



ISSN 0104-866X
Dezembro, 2001

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agropecuária do Meio-Norte
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Avanços Tecnológicos no Feijão Caupi

V Reunião Nacional de Pesquisa de Caupi
4 a 7 de dezembro de 2001

Anais

Organizadores:

Francisco Rodrigues Freire Filho
Embrapa Meio-Norte

Valdenir Queiroz Ribeiro
Embrapa Meio-Norte

Aderson Soares de Andrade Júnior
Embrapa Meio-Norte

Edson Alves Bastos
Embrapa Meio-Norte

Embrapa Meio-Norte

Teresina, PI

2001

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Meio-Norte
Av. Duque de Caxias, 5650
Telefone: (86) 225-1141
Fax: (86) 225-1142. E-mail: publ@cpann.embrapa.br.
Caixa Postal 01
CEP 64006-220 Teresina, PI

Tratamento editorial: Lígia Maria Rolim Bandeira
Normalização bibliográfica: Jovita Maria Gomes Oliveira
Capa: Célio Marcos Martins de Oliveira

Tiragem: 600 exemplares

Todos os direitos reservados

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação aos direitos autorais (Lei nº 9.610)

CIP - Cotalogação na publicação
Embrapa Meio-Norte

Reunião Nacional de Pesquisa de Caupi, (5.: 2001. Teresina). Anais da 5ª
Reunião Nacional de Caupi [Organização de] Francisco Rodrigues
Freire Filho... [et al.]. Teresina, PI. Embrapa Meio-Norte, 2001.
343 p.; 28 cm - (Embrapa Meio-Norte. Documentos,
ISSN 0104-866X; 56)

1. Caupi, Tecnologia. 2. Feijão de corda - Tecnologia.
I. Freire Filho, Francisco Rodrigues. II Título. III Título: Avanço
Tecnológicos no Feijão Caupi. IV Série.

CDD. 635.6592063-21. ed

©Embrapa 2001

SELEÇÃO DE ESTIRPES DE RIZÓBIO PARA INOCULAÇÃO DE CAUPI (*Vigna unguiculata*) EM ÁREAS DE CERRADO

J. E. ZILLI¹, N. G. RUMJANEK², F. R. FREIRE FILHO³ e M. C. P. NEVES⁴

Resumo – Recentemente tem surgido o interesse pela introdução da cultura do caupi em áreas de Cerrado do estado do Piauí e Maranhão e com ele a necessidade de seleção de estirpes de rizóbio eficientes e competitivas para inoculação destas lavouras. Neste contexto, o presente trabalho objetivou avaliar a eficiência simbiótica e ocupação nodular de 15 estirpes de rizóbio. Conduziu-se dois experimentos: um em casa de vegetação para avaliar a eficiência simbiótica e um em campo para avaliar a ocupação nodular. Os resultados da eficiência simbiótica mostraram que 10 das estirpes foram tão eficientes tanto quanto a estirpe BR2001 (recomendada pela RELARE) para todos os parâmetros analisados. Quanto a ocupação nodular 5, das estirpes testadas (BR3262, BR3267, BR3280, BR3287 e BR3288) foram significativamente superiores à estirpe BR2001. As estirpes BR3262 e BR3287 se destacaram pois não foram encontradas no tratamento controle e ocuparam mais de 60% dos nódulos analisados no tratamento inoculado.

Palavras-chave: cerrado, caupi e inoculação.

SELECTION OF RHIZOBIUM STRAINS FOR COWPEA (*Vigna unguiculata*) INOCULATION IN CERRADO AREAS

Abstract – Cowpea cultivation is recently increasing in the Cerrado region of the Piauí and Maranhão states and as a result there is a need for selection of efficient and competitive rhizobium strains to inoculate this crop in those areas. An evaluation of the symbiotic efficiency and nodular occupation of 15 rhizobium strains, most of them isolated from Cerrado soils was carried out in both green-house to evaluate the symbiotic efficiency and field trial to evaluate the nodules occupation in field condition. The results of the symbiotic efficiency showed that 10 of the strains were as efficient as the strain BR2001 (standard official inoculant recommended for cowpea) in all parameters analyzed. Five of the strains tested in the field (BR3262, BR3267, BR3280, BR3287 and BR3288) were superior than the standard inoculant strain. The strain BR3262 and BR3287 showed good potential to be used as inoculant for that region, because they were not found among the native population and occupied more than 60% of the analyzed nodules.

Keywords: cerrado, cowpea and inoculation.

Introdução

No Brasil, a cultura do caupi é explorada basicamente nas regiões semi-áridas nordestinas, principalmente, devido às suas características adaptativas. Entretanto, recentemente tem surgido o interesse pela introdução do caupi em áreas de Cerrado nos Estados do Piauí e Maranhão, onde esta cultura entraria completando o ciclo das águas, logo após o cultivo de arroz, tanto em lavouras recém-desbravadas como em rotação de cultivo bianual com soja. Este sistema justifica-se pelo fato do caupi ser uma leguminosa capaz de obter grande parte do N necessário à cultura via fixação biológica de nitrogênio (FBN); apresentar um ciclo cultural relativamente curto, desenvolvendo-se bem em regime pluviométrico decrescente; apresentar boa adaptabilidade às condições adversas do solo de cerrado recém-desbravado e também por não apresentar sensibilidade ao fotoperiodismo. Neste sistema, mesmo com uso de baixo a médio aporte de insumos, os produtores têm obtido produtividades da ordem de 1500 kg.ha⁻¹ de grãos, que é alta quando comparada a média nacional desta cultura que gira em torno de 400 a 500 kg.ha⁻¹ (Freire Filho et al., 1998).

A simbiose entre caupi e rizóbio é reconhecidamente importante para a manutenção da produção de caupi em lavouras de subsistência, dada a baixa utilização de fertilizantes nitrogenados por parte dos agricultores e pela

¹Embrapa Agrobiologia, Caixa Postal 12500, CEP 23.890-000, Seropédica, RJ. E-mail: jerrizilli@yahoo.com.br

²Embrapa Agrobiologia, Caixa Postal 12500, CEP 23.890-000, Seropédica, RJ. E-mail: norma@cnpab.embrapa.com.br

³Embrapa Meio-Norte, Caixa Postal 01, CEP 64.006-220, Teresina, PI. E-mail: freire@cnpmmn.embrapa.com.br

⁴Embrapa Agrobiologia, Caixa Postal 12500, CEP 23.890-000, Seropédica, RJ. E-mail: neves@cnpab.embrapa.com.br

efetiva contribuição da FBN ser considerada suficiente para obtenção de altas produtividades (Neves et al., 1982). Neves et al. (1987), estimaram uma contribuição relativa da FBN entre 50 e 73 kg.ha⁻¹ de N em experimentos conduzidos em condições de no Cerrado brasileiro, enquanto Wani et al. (1995) citam uma estimativa mais ampla entre 9 a 125kg.ha⁻¹ nos campos africanos. Apesar destas estimativas, muitas vezes a inoculação das lavouras de caupi com estirpes de rizóbio selecionadas não apresenta contribuição significativa para o acúmulo de N. Este fato é atribuído em parte pela capacidade do caupi associar-se com várias espécies e estirpes de rizóbio. Em solos de regiões tropicais tem sido observado a presença de elevada quantidade de *Bradyrhizobium* sp. que normalmente são bastante competitivas na formação de nódulos, porém, muito variáveis quanto a eficiência simbióticas (Neves and Rumhanek, 1997). Estas estirpes acabam impedindo a formação de nódulos pela estirpe inoculante. Neste contexto, estudos de seleção de inoculantes que privilegiem testes com rizóbios nativos ou naturalizados no local de seleção, têm sido considerados capazes de apresentar melhores resultados, a medida que estirpes já estabelecidas no solo, normalmente são mais competitivas que estirpes introduzidas de outros locais (Thies et al., 1991).

Este trabalho objetivou selecionar estirpes de rizóbio com alta capacidade em fixar N₂ e competitividade na formação de nódulos na cultura do caupi para os solos de cerrado do Meio-Norte brasileiro.

Material e Métodos

Experimento 1. Teste de eficiência simbiótica em casa de vegetação

O experimento foi conduzido em blocos ao acaso com 5 repetições. Utilizou-se 16 tratamentos: 12 estirpes provenientes do cultivo de caupi com solo de cerrado do Piauí (BR3277, BR3278, BR3279, BR3280, BR3281, BR3282, BR3283, BR3284, BR3285, BR3286, BR3287, BR3288, BR3289), 1 estirpe (BR3267) oriunda do Semi-árido, uma (BR3262) da SIPA (Embrapa Agrobiologia/UFRRJ/Pesagro-Rio), a estirpe BR2001 recomendada pela RELARE, um controle sem inoculante e sem N e um controle com 25mg.vaso⁻¹.semana⁻¹ de N. As sementes de caupi (cultivar BR17) foram desinfestadas (H₂O₂; 3 min) e semeadas em vasos de *Leonard*, contendo vermiculita e areia (2:1 v/v) esterilizadas. Os inoculantes foram incubados (96h; 28°C) em meio YM (Fred & Waskman, 1928) e a inoculação foi feita 3 dias após a germinação das sementes. As plantas foram nutridas com 250 ml da solução nutritiva de Norris e Döbereiner e irrigadas quando necessário com água esterilizada. Aos 50 dias após a semeadura, coletou-se o experimento, avaliando-se os parâmetros N- total acumulado na parte aérea das plantas pelo método semimicro Kjeldahl (Liao, 1982), matéria seca total, massa seca de nódulos e eficiência nodular.

Experimento 2. Teste de competitividade das estirpes no campo

O experimento foi conduzido na fazenda Boa Esperança no município de Baixa Grande do Ribeira, PI com blocos ao acaso e 3 repetições. Foram utilizados 8 tratamentos: 7 estirpes (BR3267, BR3262, BR2001, BR3280, BR3278, BR3287 e BR3288) as quais haviam apresentado os melhores resultados no primeiro experimento, um tratamento com 100 kg de uréia (50% no plantio e 50% aos 30 dias) e um controle sem inoculante e sem N. O inoculante foi preparado de acordo com protocolo do laboratório de Meio de Cultura da Embrapa Agrobiologia usando turfa esterilizada como veículo e concentração do inoculante da ordem de 10⁸ unidades formadoras de colônias por grama do inoculante. A inoculação das sementes foi realizada segundo De-Polli & Franco (1985). Antes da implantação do experimento coletou-se uma amostra de solo composta para estimar o número de rizóbios presentes no solo através do método NMP (Woomer, 1994). A área do experimento recebeu uma adubação com 200 kg do formulado mineral NPK-00:40:06 e a semeadura foi realizada com 50 cm entre linhas e 10 cm entre plantas. A coleta de nódulos foi realizada 40 dias após a semeadura, retirando-se cerca de 20 nódulos de cada uma das repetições.

Para avaliação da ocupação nodular foram realizados testes de ELISA (ensaio de imunoadsorção com enzima acoplada) utilizando anti-soros policlonais específicos para cada uma das estirpes de rizóbios inoculadas no campo. Os anti-soros foram produzidos utilizando-se coelhos como cobaias de acordo com os protocolos descritos por Reis et al. (1997) e adaptado por Ribeiro (1999).

Resultados e Discussão

Dez das estirpes provenientes do Cerrado apresentaram médias significativamente iguais à da estirpe BR2001 e superior ao tratamento com 25mg.semana⁻¹ de N, em todos os parâmetros analisados. A estirpe BR2001, atualmente recomendada pela RELARE como inoculante para a cultura do caupi, tem apresentado bons níveis de FBN em casa de vegetação (Martins, 1996; Zilli et al., 1999). Porém, embora seja recomendada há alguns anos, poucos trabalhos de avaliação da sua eficiência simbiótica têm sido feitos em condições de campo, o que é necessário, na prática, para a determinação dos benefícios a cerca do uso deste inoculante para a cultura do caupi.

Quanto à produção de matéria seca observou-se que a maioria das estirpes proporcionaram uma produção muito superior à testemunha nitrogenada, 8 delas inclusive, com produção acima de 6g (Figura 1), que é uma alta produção, comparada com dados de outros autores (Martins, 1996; Zilli et al., 1999). Contudo, 25 mg.semana⁻¹ de N pode não ter sido suficiente para potencializar o desenvolvimento das plantas.

Semelhante ao parâmetro anterior, relativo a produção de matéria seca, a maioria das estirpes contribuíram para um elevado acúmulo de N. Oito delas se destacaram acumulando mais de 200 mg.planta⁻¹ de N. (Figura 2). Destacadamente as estirpes BR3267 e BR3262 apesar de não terem apresentado diferenças significativa da estirpe BR2001, acumularam cerca de 15% mais N que esta estirpe. É importante destacar ainda que estas duas estirpes apresentaram bom desempenho também em outros trabalhos (Zilli et al., 1999; Martins, 1996).

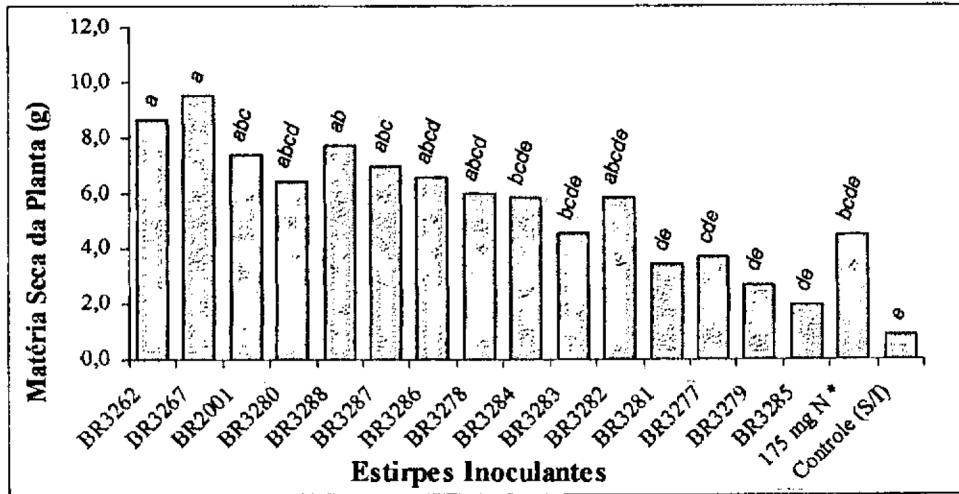


FIGURA 1. Matéria seca produzida por plantas de caupi inoculadas com estirpes de rizóbio isoladas do solo de cerrado. As estirpes BR2001, BR3262 e BR3267 foram oriundas da coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia. Tratamento com as mesmas letras não diferem a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

* Total do N aplicado durante 7 semanas (25 mg.vaso⁻¹.semana⁻¹).

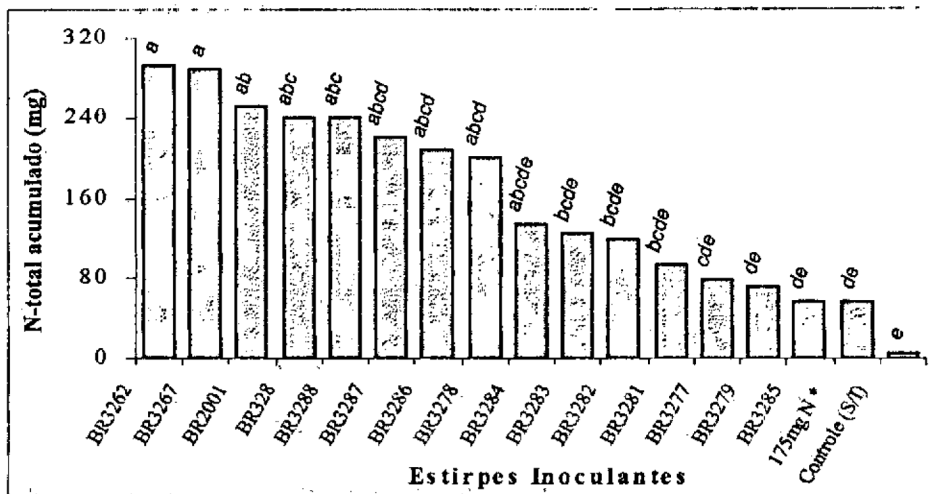


FIGURA 2. N-total acumulado pela parte de plantas de caupi inoculadas com estirpes de rizóbio obtidas do cultivo de caupi com solo de cerrado. As estirpes BR2001, BR3262 e BR3267 foram oriundas da coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia. Tratamento com as mesmas letras não diferem a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

* Total do N aplicado durante 7 semanas (25 mg.vaso⁻¹.semana⁻¹).

Quanto à produção de matéria seca observou-se que a maioria das estirpes proporcionaram uma produção muito superior à testemunha nitrogenada, 8 delas inclusive, com produção acima de 6g (Figura 1), que é uma alta produção, comparada com dados de outros autores (Martins, 1996; Zilli et al., 1999). Contudo, 25 mg.semana⁻¹ de N pode não ter sido suficiente para potencializar o desenvolvimento das plantas.

Semelhante ao parâmetro anterior, relativo a produção de matéria seca, a maioria das estirpes contribuíram para um elevado acúmulo de N. Oito delas se destacaram acumulando mais de 200 mg.planta⁻¹ de N. (Figura 2). Destacadamente as estirpes BR3267 e BR3262 apesar de não terem apresentado diferenças significativa da estirpe BR2001, acumularam cerca de 15% mais N que esta estirpe. É importante destacar ainda que estas duas estirpes apresentaram bom desempenho também em outros trabalhos (Zilli et al., 1999; Martins, 1996).

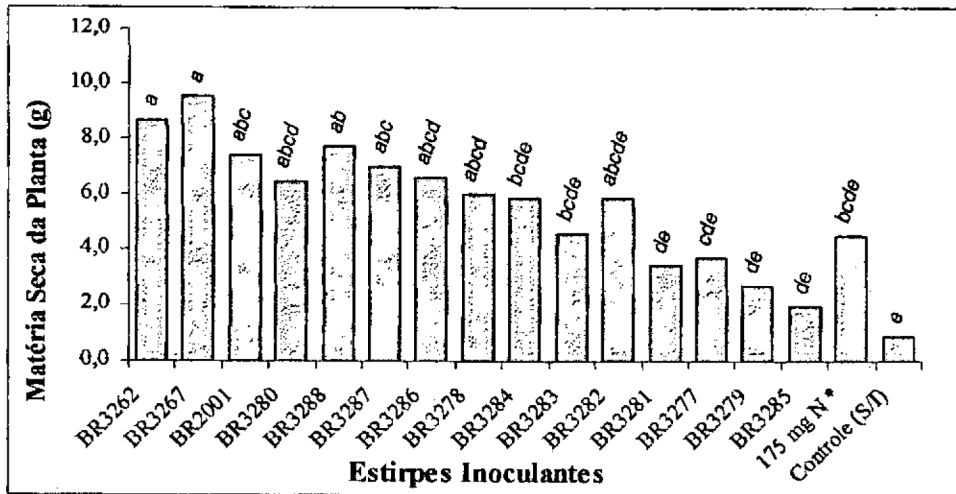


FIGURA 1. Matéria seca produzida por plantas de caupi inoculadas com estirpes de rizóbio isoladas do solo de cerrado. As estirpes BR2001, BR3262 e BR3267 foram oriundas da coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia. Tratamento com as mesmas letras não diferem a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.
* Total do N aplicado durante 7 semanas (25 mg vaso⁻¹.semana⁻¹).

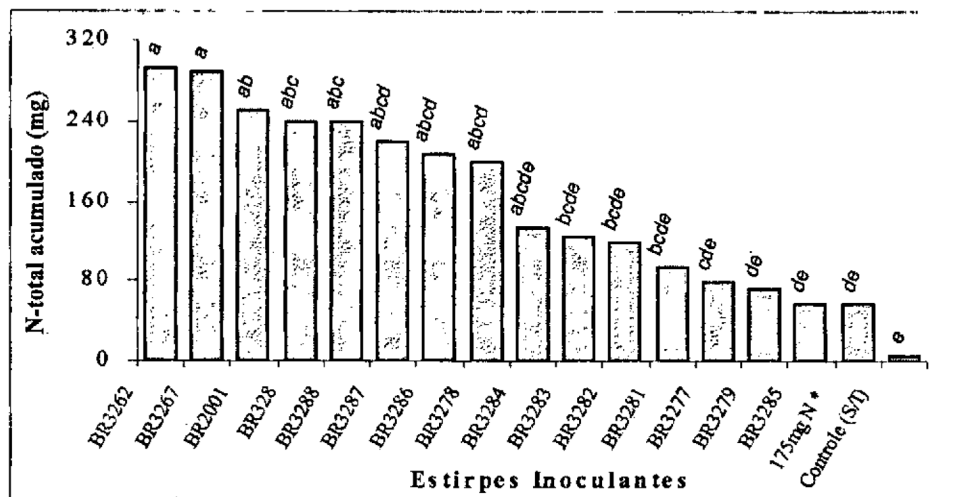


FIGURA 2. N-total acumulado pela parte de plantas de caupi inoculadas com estirpes de rizóbio obtidas do cultivo de caupi com solo de cerrado. As estirpes BR2001, BR3262 e BR3267 foram oriundas da coleção de culturas da Embrapa Agrobiologia. Tratamento com as mesmas letras não diferem a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.
* Total do N aplicado durante 7 semanas (25 mg vaso⁻¹.semana⁻¹).

O parâmetro eficiência nodular (Saito, 1982) indicou que apenas a estirpe BR3282 com eficiência menor que 150 mg.g^{-1} (N-total/matéria seca) foi significativamente inferior à estirpe BR2001 que teve eficiência superior a 600 mg.g^{-1} . Isto por que embora o acúmulo de N tenha sido maior para algumas estirpes, a atividade nodular foi semelhante. A massa de nódulos parece ter sido o fator discriminante entre as estirpes na acumulação de N, pois uma maior massa de nódulos acabou compensando a menor eficiência nodular das estirpes. No caso da cultura da soja tem-se verificado que estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* produzem menos nódulos quando comparadas com estirpes de *B. elkanii*, no entanto, seus nódulos apresentam uma maior eficiência (Boddey & Hungria, 1997).

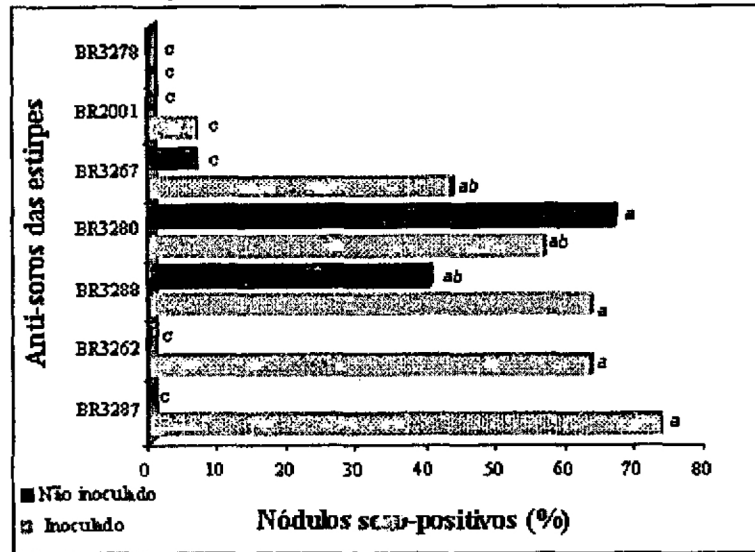


FIGURA 3. Porcentagem de nódulos soro-positivos avaliada por reação de ELISA, utilizando anti-soros policlonais específicos para cada estirpe inoculante. Tratamentos com as mesmas letras não diferem a nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A ocupação nodular avaliada no experimento de campo (Figura 3) revelou que três dos anti-soros utilizados (anti-soro BR3267, BR3280 e BR3288) reagiram positivamente com nódulos coletados no tratamento controle, demonstrando que estas estirpes ou seus soro-grupos estavam estabelecidos no solo. A presença destas estirpes na área do experimento não é uma surpresa, pois com exceção da estirpe BR3267, BR2001 e BR3262, todas as outras foram obtidas de áreas de Cerrado. Ao contrário, não se detectou reações dos anti-soros BR3287, BR3262, BR2001 e BR3278 com nódulos do tratamento controle, o que indica que estas estirpes não estavam presentes no solo testado. Entre os tratamentos inoculados, as estirpes BR3262, BR3267, BR3280, BR3287 e BR3288 apresentaram médias significativamente superiores às estirpes BR2001 e BR3278. É importante destacar que as estirpes BR3262 e BR3287 ocuparam mais de 60% dos sítios de infecção nas raízes do caupi, não foram detectadas no tratamento controle e a estimativa da população de rizóbio (método NMP) foi da ordem de 6×10^3 células de rizóbio por grama de solo, sugerindo boa capacidade competitiva destas estirpes. A estirpe BR2001 como observado por Ferreira et al. (1999) não foi capaz de estabelecer boa nodulação em condições de campo, nesta região.

No caso da soja, melhor capacidade de competir por sítios de nodulação no campo tem sido atribuída à espécie *B. elkanii* (Kuykandall et al. 1988; Neves & Rumjanek, 1997). Porém, apesar desta espécie apresentar melhor competitividade, tem sido verificado uma menor eficiência da FBN (Teaney & Fuhrmann, 1992; Neves et al., 1987). Isto tem sido atribuído ao elevado número de nódulos fisiologicamente inativos colonizados por *B. elkanii* (Boddey et al. 1997) e também pelo fenótipo *Hup* presente na associação soja / *Bradyrhizobium japonicum*. No caso de *B. japonicum*, apesar da sua maior eficiência em termos de FBN quando comparada à *B. elkanii*, tem sido observado dificuldades em competir para a formação de nódulos e se estabelecer no solo. No entanto, Vargas et al. (1994) mostraram a existência de estirpes de *B. japonicum* estabelecidas no solo de Cerrado, que além de serem eficientes na FBN, foram altamente competitivas no campo.

Como conclusão, pelo duas das estirpes estudadas (BR3262 e BR3287) mostram-se como potenciais inoculantes para as áreas de cerrado da região Meio-Norte, isto porque apresentaram eficiência simbiótica significativamente igual a estirpe BR2001 e foram capazes de formar mais de 60% dos nódulos avaliados, o que mostra que apresentam boa capacidade competitivas.

Agradecimentos

Capes, CNPq, Embrapa Meio Norte e UFRRJ.

Referências

BODDEY, L.H.; HUNGRIA, M. Phenotypic grouping of brazilian *Bradyrhizobium* strains which nodulate soybean. *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v.25, n.4, p.407-415, 1997.

BODDEY, L.H.; HUNGRIA, M.; SANTOS, M.A.; VARGAS, M.A.T. Capacidade de fixação de nitrogênio e ocupação nodular de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *B. elkanii*. In: Congresso Brasileiro de Ciências do Solo, 26., 1997, Rio de Janeiro. Anais. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1997. (CD-ROM).

DE-POLLI, H.; FRANCO, A.A. Inoculação de leguminosas. Rio de Janeiro: EMBRAPA-UAPNBS, 1985. (UAPNBS. Circular Técnica).

FERREIRA, E.P.B.; ZILLI, J.E.; RUMJANEK, N.G.; NEVES, M.C.P. Diversidade de rizóbio nativo em área da Mata Atlântica sob diferentes sistemas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA 11., 1999, Salvador. Anais. Salvador: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999, p.303.

FRED, E.B.; WAKSMAN, S.A. Yeast Extract – Mannitol agar for laboratory manual of general microbiology. New York, McGraw Hill, 1928, 145p.

FREIRE FILHO, F.R.; RIBEIRO, V.Q.; BARRETO, P.D.; SANTOS, C.A. Melhoramento genético de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) na região do Nordeste. Embrapa Semi-Árido. Workshop, 1998.

KUYKENDALL, L.D.; SAXENA, B.; ROY, M.A.; O'NEILL, J.J.; DEVINE, T.E. Fatty acids, antibiotic resistense. and deoxyribonucleic acid homology groups of *B. japonicum*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Washigton, v.38, n.4, p.358-361, 1988.

LIAO, C.F.H. Devarda's allow methods for total nitrogen determination. *Soil Science Society of American Journal*, Madison, v.45, n.5, p.852-855, 1981.

MARTINS, L.M.V. Características ecológicas e fisiológicas de rizóbios de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) isolados a partir de solos da região Nordeste do Brasil. Seropédica: UFRRJ, 1996, 213p. Tese de Mestrado.

NEVES, M.C.P. Energy cost of biological nitrogen fixation, biological nitrogen fixation for tropical agriculture. Cali, Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1982, p.77-92.

NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Diversity and adaptability of soyben and cowpea rhizobia in tropical soils. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.29, n.5/6, p.889-895, 1997.

NEVES, M.C.P.; URQUIAGA-CABALLERO, S.S.; PERES, J.R.; SUHET, A.R.; BODDEY, R.H. Aplicação da técnica da diluição isotópica de ¹⁵N na quantificação da fixação biológica de N₂ em caupi, soja e amendoim. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS DO SOLO, 21., 1987, Campinas. Anais. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1987, p.39.

REIS, V.M.; CRUZ, G.B.; FERREIRA, A.; FERREIRA, M.; FERREIRA, A.C.; REIS, F.B.; RIBEIRO, J.R.A.; SALLES, J.F.; WEBWER, O.B. Produção e caracterização de soros policlonais para a detecção de bactérias diazotróficas. Seropédica: EMBRAPA-CNPAB, 1997. 9p. (EMBRAPA-CNPAB. Documentos, 30).

RIBEIRO, J.R.A. Aplicação da técnica de ELISA no estudo ecológico de *Rhizobium* sp. isolados de nódulos de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) originários da região nordeste brasileira. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1999, 120p. Dissertação de Mestrado.

TEANEY, G.B.; FUHRMANN, J.J. Soybean response to nodulation by bradyrhizobia differing in rhizobitoxine phenotype. *Plant and Soil*, Dordrecht, v.145, n.2, p.275-285, 1992.

THIES, J.E.; SINGLETON, P.W.; BOHLOOL, B. Influence of the size of indigenous rhizobial population on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-crop legumes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.57, n.1, p.19-28, 1991.

VARGAS, M.A.T.; MENDES, I.C.; SUHET, A.R.; PERES, J.R.R. Inoculation of soybean in Cerrado soils with established population of *Bradyrhizobium japonicum*. **Revista Brasileira de Microbiologia**, São Paulo, v.25, n.2, p.245-250, 1994.

WANI, S.P.; RUPELA, O.P.; LEE, K.K. Sustainable agriculture in the semi-arid tropics through biological nitrogen in grain legumes. **Plant and Soil**, Dordrecht, v.174, n.1, p.29-49, 1995.

WOOMER, P.L. Most probable number counts. In: WEAVER, P.W.; ANGLE, J.S.; BOTTOMELY, P.S. (ED). **Methods of soil analysis**. Soil Science Society of American Book, Madison, Wisconsin, 1994, p.59-79.

ZILLI, J.E.; FERREIRA, E.P.B.; NEVES, M.C.P.; RUMJANEK, N.G. Efficiency of fast-growing rhizobia capable of nodulating cowpea. **Anais da Academia Brasileira de Ciência**, Rio de Janeiro, v.71, n.4, p.553-560, 1999.