

RESISTÊNCIA NATURAL À ESTREPTOMICINA E EFICIÊNCIA DE ESTIRPES DE RHIZOBIUM NATIVAS NOS CERRADOS ASSOCIADAS A STYLOSANTHES¹

NADJA M.H. SÁ, MARIA RITA M.L. SCOTTI², MILTON A.T. VARGAS³
e JOHANNA DÖBEREINER⁴

RESUMO - Foram efetuados isolamentos de *Rhizobium* sp nativos nos Cerrados, associados a *Stylosanthes* spp, com o objetivo de estudar a natureza dos fatores que interferem no estabelecimento das estirpes de *Rhizobium* inoculadas, e de avaliar o potencial de fixação de N₂ das estirpes nativas. Dentre 122 estirpes isoladas em solo sob Cerrado cultivado, 35% foram resistentes a concentrações iguais ou superiores a 40 µg/ml, enquanto que apenas 10% dentre 92 estirpes isoladas em solo sob Cerrado virgem apresentaram esse nível de resistência. Esses dados sugerem que modificações ecológicas promovidas pelo cultivo dos Cerrados podem induzir a vantagens competitivas para estirpes de *Rhizobium* sp, resistentes à estreptomicina. Experimentos conduzidos em vasos Leonard com areia e solução nutritiva esterilizada indicaram que cerca de 61% das estirpes isoladas em *S. guianensis* var. *Canescens* e *S. grandifolia* eram pouco ou moderadamente efetivas no hospedeiro homólogo, enquanto que apenas 14% das estirpes apresentaram um nível elevado de fixação do N₂. Esse baixo índice de estirpes eficientes sugere a necessidade de se iniciar um trabalho de seleção de *Rhizobium* sp. adaptado às condições dos Cerrados, visando a produção de inoculantes de alta qualidade para a região.

Termos para indexação: inoculação, nódulos, fatores bióticos, actinomicetos.

SPONTANEOUS STREPTOMYCIN RESISTANCE AND EFFICIENCY OF RHIZOBIUM STRAINS NATIVE IN BRAZILIAN CERRADOS ASSOCIATED WITH STYLOSANTHES

ABSTRACT - *Rhizobium* strains were isolated from nodules of *Stylosanthes* spp. in undisturbed or cultivated Cerrado soils that have never been inoculated, in order to study the nature of the factors that affect establishment of *Rhizobium* strains introduced in these soils, as well as to evaluate the N₂ fixing capacity of the native strains. Streptomycin resistance level of the *Rhizobium* strains were tested in yeast-mannitol-agar plates. Among 122 strains isolated in cultivated Cerrado, 35% were resistant to concentrations equal or above 40 µg/ml, while only 10% within 92 strains isolated in undisturbed Cerrados were resistant to that level. These data suggest that the ecological changes caused by cultivation of virgin savanna land result in competitive advantages for Streptomycin resistant *Rhizobium* strains. Experiments carried out in Leonard jar assemblies with san and sterilized solution indicated that 61% of the strains isolated in *S. guianensis* var. *Canescens* and *S. grandifolia* were low or moderately effective in the homologous host, while only 14% of the strains had a high level of N₂ fixation. This low percentage of efficient strains suggests the necessity of a *Rhizobium* strain selection program adapted to the Cerrado conditions, aiming to obtain high quality inoculant for the Cerrados region.

Index terms: inoculation, nodules, biotic factors, actinomycetes.

INTRODUÇÃO

O emprego de leguminosas em pastagens consorciadas é considerado um dos métodos mais eco-

nômicos para elevar o seu valor nutritivo, sem a necessidade de dispendiosos investimentos com adubos nitrogenados. Nas regiões dos Cerrados, o gênero *Stylosanthes* tem se revelado um dos mais promissores, por diversas razões, tais como: ocorrência generalizada em condições naturais (Costa & Ferreira 1977), adaptação a solos ácidos e pouco férteis, e resistência a seca e a temperaturas elevadas (Buller et al. 1970).

Tem sido observada a ocorrência natural de nódulos em espécies do gênero *Stylosanthes* em solos sob Cerrados; porém, a contribuição destas estirpes nativas em termos de fixação de nitrogênio é des-

- 1 Aceito para publicação em 14 de dezembro de 1982. Trabalho apresentado na 18^a Reunião da Soc. Bras. de Zoot., Goiânia, Goiás, julho de 1981. Pesquisa subvencionada, em parte, pelo CNPq.
- 2 Microbiol., Prof. Univ. Fed. de Minas Gerais, Dep. de Microbiol., CEP 30000 - Belo Horizonte, MG.
- 3 Eng.^o Agr.^o, M.Sc., Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados (CPAC) - EMBRAPA, Caixa Postal 700023, CEP 73300 - Planaltina, DF.
- 4 Eng.^a Agr.^a, Ph.D., Programa de Fixação do Nitrogênio, SNLCS, km 47, CEP 23460 - Seropédica, RJ.

conhecida. Vargas et al.⁵ efetuaram a avaliação da atividade da nitrogenase em 400 nódulos individuais de *S. scabra*, *S. macrocephala* e *S. capitata*, semeados sem inoculação em solos sob Cerrados, e concluíram que toda a população nativa de *Rhizobium* sp., capaz de nodular essas espécies, era simbioticamente ativa. No mesmo trabalho foi detectada a atividade de nitrogenase em 23 *Stylosanthes* cultivados em condições de campo, sem o uso de inoculantes, sendo que apenas em *S. macrocephala* e *S. capitata* o nível dessa atividade foi considerado baixo.

Por outro lado, não há informações conclusivas sobre os benefícios da inoculação de *Stylosanthes* em solos sob Cerrados. Vargas & Suhet (1981) não obtiveram nenhum efeito com a inoculação de *S. macrocephala* e *S. capitata*, em um experimento de campo conduzido em um Latossolo Vermelho-Amarelo sob Cerrado. Problemas de nodulação e efeito negativo na inoculação de *S. guianensis* com estirpes do grupo "Cowpea" foram detectados por Franco & Döbereiner (1971) e Souto et al. (1972).

Um dos fatores que podem interferir no estabelecimento de leguminosas é a presença de uma microflora antagônica ao *Rhizobium* (Foo & Varma 1976, Hattlingh & Louw 1966, Hely et al. 1957, Visona & Tardieux 1964). Como integrantes desta microflora antagônica, os actinomicetos e as bactérias podem retardar ou impedir a nodulação de leguminosas "in vitro", bem como interferir no crescimento e competição do *Rhizobium* na rizosfera (Schwinghamer 1967, Visona & Tardieux 1964, Wieringa 1963). Em solos sob Cerrado, a população de actinomicetos, especialmente as do gênero *Streptomyces*, produtores de antibióticos, é cerca de 75 a 94% da microflora total (Coelho & Drozdowicz 1979). Estes microorganismos, portanto, poderiam desempenhar um importante papel no equilíbrio microbiano desses solos.

Neste trabalho objetivou-se uma valiação da eficiência de estirpes de *Rhizobium* nativas nos Cerrados, associadas a algumas espécies de *Stylosanthes*. Foi proposto também um estudo da resistência destas estirpes à estreptomomicina, visando a uma melhor compreensão de alguns fatores que podem

interferir no processo de nodulação e fixação de nitrogênio desta leguminosa em solos sob Cerrados.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram obtidas 238 estirpes de *Rhizobium* a partir de nódulos frescos de quatro espécies de *Stylosanthes*: *S. guianensis*, variedade *Canescens*; *S. guianensis* (CPAC 280, CPAC 337, CPAC 213 e CPAC 135), *S. grandifolia* e *S. macrocephala*. Estas leguminosas foram coletadas em regiões de Cerrados cultivados próximo a Sete Lagoas, MG e em regiões de Cerrado virgem próximo a Brasília, DF, e Uberaba, MG. Em nenhuma dessas áreas as leguminosas foram inoculadas. Os nódulos foram coletados em plantas jovens, na parte superior das raízes (camada de 0 a 20 cm). A técnica utilizada para o isolamento das estirpes foi uma adaptação do método de Vincent (1970), sendo o tempo de desinfecção em HgCl₂ reduzido para dois e quatro minutos, dado o pequeno tamanho dos nódulos. Estes foram esmagados diretamente em placas-de-petri, contendo o meio de crescimento agar-manitol-extrato de levedura (Fred & Waksman 1928).

Testes preliminares com este meio em pH, variando de 3,5 a 7,0 indicaram o nível de pH 5,5 como o mais favorável para os isolamentos. Foram utilizadas, para o ajuste do pH, a solução-tampão McIlvaine (Fosfato-dissódico-ácido cítrico), pH 3,5 a 5,0 e a solução-tampão de Sörensen (Na₂HPO₄-KH₂PO₄), pH 5,5 a 7,0. As culturas obtidas foram caracterizadas como pertencentes ao gênero *Rhizobium*, utilizando-se *Macroptilium atropurpureum* cv. Siratro como hospedeiro, cultivado em tubos de ensaio em meio de cultura, segundo Jensen (1942).

A eficiência de fixação de nitrogênio de 57 estirpes isoladas, a partir de *S. guianensis*, e de 48 estirpes isoladas, a partir de *S. grandifolia*, foi determinada com o hospedeiro homólogo em experimentos conduzidos em vasos Leonard contendo uma mistura de vermiculita e areia na proporção 2:1 (v/v) e solução nutritiva isenta de nitrogênio (Norris 1964). Os inoculos bacterianos foram padronizados para a mesma densidade ótica no final da fase logarítmica de crescimento, na faixa de 100 a 120 unidades Klett.

Foi incluído um tratamento com N mineral, sendo adicionados 10 ml/vaso de uma solução, 0,04M de NH₄NO₃, no momento da inoculação. Novas aplicações de nitrogênio (1 ml da mesma solução) foram adicionadas semanalmente.

A colheita foi efetuada 90 dias após o plantio. As plantas foram secas em estufa a 65°C, por 48 horas, (para determinação do peso da matéria seca. As estirpes foram agrupadas em cinco classes, baseadas em sua produção de matéria seca, em relação ao controle nitrogenado: de 0 a 30% inefetiva; de 31 a 60%, pouco efetiva; de 61 a 90% moderadamente efetiva; de 91 a 120%, efetiva; e > 121%, altamente efetiva.

As 122 estirpes provenientes de regiões de Cerrado

⁵ Comunicação pessoal.

com solo cultivado e as 92 provenientes de solo de Cerrado virgem, além de oito estirpes comerciais recomendadas para *Stylosanthes*, foram testadas quanto à sua sensibilidade à estreptomicina, pelo método de diluição em placa (Ericsson & Sherris 1971). Foram utilizados diferentes níveis do antibiótico, esterilizado por filtração, e adicionado ao meio de crescimento do *Rhizobium*, após sua autoclavagem e resfriamento, à temperatura de 45°C. O pH final foi corrigido para 6,8 a 6,9 (Eagle et al. 1952).

As placas foram conservadas a 4°C por um período máximo de 48 horas antes do uso. As estirpes a serem testadas foram desenvolvidas em meio líquido e, no final da fase logarítmica, a densidade ótica do meio era padronizada para 100 a 120 unidades Klett (faixa determinada previamente como a mais adequada para garantir a reprodutividade dos resultados, conforme Ericsson & Sherris 1971).

A semeadura do inóculo bacteriano foi efetuada mergulhando-se cotonetes esterilizados na suspensão bacteriana e semeando-se numa faixa de 3 a 4 cm do meio de cultura sólido. Após a incubação a 29°C por três a quatro dias, foi efetuada a leitura com base no crescimento do controle sem estreptomicina. A estirpe era considerada tolerante ao nível testado, quando as dimensões da cultura eram semelhantes às da cultura riscada na placa sem antibiótico. O nível de resistência à estreptomicina foi definido na concentração máxima do antibiótico, quando se detectava crescimento bacteriano total.

Para comprovação do efeito da calagem na seleção de estirpes resistentes à estreptomicina, foi conduzido um experimento em vaso de 3 litros, com dois solos coletados sob Cerrado virgem, submetidos aos tratamentos com e sem calagem (1 g CaCO₃/kg de solo). O pH dos solos, originalmente em 4,4 e 5,0, foi elevado para 5,1 e 5,8, respectivamente. Trinta dias após a adição do CaCO₃, o *S. guianensis* (CPAC 135) foi semeado sem inoculação. Foram isoladas 24 estirpes e testadas quanto à resistência à estreptomicina, conforme técnicas descritas anteriormente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Fig. 1 mostra a distribuição, em intervalos de classe, da eficiência em fixar N₂ das estirpes, tomando-se como parâmetro de classificação sua produção de matéria seca, em relação a plantas que receberam adubação nitrogenada. As estirpes de *Stylosanthes grandifolia* isoladas e inoculadas no hospedeiro homólogo apresentaram uma distribuição aproximadamente normal com a moda situada na faixa de 61 a 90% de eficiência, enquanto que as estirpes de *S. guianensis* apresentaram uma distribuição assimétrica.

Apenas 35% das estirpes de *S. grandifolia* fo-

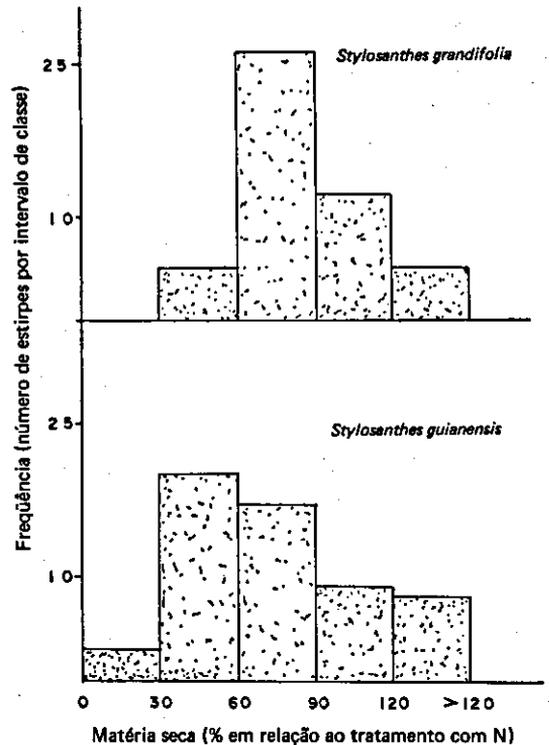


FIG. 1. Distribuição das frequências de 105 estirpes de *Rhizobium* sp. isoladas em *Stylosanthes grandifolia* e *S. guianensis*, inoculadas em vasos-leonard, no hospedeiro homólogo.

ram classificadas como efetivas ou muito efetivas (rendimento de matéria seca igual ou superior a 90% do obtido com a adubação nitrogenada), enquanto que, no *S. guianensis*, apenas 30% das estirpes receberam essa classificação. Esses dados mostram a grande variabilidade em eficiência das estirpes nativas de *Rhizobium* sp. e a alta porcentagem de estirpes com média ou pouca eficiência em fixar N₂.

Vários autores têm mencionado a ocorrência de nódulos efetivos em plantas de *Stylosanthes* spp. não inoculadas em solos da África (Adegbola & Onayinka 1966, Horrel & Court 1965), Ásia (Chandapillai 1972) e nos Cerrados do Brasil (Vargas & Suhet 1981). Contudo, tais trabalhos não quantificam a capacidade de fixar N₂ das estirpes nativas desses solos.

A inoculação de leguminosas é uma prática es-

sencial, quando inexistem no solo estirpes de *Rhizobium* capazes de promover uma simbiose eficiente. Por outro lado, a simples inoculação não garante a introdução de uma estirpe eficiente. Vargas & Suhet (1981) não observaram resposta à inoculação de *Stylosanthes* spp. em solos sob Cerrados, com a utilização de estirpes comerciais reconhecidas eficientes em outros solos. Resultados semelhantes foram obtidos por Vargas et al. (1979) em um solo aluvial do Espírito Santo.

O insucesso da inoculação com estirpes comerciais pode ser atribuído à competição com a população nativa pelos sítios de infecção nodular (Graham & Hubbell 1975). Fatores bióticos ou abióticos podem também interferir na multiplicação e estabelecimento, no solo, das estirpes introduzidas através da inoculação das sementes. Esses fatores assumem importância relevante, quando se conduz um trabalho de seleção de estirpes visando a produção de inoculantes comerciais.

Outra variável a ser considerada, antes que uma estirpe tenha seu uso recomendado, é a sua capacidade de formar associações simbióticas com o maior número possível de hospedeiros. Estudos desenvolvidos por vários autores têm observado acentuado grau de especificidade dentro do gênero *Stylosanthes* (Norris & Mannetje 1964, Mannetje 1969). Entretanto, Graham & Hubbell (1975) fazem distinção entre a especificidade como uma propriedade genética dos simbiontes e a especificidade determinada por fatores ambientais, tanto químicos quanto bióticos. Dentre os fatores químicos, o pH assume importância como limitante da multiplicação de *Rhizobium*, especialmente em solos ácidos como os sob Cerrados.

Já entre os fatores bióticos, podemos destacar a competição microbiana com antagonistas, como os actinomicetos - produtores naturais de antibióticos (Hely et al. 1957, Thornton 1956, Patel & Brown 1969). A resistência à estreptomicina parece ser uma vantagem competitiva para o *Rhizobium japonicum* na introdução da soja em solos sob Cerrados (Scotti et al. 1980).

Pode-se observar, na Fig. 2, que as estirpes isoladas em *Stylosanthes* spp. provenientes de solos sob Cerrado virgem mostraram uma distribuição aproximadamente normal de resistência à estreptomi-

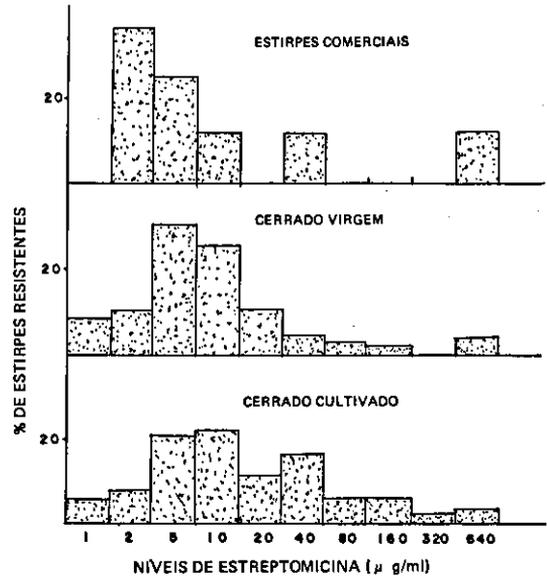


FIG. 2. Resistência à estreptomicina de estirpes de *Rhizobium* sp. Os dados estão apresentados em relação à percentagem total de 8 estirpes comerciais provenientes de Cali-Colômbia (CIAT), do Rio de Janeiro-Brasil (km 47), da Rodésia, de 92 estirpes isoladas em *Stylosanthes guianensis*, *S. grandifolia* e *S. bracteata*, coletados em Cerrado virgem; e de 122 estirpes isoladas em *S. guianensis* e *S. grandifolia*, coletados em Cerrado cultivado.

cina, com uma maior frequência nos níveis de 5 a 10 µg/ml do antibiótico. Porém as estirpes provenientes de solos sob Cerrado cultivados mostraram uma distribuição bimodal, com um pico na mesma faixa de 5 a 10 µg/ml de estreptomicina e outro pico na faixa de 40 µg/ml do antibiótico.

A maioria das estirpes comerciais de *Rhizobium* sp., indicadas para o gênero *Stylosanthes*, quando testadas frente a estreptomicina apresentaram uma resistência ao antibiótico entre os níveis de 2,5 a 5,0 µg/ml. No experimento conduzido em vasos, as estirpes isoladas em solo que recebeu calagem apresentaram maior resistência à estreptomicina do que as isoladas nos vasos que não receberam esse tratamento (Fig. 3).

A elevação do pH do solo corrigido com calagem favorece à proliferação de actinomicetos (Alexander 1965). Em solos virgens sob Cerrado, que receberam calcário, foi observada elevação da

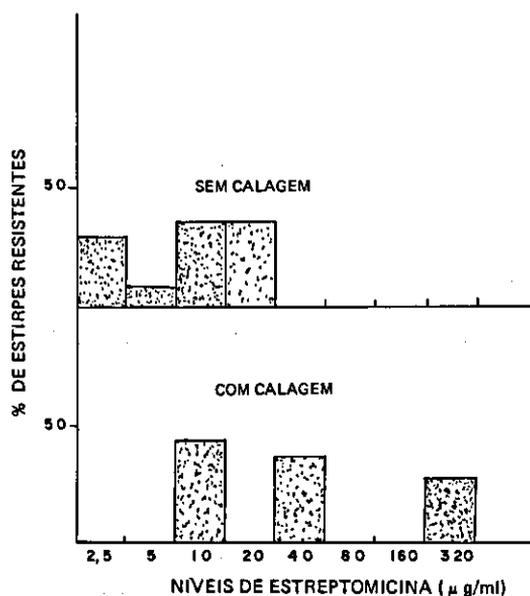


FIG. 3. Resistência, à estreptomicina, 24 estirpes de *Rhizobium* sp. isoladas em *Stylosanthes guianensis*, cultivadas em solos sem calagem e em solos submetidos a 1 g de CaCO_3 por kg de solo.

população de *Streptomyces* spp. (Coelho & Drozdowicz 1979). O aumento do pH do solo favorece tanto à atividade antibiótica do solo, como também à atividade da própria estreptomicina, que aumenta com a elevação do meio de cultura (Eagle et al. 1952, Wiering 1963).

Essa atividade antibiótica parece ocorrer especialmente na rizosfera, onde a população microbiana, principalmente de actinomicetos, é muito elevada. Isso foi comprovado na rizosfera de leguminosas (Brown 1961) e de cereais (Dobereiner & Baldani 1979), onde foi detectada uma proporção mais elevada de bactérias resistentes à estreptomicina, em relação a outras regiões do solo. Estas observações sugerem que o cultivo do solo pode acarretar um desequilíbrio microbiológico, especialmente na rizosfera, onde pode ocorrer o aparecimento de nichos ou sítios de acúmulo de antibiótico, nos quais se estabeleceriam estirpes de *Rhizobium* com alta resistência a antibióticos.

CONCLUSÕES

1. A predominância, nos solos sob Cerrados, de estirpes nativas de *Rhizobium* sp., com baixa capacidade de fixar nitrogênio, sugere a necessidade de um trabalho de seleção, a partir desta população do solo, visando a obtenção de estirpes já adaptadas, mas eficientes em fixar N_2 nos solos sob Cerrados.

2. Elevações do pH, produzidas pela calagem e cultivo do solo, parecem acarretar modificações ecológicas, favorecendo o aparecimento de estirpes de *Rhizobium* sp. resistentes à estreptomicina.

REFERÊNCIAS

- ADEGBOLA, A.A. & ONAYINKA, B. Some observations on the responses of *Stylosanthes gracilis* to seed inoculation. *Niger. Agric. J.*, 3:35-8, 1966.
- ALEXANDER, M. *Introduction to soil microbiology*. New York, John Wiley, 1965.
- BROWN, M.E. Stimulation of streptomycin resistance bacteria in the rhizosphere of leguminous plants. *J. Gen. Microbiol.*, 24:367-9, 1961.
- BULLER, R.E.; ARONOVICH, S.; QUINN, L.R. & HOFF, W.V.A.B. Performance of tropical legumes in the upland savanna of Central-Brazil. In: INT GRASSLD. CONF., 11, Surfers Paradies, 1970. *Proceedings...* p.143-6.
- CHANDAPILLAI, M.M. Studies on the nodulation of *Stylosanthes guianensis* Aubl. I. Effect of added organic matter in four types of Malaysian soil. *Trop. Agric., Trinidad*, 49(3):205-13, 1972.
- COELHO, R.R.R. & DROZDOWICZ, A. The occurrence of actinomycetes in a Cerrado soil in Brazil. *Rev. Ecol. Biol. Sol.*, 15:459-73, 1979.
- COSTA, N.M.S. & FERREIRA, M.B. O gênero *Stylosanthes* no Estado de Minas Gerais. Belo Horizonte, EPAMIG, 1977. 38p.
- DÖBEREINER, J. & BALDANI, V.L.D. Selective infection of maize roots by streptomycin resistant *Azospirillum lipoferum* and other bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 25:1264-9, 1979.
- EAGLE, H.; LEVY, M. & FLEISCHMAN, R. The effect of pH of the medium on the antibacterial action of penicillin, streptomycin, chloramphenicol, terramycin and bacitracin. *Antibiot. Chemother.*, 11:563-74, 1952.
- ERICSSON, H.M. & SHERRIS, J.C. Antibiotics sensitivity testing. Report of an international collaborative study. *Acta Path. Microbiol. Stand (B)* 217:1-9, 1971. Suppl.
- FOO, E.L. & VARMA, A.K. Inhibitory effect of streptomycin antibiotics and other microorganisms on *Rhizobium*. *Folia microbiol.*, 21:315-9, 1976.

- FRANCO, A.A. & DOBEREINER, J. Eficácia da nodulação natural de cinco leguminosas forrageiras tropicais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 12, Curitiba, 1969. Anais . . . Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Equipe de Pedologia e Fertilidade do Solo, 1971. p.35-6.
- FRED, E.B. & WAKSMAN, S. Laboratory manual of general microbiology. New York, McGraw Hill, 1928.
- GRAHAM, P.H. & HUBBELL, O.H. Legume *Rhizobium* relationships in tropical agriculture. Las Vegas, Dall and Note, 1975. (Am. Soc. Agron. Special Publication, 24).
- HATTINGH, M.J. & LOUW, H.A. The antagonistic effects of soil microorganisms isolated from the root region of clovers on *Rhizobium trifolium*. S. African J. Agric. Sci., 9:239-52, 1966.
- HELY, F.W.; BERGERSEN, F.J. & BROCKWELL, J. Microbial antagonism in the rhizosphere as a factor in the failure of inoculation on subterranean clover. Aust. J. Agric. Res., 8(1):24-44, 1957.
- HORREL, C.R. & COURT, M.N. Effect of the legume *Stylosanthes gracilis* on pasture yields at Serere, Uganda. J. Br. Grassl. Soc., 20:72-6, 1965.
- JENSEN, H.L. Nitrogen fixation in leguminous plants. I. General characters of root-nodule bacteria isolated from species of *Medicago* and *trifolium* in Australia. Proc. Linn. Soc. N.S.W., 66:98-108, 1942.
- MANNETJE, L. t'. *Rhizobium* affinities and phenetic relationships within the genus *Stylosanthes*. Aust. J. Bot., 17:553-64, 1969.
- NORRIS, D.O. Techniques used in work *Rhizobium*. In: SOME concepts and methods in sub-tropical pasture research. London, Farnham Royal Bucks Com. Agric. Bur., 1964. p.186-98.
- NORRIS, D.O. & MANNETJE, L. t'. The symbiotic specialization of African trifolium species in relation to their taxonomy and their agronomic use. East. Afr. Agric. For. J., 29:214-35, 1964.
- PATEL, J.J. & BROWN, M.E. Interactions of azotobacter with rhizosphere and root surface microflora. Plant Soil, 31:273-81, 1969.
- SCOTTI, M.R.M.L.; SÁ, N.M.H.; VARGAS, M.A.T. & DÖBEREINER, J. Requirement for streptomycin resistance of *Rhizobium* for the nodulation of legumes in Cerrado Regions. An. Acad. Brasil. Cienc., 52(3):650-1, 1980.
- SCHWINGHAMER, E.A. Effectiveness of *Rhizobium* as modified by mutation for resistance to antibiotics. Antonie van Leuvenhock, 33(12):121-36, 1967.
- SOUTO, S.M.; COSER, A.V. & DÖBEREINER, J. Especificidade de uma variedade nativa de alfafa do Nordeste (*Stylosanthes gracilis*) na simbiose com *Rhizobium* sp. Pesq. agropec. bras., Sér. Zootec., 7:1-5, 1972.
- THORNTON, H.G. The ecology of microorganisms in soil. Proc. Roy. Soc., Série B., London, 145:364-74, 1956.
- VARGAS, A.A.T.; DESSAUNE FILHO, N. & ZANGRANDE, M.B. Avaliação da necessidade de inoculação de cinco leguminosas em solo aluvial do Espírito Santo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA. 31., Fortaleza, CE. 1979. Anais . . . São Paulo, SBPC, 1979. p.518-9.
- VARGAS, M.A.T. & SUHET, A.R. Eficiência de inoculantes comerciais e de estirpes nativas de *Rhizobium* para seis leguminosas forrageiras em solo de Cerrado. Pesq. agrop. bras., 16(3):357-62, 1981.
- VINCENT, J.M. A manual for the practical study at root-nodule bacteria. Oxford, Blackwell Sci., 1970. 164p.
- VISONA L. & TARDIEUX, P. Antagonistes de *Rhizobium* dans la rhizosphère dy trèfle et de la luzerne. Ann. Inst. Pasteur., Paris, 107:297-302, 1964.
- WIERINGA, K.T. Organismes isolés du sol des Apennins, producteurs d'antibiotiques envers diverses sources de *Rhizobium*. Ann. Inst. Pasteur., 105:417-25, 1963.