMJANEK *et al.*, 2005).

A definição da faixa hospedeira é bastante variável entre as espécies de rizóbio e leguminosas, mas de modo geral tem sido observada especificidade simbiótica entre as espécies (SMITH & GOODMAN, 1999). O genótipo da planta por exemplo, pode desempenhar um papel essencial na seleção do microssimbionte (DEMEZAS *et al.*, 1995; PAFFETTI *et al.*, 1998).

No entanto para feijão-caupi, a promiscuidade desta planta em ser nodulada por vários tipos de rizóbios tem desmotivado a seleção de estirpes para a cultura, já que sob o ponto de vista técnico, as estirpes responsáveis pela nodulação são bastante competitivas na formação dos nódulos mas pouco eficientes no N fixado (RUMJANEK *et al.*, 2005), cujas estimativas estão na faixa 9 a 51 kg N fixado/ha (BODDEY *et al.*, 1989). Além disso, com frequência tem sido relatada uma relação inversa entre resposta à inoculação e tamanho da população de rizóbios nativos no solo (WEAVER & FREDERICK, 1974; THIES *et al.*, 1991).

A avaliação da capacidade de ocupação dos nódulos pode fornecer subsídios em relação à capacidade de sobrevivência, estabelecimento e competitividade da estirpe inoculante com outros rizóbios presentes no solo ou com estirpes já introduzidas (SIMON *et al.*, 1996; MARTINS *et al.*, 2003). A técnica de ELISA (“Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assays”) vem sendo rotineiramente utilizada para essa finalidade e também para identificar e estudar os aspectos

ecológicos das estirpes de rizóbio que ocupam os nódulos (MARTENSON & GUSTAFSSON, 1985; ARSAC & CLEYET-MAREL, 1986; EVANS *et al.*, 1996; RIBEIRO, 1999).

Particularmente no caso da competitividade, as estirpes introduzidas atuam nos diferentes estágios de nodulação: competem na rizosfera (CHATEL *et al.*, 1968), durante a ocupação dos sítos de infecção e ao penetrar nas raízes e promover o desenvolvimento dos nódulos (TORO, 1996; SESSITSCH *et al.*, 2002). Aliada à eficiência simbiótica, essas características são altamente desejáveis para estirpes de rizóbios recomendadas para inoculação (BROCKWELL, 1981).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a taxa de ocupação nodular de estirpes de rizóbio inoculadas em diferentes acessos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) do Brasil, EUA e Nigéria e sua relação com a especificidade simbiótica.

MATERIAL E MÉTODOS

Dez acessos de feijão-caupi (Tabela 1), selecionados a partir do estudo de caracterização da variabilidade genética utilizando marcador do tipo RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”) (Xavier *et al.*, 2005), foram cultivados em um solo não estéril (Latosolo Amarelo) e inoculados, isoladamente, com 5 estirpes de rizóbio e um tratamento controle sem inoculação, perfazendo um fatorial completo com 3 repetições. As estirpes de rizóbio utilizadas foram BR 3267, BR 3300, BR 3273, BR 3269 e BR 3271, obtidas por Martins (1996) de nódulos de feijão-caupi cultivados em solos da região Nordeste do Brasil, e depositados no banco de coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia.

Antes da execução do estudo de competitividade de rizóbio, foi determinada a quantidade de rizóbio nativo presente no solo, utilizando a técnica de NMP (Número Mais Provável) (WOOMER, 1994), para determinar a densidade de rizóbios nativos no solo.

As sementes de cada acesso foram pré-germinadas em areia e vermiculita (1:1). Após 7 dias, as plantas foram transplantadas para recipientes com capacidade de 500mL, contendo 400 mL de solo e, em seguida se procedeu a inoculação das estirpes (1mL/plântulas) previamente cultivadas em meio YMA (VINCENT, 1970), durante 7 dias a 28°C, com concentração equivalente a 10⁸ células/mL.

A coleta do experimento foi realizada aos 45 dias após a inoculação. As raízes de cada

Tabela 1. Acessos de feijão-caupi utilizados para avaliar a competitividade de rizóbio.

Acessos	Grupos RAPD *	Origem	Cor do grão
Galanção	I	Brasil	marrom
BR-14	I	Brasil	marrom
TE 87-98-8 G	I	Brasil	branco
Princess Ann	II	EUA	Manchado com olho preto
IPA 206	III	Brasil	marrom
AU 94-MOB-816	III	EUA	pintado
IT 81D-1069	III	Nigéria	vermelho
BR-17	III	Brasil	sempre-verde
IT 87D-939-1	IV	Nigéria	manchado
VITA 7	IV	Nigéria	sempre-verde

* Xavier *et al.*, (2005).

tratamento foram lavadas em água corrente e, os nódulos foram coletados, contados, pesados e armazenados em recipiente de plástico, contendo sílica gel, para posterior análise sorológica.

Testes imunológicos com base na técnica de ELISA indireto, modificada por Ribeiro (2004), foram utilizados para determinar as taxas de ocupação dos sorogrupos das estirpes inoculadas e da população nativa de rizóbio no solo.

Os testes foram realizados em microplacas de poliestireno Hemobag® (Hemobag Produtos Cirúrgicos Ltda., Campinas, SP) de 96 poços e seguiram o protocolo descrito por Ribeiro (2004). Foram aplicados 50 µL/poço de Poli-L-lisina (0,001%; 37°C; 20 min) para formar um polímero de suporte na placa, descartados, seguido de lavagem com 200µL/poço de tampão TBS (tampão Tris 10mM; NaCl 0,15mM; pH 7,3). O antígeno (bactéria no nódulo macerado) foi descongelado e um volume de 50µL foi depositado em cada poço seguido de incubação (37°C; 20 min). Decorrido esse período, uma nova lavagem com 200µL/poço de tampão TBS foi realizada e, em seguida foram aplicados 100µL/poço de uma solução de bloqueio (BSA 3% em TBS; 37°C; 30 min.). Após o descarte da solução de bloqueio, foram adicionados 50µL/poço do anticorpo primário seguido de incubação (37°C; 30min). O excesso de anticorpo foi descartado e a placa lavada 3 vezes consecutivas com 200µL/poço (BSA 0.5%; Tween 20 0,05% em TBS). Após esta etapa, 50µL/poço do anticorpo secundário (anti-imunoglobulina de coelho conjugado com fosfatase alcalina, CalBiochem) foram aplicados e as placas incubadas (37°C; 30 min). O conjugado restante foi retirado e a placa

lavada 5 vezes consecutivas com 200µL/poço da mesma solução de lavagem descrita anteriormente. Finalmente, 100µL da solução contendo substrato para a enzima fosfatase alcalina (p-Nitrofenilfosfato) foram adicionados a cada poço mantendo-se a placa a temperatura ambiente durante um período de 30 min. Após esta última incubação foi realizada a leitura da densidade óptica (405nm) com o auxílio de um espectrofotômetro (Labsystem Multiskan Plus), específico para leitura em microplacas, acoplado a um PC (486 dx2) com o programa Labsystem Transmit Multiskan Plus para Windows.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observada uma diferença significativa (Tukey; 5%) em relação ao número e massa de nódulos tanto em relação aos acessos de feijão-caupi como para as estirpes de rizóbio (Figuras 1 e 2). O acesso de feijão-caupi BR-17 formou mais nódulos do que os acessos BR-14, Princess Ann, VITA 7 e Au 94-MOB 816, apresentando este último, uma diferença cerca de 4 vezes superior. Quando comparada à massa de nódulos nesses acessos de feijão-caupi a diferença foi observada somente em relação ao BR-17 e Au 94-MOB 816 (Figuras 1 A e B).

Em condições de campo, quando se compara a nodulação de diferentes cultivares de feijão-caupi por estirpes nativas, se observa uma variabilidade ainda maior do que aquela determinada em condições controladas (CASTILLEJA & ROSKOSKI, 1983), mas ainda essas avaliações são úteis para indicar a variabilidade de resposta e a natureza das amostras. Parâmetros relacionados com número e massa de nódulos são critérios frequentemente

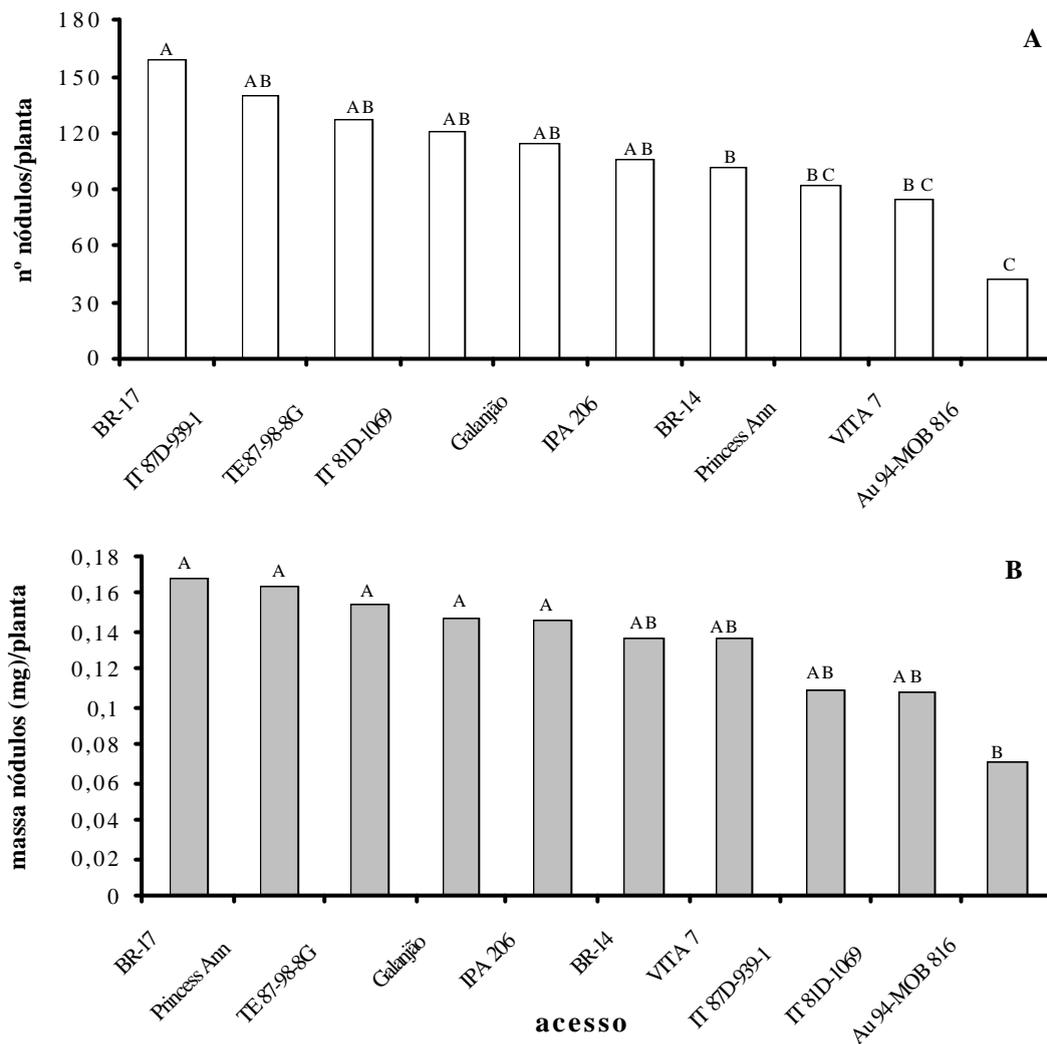


Figura 1. Número e massa de nódulos por planta de acordo com os acessos de feijão-caupi (A e B) (Tukey; 5%). Média de 3 repetições.

utilizados para avaliação da simbiose entre rizóbios e leguminosas, fazendo parte, inclusive, do protocolo para avaliação da eficiência agrônoma de estirpes no Brasil pela RELARE (Rede de Laboratórios para recomendação, padronização e difusão de tecnologia de inoculantes microbiológicos de interesse agrícola).

No caso do efeito das estirpes BR 3269, BR 3271 e BR 3300, essas induziram a formação de maior número de nódulos em relação ao controle sem inoculação (Figura 2) e, no caso da estirpe BR 3269 essa diferença foi de quase o dobro, relação observada também por Asad et al. (1991) utilizando outras estirpes. Em relação à massa de nódulos, a estirpe BR 3267 foi a única que diferiu

em relação ao controle sem inoculação em solo não estéril.

Apesar da concentração no inóculo ter sido de 10^8 células.mL⁻¹, algumas estirpes não apresentaram diferenças em relação ao controle sem inoculação, mesmo com uma população nativa de rizóbio estimada pela técnica de NMP em 10^3 células.mL⁻¹. Este fato corrobora com a possibilidade de outros eventos, não só a densidade de células no inoculante promover a nodulação, como por exemplo a interferência dos fatores ambientais e do solo e a capacidade de sobrevivência da estirpe introduzida (RUMJANEK *et al.*, 2005). Outro fator relevante para o sucesso da ocupação dos nódulos pelas bactérias é a seletividade simbiótica dos genótipos vegetais, cuja especificidade pode ser o

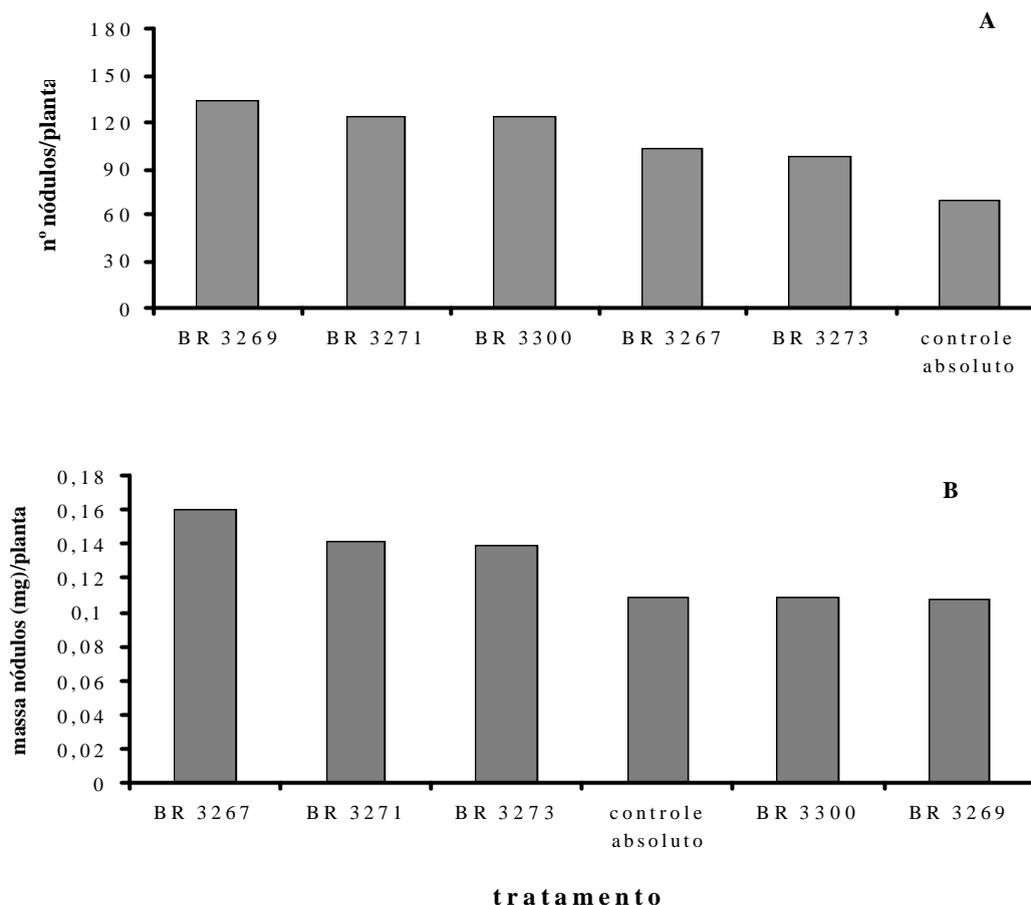


Figura 2 Número e massa de nódulos por planta de acordo com estirpes inoculantes e um tratamento sem inoculação (C e D). (Tukey; 5%). Média de 3 repetições

fator principal nas modificações das populações de *Rhizobium* no solo (PAFFETTI *et al.*, 1998).

Na avaliação do desempenho de um inoculante pela ocupação dos nódulos, é primordial determinar a presença de populações de rizóbio nativo no solo e sua capacidade de ser reconhecido pelo sorogrupo da estirpe inoculada. Desta forma, pode-se constatar que a maior percentagem de ocupação em 6 dos 10 acessos de feijão-caupi testados foi decorrente da inoculação com a estirpe BR 3273, e a menor foi devido à estirpe BR 3269 em 8 dos 10 acessos (Figura 3). Outros autores também observaram diferenças entre 3 estirpes de *Bradyrhizobium* spp. quanto à habilidade em ocupar nódulos de feijão-caupi. A estirpe CP3-S se mostrou mais competitiva que as estirpes CBD-S e CKF-S, formando 85% dos nódulos (DANSO & OWIREDU, 1988). Asad *et al.* (1991) encontraram 40% de ocupação dos nódulos em média quando a estirpe TAL 169 foi

inoculada em feijão-caupi, apesar de que outra estirpe (TAL 658) não foi capaz de ocupar nenhum nódulo, indicando a baixa capacidade competitiva desta estirpe em relação a população nativa do solo.

Foi observado também um efeito em relação à origem dos acessos de feijão-caupi. De um modo geral, os acessos do Brasil apresentaram as maiores taxas de ocupação dos nódulos pelo sorogrupo das estirpes inoculantes, ao contrário dos acessos da Nigéria e dos EUA. Como as estirpes inoculadas foram coletadas em solos da região Nordeste do Brasil (MARTINS *et al.*, 1997), esses dados sugerem certa especificidade entre essas estirpes e os acessos de feijão-caupi do Brasil utilizados nesse estudo. No entanto, apesar das estirpes terem sido obtidas utilizando a cultivar IPA 206 como planta-isca, não foram observadas as maiores percentagens de ocupação nodular nesse caso.

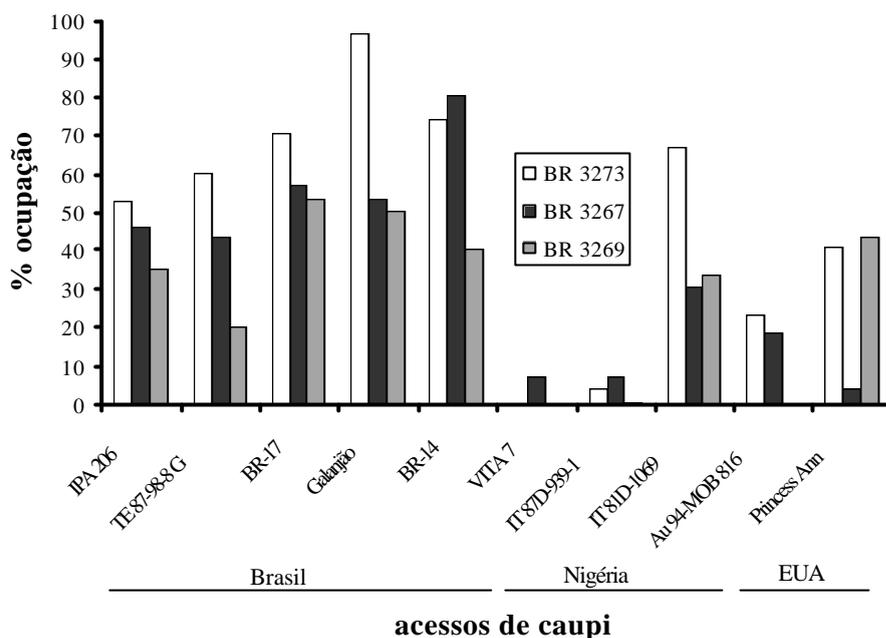


Figura 3. Percentagem de nódulos ocupados por rizóbios do grupo sorológico da estirpe inoculante nos diferentes acessos de feijão-caupi oriundos do Brasil, da Nigéria e dos EUA, obtidos pelo teste de ELISA.

Além da diferença na percentagem de ocupação dos nódulos devido ao inoculante e à população nativa, uma outra característica importante é o número de nódulos ocupados pelo sorogrupo da estirpe inoculante, que pode fornecer subsídios em relação aos sítios de infecção nodular (Figura 4). Foi observada uma grande amplitude de resposta quanto a esse parâmetro em relação aos diferentes acessos de feijão-caupi e uma diferença significativa (Tukey, 5%) da estirpe utilizada como inoculante.

Não foi observada diferença em relação ao número de nódulos ocupados pelo sorogrupo da estirpe inoculante nos tratamentos inoculados e na população nativa com a estirpe BR3267 (Figura 3A). No entanto, essa estirpe BR3267 foi a mais competitiva em experimentos de campo realizados por Martins et al. (2003), utilizando a cultivar IPA206, sendo responsável por um incremento de 30% na produtividade.

Esses dados demonstram ser possível selecionar estirpes mais competitivas para utilização em programas de inoculação do feijão-caupi, que podem contribuir para aumentar a produtividade dessa cultura. Lacerda et al. (2004) também observaram incremento na produtividade inoculando feijão-caupi com estirpe de rizóbio.

As maiores diferenças foram observadas com

a estirpe BR3269 (Figura 3C). No entanto, parte da população nativa de rizóbio foi reconhecida pelo sorogrupo das estirpes inoculantes nos diferentes acessos de feijão-caupi analisados, demonstrando a presença de rizóbios no solo pertencentes as estirpes usadas como inoculantes.

Quando comparado os dados das Figuras 2 e 3, observa-se que apesar do acesso Galanção apresentar quase a totalidade dos nódulos do mesmo sorogrupo da estirpe inoculada, o número total de nódulos ocupados foi o mais baixo quando comparado com os materiais brasileiros. Esses dados sugerem que não basta observar a ocupação nodular mas também outros parâmetros relacionados com a FBN.

De acordo com Gwata et al. (2004) a efetividade na formação dos nódulos e a fixação de N_2 por estirpe de rizóbio está diretamente influenciada com a promiscuidade, através da produção de nódulos funcionais com estirpes da miscelânea feijão-caupi. Dessa forma, a determinação de padrão de efetividade e a habilidade competitiva de uma estirpe de rizóbio na inoculação do feijão-caupi abrem novas perspectivas de pesquisas, sejam através da identificação e interpretação das bases genéticas envolvidas no processo de troca de sinais moleculares, como para orientar programas de

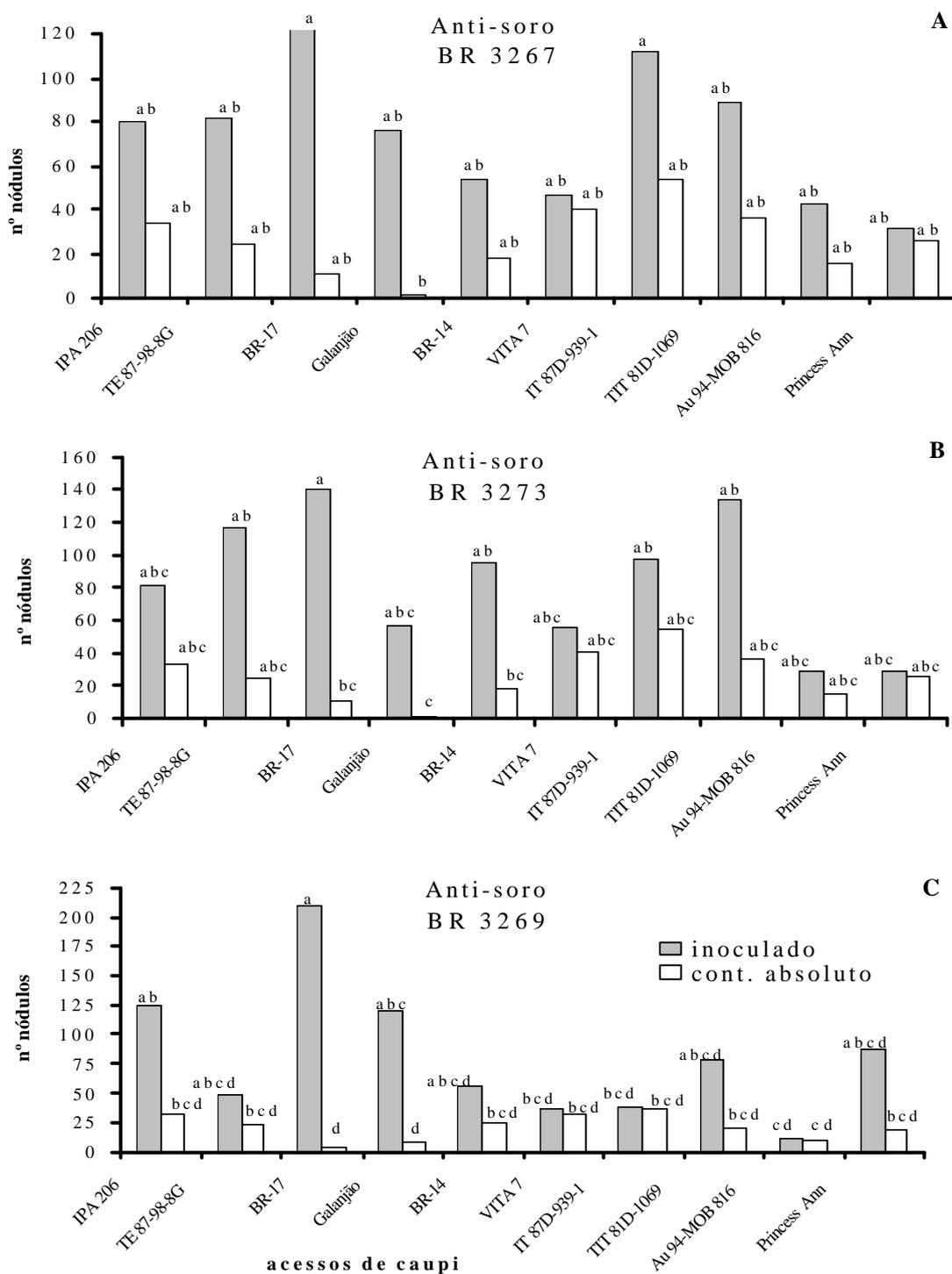


Figura 4. Número de nódulos reconhecidos pelos anti-soros das estirpes inoculantes em diferentes acessos de feijão-caupi . (A) Anti-sero estirpe BR 3267, (B) Anti-sero estirpe BR 3273 e (C) Anti-sero estirpe BR 3269. (Tukey; 5%).

seleção de cultivares que levem em conta também parâmetros relacionados com a FBN.

CONCLUSÕES

A taxa de ocupação nodular de estirpes de rizóbios utilizadas como inoculante foi

dependente da origem dos acessos de feijão-caupi ;

Os acessos brasileiros apresentaram as maiores taxas de ocupação das estirpes usadas como inoculante;

A estirpe BR3273 foi a mais competitiva na formação dos nódulos ao contrário da BR3269;

Foi observada especificidade simbiótica entre as estirpes de rizóbios e os acessos de feijão-caupi .

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio do CNPq e Prodetab pelo financiamento dos trabalhos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARSAC, J. F.; CLEYET-MAREL, J.C. Serological and ecological studies of *Rhizobium* spp. (*Cicer arietinum* L.) by immunofluorescence and ELISA technique: competitive ability for nodule formation between *Rhizobium* strains. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 94, p. 411-423, 1986.
- ASAD, S.; MALIK, K.A.; HAFEEZ, F.Y. Competition between inoculated and indigenous *Rhizobium/Bradyrhizobium* spp. strains for nodulation of grain and fodder legumes in Pakistan. **Biology Fertility of Soil**, Berlin, v. 12, p. 107-111, 1991.
- BODDEY, R.M.; URQUIAGA, S.; SUHET, A.R.; PERES, J.R.; NEVES, M.C.P. Quantification on the contribution of N₂ fixation to field-grown legumes: a strategy for the practical application of the ¹⁵N isotope dilution technique. **Soil Biology and Biochemistry**, v.22, n.5, p.649-655, 1989.
- BROCKWELL, J. Can inoculant strains ever compete successfully with established soil populations? In: GIBSON, A. H.; NEWTON, W. E. (Ed.). **Current Perspectives in Nitrogen**. Amsterdam: North Holland/Elsevier, 1981. p. 277-315.
- CASTILLEJA, G.; ROSKOSKI, J.P. N₂(C₂H₄) Fixing activity in 17 varieties of field-grown cowpea. **Turrialba**, Costa Rica, v.33, n.1, p.67-71, 1983.
- CHATEL, D.L.; GREENWOOD, R.M.; PARKER, C.A. Saprophytic competence as an important character in the selection of *Rhizobium* for inoculation. In: HOLMES, J.V. ed. **TRANSACTIONS OF THE 9TH INTERNATIONAL CONGRESS OF SOIL SCIENCE**, Sydney, The International Society of Soil Science and Angus and Robertson, 1968, v.2, p.65-73, 1968.
- DANSO, S.K.A.; OWIREDU, J.D. Competitiveness of introduced and indigenous cowpea *Bradyrhizobium* strains for nodule formation on cowpeas (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) in three soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 20, p. 305-310, 1988.
- DEMEZAS, D. H.; REARDON, T. B.; STRAIN, S. R.; WATSON, J. M.; GIBSON, A. H. Diversity and genetic structure of a natural population of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* isolated from *Trifolium subterraneum* L. **Molecular Ecology**, v. 4, n. 2, p. 209-220. 1995.
- EVANS, J.; GREGORY, A.; DOBROWOLSKI, N.; MORRIS, S.G.; O'CONNOR, G.E.; WALLACE, C. Nodulation of field-grown *Pisium sativum* and *Vicia faba*: competitiveness of inoculation strains of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* determined by an indirect, competitive ELISA method. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 28, p. 247-255, 1996.
- FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; VIANA, F. M. P.; RIBEIRO, V. Q. **Feijão caupi: avanços tecnológicos**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2005. 640 p.
- GWATA, E. T.; WOFFORD, D. S; PFAHLER, P. L; BOOTE, K. J. Genetics of promiscuous nodulation in soybean: nodule dry weight and leaf color score. **Journal of Heredity**, v. 95(2), p. 154-157, 2004.
- HARTWIG, U. A. The regulation of symbiotic N₂ fixation: a conceptual model of N feedback from the ecosystem to the gene expression level. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 1, p. 92-120, 1998.
- LACERDA, A. M.; MOREIRA, F. M. S.; ANDRADE, M. J. B.; SOARES, A. L. L. Efeito de estirpes de rizobio sobre a nodulação e produtividade do feijao-caupi. **Revista Ceres**, v. 51, n.293, p. 67-82, 2004.

- MARTENSON, A.M.; GUSTAFSSON, J.G. Competition between *Rhizobium trifolii* strains for nodulation, during growth in a fermenter, and in soil based inoculants, studied by ELISA. **Journal of General Microbiology**, London, v. 131, p. 3077-3082, 1985.
- MARTINS, L. M. V.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Growth characteristics and symbiotic efficiency of rhizobia isolated from cowpea nodules of the north-east region of Brazil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 1005–1010, 1997.
- MARTINS, L.M.V. **Características ecológicas e fisiológicas de rizóbio que nodula caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) isolados a partir de solos da região Nordeste do Brasil**. 1996. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1996.
- MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; RANGEL, F. W.; RIBEIRO, J. R. A.; NEVES, M. C. P.; MORGADO, L. B.; RUMJANEK, N. G. Contribution of biological nitrogen fixation to cowpea: a strategy for improving grain yield in the semi-arid region of Brazil. **Biology and Fertility of Soil**, v. 38, p. 333-339, 2003.
- PAFFETTI, D.; DAGUIN, F.; FANCELLI, S.; GNOCCHI, S.; LIPPI, F.; SCOTTI, C.; BAZZICALUPO, M. Influence of plant genotype on the selection of nodulating Sinorhizobium meliloti strains by Medicago sativa. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 73, p. 3–8, 1998.
- RIBEIRO, J. R. A.; RUMJANEK, N. G. Aplicação de método de Elisa indireto para Detemrinação da taxa de estabelecimento de inoculante rizobiano a partir de extratos de nódulos de leguminosas. **Agronomia**, v. 38, n. 1, p. 71-77, 2004.
- RUMJANEK, N. G.; MARTINS, L. M. V.; XAVIER, G. R.; NEVES, M. C. P. Fixação Biológica de Nitrogênio. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; SILVA, P. H. S.; VIANA, F. M. P. (Org.). **Feijão caupi: avanços tecnológicos**. p. 281-335, 2005.
- SESSITSCH, A; HOWIESON, J. G; PERRET, X; ANTONUN, H; MARTINEZ – ROMERO, E. Advances in *Rhizobium* research. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 21, p. 323-378, 2002.
- SIMON, T.; KÁLALOVÁ, S.; PETRZIK, K. Identification of *Rhizobium* strains and evaluation of their competitiveness. **Folia Microbio**, v.41, p. 65-72, 1996.
- SMITH, K. P.; GOODMAN, R. M. Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes. **Annual Reviews of Phytopathology**, v. 37, p. 473–491, 1999.
- THIES, J. E.; SINGLETON, P. W.; BOHLOOL, B. B. Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 19-28, 1991.
- TORO, N. Nodulation competitiveness in the *Rhizobium*-legume symbiosis. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v.12, p. 157-162, 1996.
- VINCENT, J.M. **A manual for the practical study of root-nodule bacteria**. International Biological Program (IPB) handbook, nº.15. Blackwell Scientific, Oxford.
- WEAVER, R. W.; FREDERICK, L. R. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max* L. Merrill – I: greenhouse studies. **Agronomy Journal**, Madison, v. 66, p. 229-232, 1974.
- WOOMER, P. L. Most Probable Number Counts. In: WEAVER, R. W.; ANGLE, S.; BOTTOMLEY, P.; BEZDICEK, D.; SMITH, S.; TABABAI, A.; WOLLUM, A. Methods of soil analysis: Part 2, **Microbial and biochemical properties**, p. 59-79, 1994.
- XAVIER, G. R.; MARTINS, L. M. V.; RUMJANEK, N; G.; FREIRE FILHO, F. R. Variabilidade genética em acessos de caupi baseada em marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, p. 353-359, 2005.