AVALIAÇÃO DE GENÓTIPOS DE SOJA [*Glycine max*(L.) Merrill] E DE
ESTIRPES DE *Bradyrhizobium japonicum* PARA EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA

LYGIA VITÓRIA GALLI

ORIENTADOR: Prof.^a Dr.^a Aline A. Pizzirani-Kleiner

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Dezembro de 1987

G168

Galli, Lygia Vitória

Avaliação de genótipos de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] e de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* para eficiência simbiótica. Piracicaba, 1987.
137p. ilustr.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia

1. Soja - Fixação biológica do nitrogênio.
I. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba.

CDD 633.34

A memória do

meu pai, *João Victor Galli*,

D E D I C O

A

Leila, minha mãe,

pelo seu exemplo de força e coragem

Luiz Felipe, meu irmão e

Haydeê, minha tia,

O F E R E Ç O

AGRADECIMENTOS

- À *Dr.^a Aline Aparecida Pizzirani-Kleiner*, pela orientação, apoio e amizade.
- Ao *Dr. Natal Antonio Vello*, pela co-orientação e atenção dispensada em todos os momentos.
- À *Dr.^a Siu Mui Tsai Saito*, por sua inestimável colaboração no desenvolvimento da pesquisa, compreensão e grande amizade, meu agradecimento especial.
- Ao *Dr. Cássio Roberto de Melo Godoi*, pela elaboração, execução e auxílio na utilização do sistema de análise multidimensional.
- À *Dr.^a Elma Suassuna de Oliveira*, *Dr. Juarez Gabardo* e *Dr. Mário Portugal Pederneiras*, da UFPR, pelo estímulo e amizade.
- À *Amália Baraibar* e *José Villamil*, *Eleonora C. Rodrigues*, *Ingrid B.I. Barros*, *Maria Amélia da Silva*, *Maria Salete Zanchet*, *Regina T.R. Monteiro* e *Vera Lúcia M. Romani*, meus amigos de todas as horas.
- Aos colegas do Setor de Genética Aplicada às Espécies Autôgenas.
- Aos colegas do CENA, *Roberto Bonetti* e *Paulo Marcos da Silva*, pela colaboração e amizade.
- Aos funcionários de campo do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP, representados pelos Srs. *Rui Celso Ribeiro* e *Antonio Roberto Cogo*.
- Aos funcionários do Laboratório de Genética de Microrganismos da ESALQ/USP, através do Sr. *Antonio Rocha Campos*.
- Aos funcionários da Seção de Microbiologia do Solo (CENA/USP), *Eliane Zaidan Silvestre*, Sr. *Mário Bizetto*, e especialmente ao *Francisco Carlos Montrazzi*.

.iii.

- Ao *CIAGRI/USP*, sobretudo ao *Gabriel Adrián Sarriés* e *Marcelo Zacarias da Silva*.
- A *Nilse T.P. Sigríst*, bibliotecária do Departamento de Genética, pelas revisão das fichas bibliográficas.
- Ao *Cleusval Bissi*, por sua dedicação e competência no trabalho datilográfico.
- Ao *CNPq* e à *FAPESP*, pela concessão da bolsa de estudos durante o curso.

A AUTORA

S U M Á R I O

	<u>Página</u>
RESUMO	xíiii
SUMMARY	xvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.	3
2.1. Influência genotípica do hospedeiro na fixação biológica do N ₂	3
2.1.1. Programas de melhoramento e metodologia de avaliação da eficiência simbiótica	7
2.1.2. Influência do grupo de maturação na simbiose em soja.	11
2.2. Ação da bactéria na eficiência da fixação do N ₂	12
2.2.1. Padrão de nodulação e eficiência simbiótica.	15
2.2.2. Padrão de eficiência de estirpes e isolados.	19
2.3. Interação entre macro e microssimbiontes.	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.	25
3.1. Estirpes de <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	25
3.2. Genótipos de soja.	25
3.3. Meios de cultura e soluções utilizadas.	28

	<u>Página</u>
3.4. Esterilização de sementes	30
3.5. Inoculantes	30
3.6. Avaliação genotípica do hospedeiro na nodu- lação da soja.	30
3.7. Avaliação da eficiência simbiótica de estir- pes de <i>B. japonicum</i>	38
3.8. Avaliação da interação entre isolados da es- tirpe SEMIA-587 e genótipos de soja	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.	44
4.1. Avaliação genotípica do hospedeiro na nodu- lação da soja	44
4.2. Eficiência simbiótica das estirpes de <i>B. ja- ponicum</i>	64
4.2.1. Padrão de nodulação: atividade e ta- manho.	71
4.3. Interação simbiótica entre isolados da estir- pe SEMIA-587 e genótipos de soja.	78
4.3.1. Ação da seleção para os isolados da SEMIA-587 e para os genótipos de soja.	82
4.3.2. Ação da SEMIA-587 e seus isolados nos genótipos selecionados de soja.	98
4.3.3. Resposta dos genótipos precoces e tar- dios de soja à inoculação dos isola- dos da SEMIA-587	99
5. CONCLUSÕES	108
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

LISTA DAS FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
1 - Mapa de campo dos experimentos Precoce e Tardio, em soja, com dois blocos divididos em conjuntos experimentais. As testemunhas-comuns intercalam os genótipos avaliados em cada conjunto.	32
2 - Discriminação gráfica dos 68 tratamentos correspondentes aos genótipos precoces de soja submetidos à análise multidimensional (variáveis de número e peso dos nódulos, atividade da nitrogenase e produtividade).	61
3 - Discriminação gráfica dos 22 tratamentos correspondentes aos genótipos tardios de soja submetidos à análise multidimensional (variáveis dependentes: número e peso de nódulos, atividade da nitrogenase e produtividade. . .	62
4 - Padrão de atividade (μmol de $\text{C}_2\text{H}_4/\text{mg.nódulo.hora}$) e tamanho (mg/nódulo) de 60 nódulos individuais da estirpe SEMIA-587 de <i>B. japonicum</i> inoculada nos genótipos de soja Bossier (precoce) e IAC-9 (tardio).	72
5 - Padrão de atividade (μmol de $\text{C}_2\text{H}_4/\text{mg.nódulo.hora}$) e tamanho (mg/nódulo) de 60 nódulos individuais da estirpe SEMIA-5019 de <i>B. japonicum</i> inoculada nos genótipos de soja Bossier (precoce) e IAC-9 (tardio).	73
6 - Padrão de atividade (μmol de $\text{C}_2\text{H}_4/\text{mg.nódulo.hora}$) e tamanho (mg/nódulo) de 60 nódulos individuais da estirpe CB-1809 de <i>B. japonicum</i> inoculada nos genótipos de soja Bossier (precoce) e IAC-9 (tardio).	74

FiguraPágina

7 - Ação da seleção para os isolados da estirpe SEMIA-587 de <i>B. japonicum</i> (a e b) e para os genótipos precoces (c) e tardios (d) de soja, relativa ao peso de nódulos (mg/pl.).	83
8 - Ação da seleção para os isolados da estirpe SEMIA-587 de <i>B. japonicum</i> (a e b) e para os genótipos precoces (c) e tardios (d) de soja, relativa ao número de nódulos (nº/planta). . .	84
9 - Ação da seleção para os isolados da estirpe SEMIA-587 de <i>B. japonicum</i> (a e b) e para os genótipos precoces (c) e tardios (d) de soja, relativa ao tamanho dos nódulos (mg/nódulos).	85
10 - Ação da seleção para os isolados da estirpe SEMIA-587 de <i>B. japonicum</i> (a e b) e para os genótipos precoces (c) e tardios (d) de soja, relativa a ARA ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{planta.hora}$).	86
11 - Ação da seleção para os isolados da estirpe SEMIA-587 de <i>B. japonicum</i> (a e b) e para os genótipos precoces (c) e tardios (d) de soja, relativa ao peso da parte aérea (mg/planta).. . . .	87
12 - Ação da seleção para os isolados da estirpe SEMIA-587 de <i>B. japonicum</i> (a e b) e para os genótipos precoces (c) e tardios (d) de soja, relativa ao N-total (mg/planta).	88
13 - Ação da estirpe SEMIA-587 de <i>B. japonicum</i> e seus isolados em genótipos precoces (a) e tardios (b) de soja, relativa ao peso de nódulos.	92
14 - Ação da estirpe SEMIA-587 de <i>B. japonicum</i> e seus isolados em genótipos precoces (a) e tardios (b) de soja, relativa ao número de nódulos.	93

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
15 - Ação da estirpe SEMIA-587 de <i>B. japonicum</i> e seus isolados em genótipos precoces (a) e tardios (b) de soja, relativa ao tamanho dos nódulos.	94
16 - Ação da estirpe SEMIA-587 de <i>B. japonicum</i> e seus isolados em genótipos precoces (a) e tardios (b) de soja relativa a ARA ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{planta.hora}$)	95
17 - Ação da estirpe SEMIA-587 de <i>B. japonicum</i> e seus isolados em genótipos precoces (a) e tardios (b) de soja, relativa ao peso da parte aérea (g/planta).	96
18 - Ação da estirpe SEMIA-587 de <i>B. japonicum</i> e seus isolados em genótipos precoces (a) e tardios (b) de soja, relativa ao N-total (mg/planta).	97
19 - Resposta dos genótipos selecionados de soja (precoces e tardios) a inoculação dos isolados I e II (a); III e IV (b) da estirpe SEMIA-587, de <i>B. japonicum</i> , relativa ao peso de nódulos (mg/planta).	101
20 - Resposta dos genótipos selecionados de soja (precoces e tardios) à inoculação dos isolados I e II (a); III e IV (b) da estirpe SEMIA-587, de <i>B. japonicum</i> relativa ao número de nódulos (nº/planta).	102
21 - Resposta dos genótipos selecionados de soja (precoces e tardios) à inoculação dos isolados I e II (a); III e IV (b) da estirpe SEMIA-587, de <i>B. japonicum</i> relativa ao tamanho dos nódulos (mg/nódulo).	103

FiguraPágina

- 22 - Resposta dos genótipos selecionados de soja (precoces e tardios) a inoculação dos isolados I e II (a); III e IV (b) da estirpe SEMIA-587, de *B. japonicum* relativa a ARA (μmol de $\text{C}_2\text{H}_4/\text{planta.hora}$). 104
- 23 - Resposta dos genótipos selecionados de soja (precoces e tardios) à inoculação dos isolados I e II (a); III e IV (b) da estirpe SEMIA-587, de *B. japonicum* relativo ao peso da parte aérea (g/planta). 105
- 24 - Resposta dos genótipos selecionados de soja (precoces e tardios) à inoculação dos isolados I e II (a); III e IV (b) da estirpe SEMIA-587, de *B. japonicum* relativo ao N-total (mg/planta). 106

LISTA DAS TABELAS

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
1 - Relação dos 68 genótipos precoces de soja. . .	26
2 - Relação dos 22 genótipos tardios de soja. . .	27
3 - Esperança dos quadrados médios para a análise da variância dos conjuntos experimentais. . .	37
4 - Análise de variância para testemunhas comuns do grupo precoce. Avaliação de caracteres de nodulação e produtividade. Delineamento de blocos casualizados com tratamentos organizados em conjuntos experimentais. Soja, Piracicaba, 1984/85.	45
5 - Análise da variância para testemunhas comuns do grupo tardio. Avaliação de caracteres de nodulação e produtividade. Delineamento de blocos casualizados com tratamentos organizados em conjuntos experimentais. Soja, Piracicaba, 1984/85.	46
6 - Médias e amplitude de variação de 69 genótipos precoces e 22 tardios avaliados em campo para caracteres de nodulação e produtividade. Soja, Piracicaba, 1984/85.	48
7 - Avaliação em campo dos 68 genótipos precoces de soja, inoculados com a mistura das estirpes SEMIA-5019, SEMIA-587 e CB-1809. Caracteres de nodulação. (Média de duas repetições). Piracicaba, 1984/85.	49

TabelaPágina

8 - Avaliação em campo dos 22 genótipos tardios de soja inoculados com a mistura das estirpes SEMIA-5019, SEMIA-587 e CB-1809. Caracteres de nodulação. (Média de duas repetições). Piracicaba, 1984/85.	50
9 - Produtividade dos 68 genótipos precoces de soja. Piracicaba, 1984/85.	51
10 - Produtividade dos 22 genótipos tardios de soja. Piracicaba, 1984/85.	52
11 - Análise da variância para os caracteres de nodulação e produtividade dos genótipos precoces e tardios. Soja, Piracicaba, 1984/85.	57
12 - Valores de correlação residual obtidos pela associação entre caracteres de nodulação e produtividade para os genótipos precoces e tardios de soja. Piracicaba, 1984/85.	58
13 - Valores médios de nodulação e parte aérea das 3 estirpes de <i>B. japonicum</i> e dos genótipos representantes dos grupos precoce (Bossier) e tardio (IAC-9) em casa de vegetação, 60 dias após o plantio. Piracicaba, 1986.	65
14 - Eficiência simbiótica de 3 estirpes de <i>B. japonicum</i> inoculadas nos genótipos de soja Bossier (precoce) e IAC-9 (tardio) crescidos em casa de vegetação, aos 60 dias após o plantio. I- Caracteres da parte aérea (média de quatro repetições).	66
15 - Eficiência simbiótica de 3 estirpes de <i>B. japonicum</i> inoculados nos genótipos de soja Bossier (precoce) e IAC-9 (tardio), crescidos em casa de vegetação, aos 60 dias após o plantio. II- Caracteres de nodulação. (Média de quatro repetições).	67

TabelaPágina

16 - Atividade da nitrogenase absoluta e específica das 3 estirpes de <i>B. japonicum</i> inoculadas nos grupos precoce (Bossier) e tardio (IAC-9) de soja, 60 dias após plantio. Piracicaba, 1986.	70
17 - Análise da variância para os caracteres de nodulação e rendimento da parte aérea referente à interação entre isolados da estirpe SEMIA-587 (B) e genótipo de soja (G), dos grupos Precoce e Tardio. Casa de Vegetação, Piracicaba, 1986.	80
18 - Análise multidimensional (variáveis de número, peso de nódulo, atividade da nitrogenase (ARA), peso da parte aérea e N-total) para interação entre isolados da SEMIA-587 (B) e genótipos de soja (G). Piracicaba, 1986. . . .	81

AVALIAÇÃO DE GENÓTIPOS DE SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill) E DE ESTIRPES DE *Bradyrhizobium japonicum* PARA EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA

Autor: Lygia Vitoria Galli

Orientador: Prof.^a Dr.^a Aline A. Pizzirani-Kleiner

RESUMO

O presente trabalho foi desenvolvido em três etapas experimentais. A primeira consistiu da avaliação, em campo de 90 genótipos de soja, sendo 68 pertencentes ao grupo de maturação precoce e 22 ao grupo tardio, quanto à variação na capacidade de nodulação da planta hospedeira. A inoculação dos genótipos foi feita com a mistura de três estirpes de *B. japonicum*: SEMIA-587, SEMIA-5019 e CB-1809. Os caracteres avaliados foram número e peso de nódulos, atividade da nitrificação (ARA) e produtividade. O tratamento estatístico dos dados incluiu a análise multidimensional. Os resultados revelaram diferenças genotípicas entre os materiais testados, indicando o potencial genético da leguminosa para a fixação do N₂. Não foi detectada correlação entre dados de nodulação e produtividade.

A segunda etapa experimental foi conduzida em casa de vegetação com o objetivo de avaliar a resposta da

bactéria dentro e entre as três estirpes de *B. japonicum*, inoculadas separadamente no genótipo Bossier (precoce) e IAC-9 (tardio). Os dados foram agrupados em classes de frequência da ARA e do tamanho de 60 nódulos individuais. Os resultados mostraram comportamentos diferenciais dentro das estirpes para ambos os caracteres avaliados, atribuídos à variação genética intrínseca da estirpe. A CB-1809 apresentou curva de distribuição normal, ao passo que a SEMIA-587 e SEMIA-5019 inoculadas no genótipo Bossier expressaram alta frequência de nódulos com baixa atividade, mas de grande tamanho, no período de florescimento. Isto indicou que o grupo de maturação a que pertence o genótipo poderia estar influenciando no ciclo de nodulação da estirpe.

A última etapa, também conduzida em casa de vegetação, constou do estudo da interação entre dois isolados da estirpe SEMIA-587 e três genótipos selecionados em campo (Bossier, Planalto e SOC 81-76, do grupo precoce e IAC-9, Tropical e GO 79-1084, do grupo tardio). Foi avaliada a nodulação (número, peso e tamanho de nódulos e ARA) e rendimento da planta (peso da parte aérea e N-total). A ausência de interação significativa entre os tratamentos permitiu o estudo da ação independente da bactéria e da planta na simbiose, para todos os caracteres avaliados. Os resultados indicaram que somente a seleção praticada dentro da estirpe produziu acréscimos

significativos, indicando a necessidade de pesquisas dirigidas à manipulação da planta hospedeira para aumento da eficiência simbiótica na fixação do N_2 .

EVALUATION OF SOYBEAN (*Glycine max* (L.) Merrill) GENOTYPES
AND *Bradyrhizobium japonicum* STRAINS FOR THEIR POTENTIAL
FOR SYMBIOTIC EFFICIENCY FOR N₂ FIXATION

Author: Lygia Vitoria Galli

Adviser: Prof.^a Dr.^a Aline A. Pizzirani-Kleiner

SUMMARY

The present research was undertaken in three experimental phases. The first one, consisted on a field evaluation of 90 soybean genotypes, 68 of them from the early maturity group and 22 from the late maturity group, to measure the range of variability for nodulation ability in the host. The inoculation was performed with a mixture of three strains of *B. japonicum*: SEMIA-587, SEMIA-5019 and CB-1809. The parameters studied were: nodule number, weight, nitrogenase activity (ARA) and seed yield. The statistical analysis of data included a multidimensional analysis. The results revealed differences among genotypes, indicating their genetical potential for biological nitrogen fixation. It was not detected correlation between nodulation and seed yield.

The second experimental phase was conducted under greenhouse conditions with the aim of evaluating the bacterial response within and among the three strains of *B. japonicum* when applied alone to Bossier (early maturity) and

IAC-9 (late maturity) genotypes. Data were grouped in classes of frequencies of ARA and size of 60 individual nodules. The results showed the differential behaviour among strains for both parameters, and was attributed to the intrinsic genetical variation of the strain. Strain CB-1809 presented a normal distribution of data, whereas SEMIA-587 and SEMIA-5019 when inoculated in the Bossier, expressed a high frequency of nodules with low activity but with large size at the mid-flowering period. This indicated the nodulation traits of the strain probably was influenced by the length period for the genotype to reach the maturity.

The last phase was also undertaken at the greenhouse and consisted in the study of the interaction among isolates from strain SEMIA-587 nodules picked up from one plant at the second phase and introduced into genotypes selected from the field trial - Bossier, Planalto and SOC 81-76 (early maturity group) and IAC-9, Tropical and GO 79-1084 (late maturity group). Nodulation (number, weight and size of nodules and NA) and weight and N-accumulation in the plant were also evaluated. The absence of a significant interaction among treatments showed that both plant and bacteria acted independently. The results indicated an overall superiority of the strain to enhance the N and weight of the plant. This

.xviii.

suggested the need of research toward the manipulation of the host plant for enhancing the symbiotic efficiency of biological N₂ fixation.

1. INTRODUÇÃO

O suprimento do nitrogênio (N_2) através da fixação biológica tem representado uma alternativa eficiente e econômica para a cultura da soja no Brasil, seu segundo maior produtor mundial. Tal vantagem poderia ser aliada ao fato de que esta leguminosa seria o único vegetal plantado em larga escala, cuja proteína substituiria a contendo a proteína de origem animal (CARRÃO-PANIZZI, 1987).

O sistema simbiótico soja x *Bradyrhizobium japonicum* tem apresentado respostas variáveis quanto à fixação do N_2 devido a diferenças genotípicas da planta hospedeira (WACEK & BRILL, 1976), constituição do genoma bacteriano (JARVIS *et alii*, 1983) e pela ação da interação entre os simbiontes (HALVERSON & STACEY, 1986b).

Na tentativa de melhorar a eficiência do sistema simbiótico quanto à fixação do N_2 tem sido desenvolvidas muitas pesquisas que envolveram técnicas sofisticadas como a indução de mutação, cultura de tecidos de plantas, transfor-

mação bacteriana e, mais recentemente, a tecnologia do DNA recombinante. Entretanto, tem aparecido restrições metodológicas para uma avaliação precisa da fixação do N_2 e, consequentemente de seu melhoramento genético (HOLL, 1983). Por ser um caráter de baixa herdabilidade, tornar-se-iam necessários estudos exploratórios quanto ao potencial natural da atividade fixadora entre macro e microsimbionte. Isto permitiria uma definição mais precisa dos passos posteriores de pesquisa na área.

O presente trabalho teve por objetivos:

- avaliar a variabilidade existente entre genótipos de soja quanto à capacidade de nodulação e relações com a produtividade.
- detectar variações na resposta simbiótica entre e dentro de estirpes de *B. japonicum*.
- selecionar e testar genótipos de soja e isolados de uma estirpe de *B. japonicum* quanto à ação da interação entre ambos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A maior ênfase no estudo da simbiose leguminosa/*Rhizobium* (*Bradyrhizobium*) tem sido dada ao microssimbionte, quanto ao seu isolamento, identificação e propriedades simbióticas. Entretanto a variação da atividade fixadora é também atribuída a diferenças genéticas entre as plantas hospedeiras (HOLL, 1983).

Aspectos relativos à planta, à bactéria e à interação entre ambos serão considerados a seguir.

2.1. INFLUÊNCIA GENOTÍPICA DO HOSPEDEIRO NA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO N₂

Wilson¹, citado por NUTMAN (1981) observou que fatores genéticos da planta afetam a infecção do *Rhizobium*. Ele demonstrou que o grau da especificidade hospedeira não estava relacionado somente com propriedades da bactéria mas também com o grau de variabilidade conferido pela

¹WILSON, J.K. *Amer. Soc. Agron. J.*, 31:159-168, 1939.

planta hospedeira, assim, estirpes isoladas de plantas de polinização cruzada geralmente nodulavam um número maior de espécies do que aquelas de auto-polinização.

Em soja, genes de efeito qualitativo tem sido identificados na simbiose, como o RJ₁ que confere resistência à nodulação quando presente em linhagens recessivas (Williams & Lynch², citado por HOLL, 1983; LA FAVRE & EAGLESHAM, 1984). Por outro lado, Rj₂, Rj₃ e Rj₄ são genes independentes e dominantes, para algumas estirpes de *B. japonicum*. Os dois primeiros foram nódulos com tecido cortical tumefizado, enquanto que a presença de Rj₄ induz a formação de nódulos cujo desenvolvimento é incompleto (NUTMAN, 1981). DEVINE & BREITHAUPT (1980) discutem a expressão dos genes Rj₂ e Rj₄, que aparecem em maior frequência nas linhagens de soja originadas da China e Sudeste da Ásia, respectivamente. Tais diferenças geográficas quanto à sua frequência sugerem que a expressão dos genes é devida à perda de combinação específica entre bactéria e planta do mesmo ecotipo, por ocasião da introdução dos simbiontes em períodos diferentes. Conclusões semelhantes foram obtidas por LIE (1981).

KUENEMAN *et alii* (1984) argumentam que a introdução de genes para a promiscuidade quanto à nodulação pode aumentar a produtividade nos cultivares portadores de ca-

²WILLIAMS, L.F. & LYNCH, D.L. Inheritance of a non-nodulating character in the soybean. *Agron. J.*, 46:28-29.

racterísticas agronômicas satisfatórias mas que são altamente específicas no estabelecimento da simbiose.

No gênero *Trifolium* o gene *i*₁ previne a formação do bacteróide, causando senescência das células infectadas pelo *R. trifolii*, formando nódulos pequenos e numerosos. O gene *ie* causa a divisão anormal de células infectadas. A presença do gene *d* caracteriza-se por poucos cordões de infecção e de tecido cortical formado por células isodiamétricas ocas. O gene *n* expressa-se através da não liberação da bactéria do cordão de infecção para as células da raiz e ainda o gene *t* permite a formação de bacteróides mas não ocorre fixação do N₂ (NUTMAN, 1981).

Em *Pisum sativum* é identificada a ação dos genes *sym*₁ (LIE, 1971), *sym*₂ (HOLL, 1975), *sym*₃ (NUTMAN, 1981) e *sym*₄ (LIE, 1984). *sym*₁ é um gene dominante que confere resistência à nodulação a temperaturas abaixo de 15°C. A presença do gene *sym*₂ provoca resistência à nodulação para algumas estirpes européias de *R. leguminosarum*. Por outro lado, há evidências de que o gene *sym*₃ expressa seus efeitos através da diminuição do suprimento de fotossintatos para o nódulo. E o gene *sym*₄ provoca resistência específica a uma estirpe de *R. leguminosarum*. Outros trabalhos com genes da planta resistentes à nodulação tem sido conduzidos (LIE *et alii*, 1981; KNEEN & LARUE, 1984; WANG *et alii*,

1986), embora ISRAEL *et alii* (1986) argumentem que a resistência à nodulação é regida pelo efeito de mais de um gene.

O suprimento de fotossintatos para o nódulo é uma função do genótipo da planta hospedeira (FISHBECK & PHILLIPS, 1982; DILWORTH, 1984) determinando a quantidade de tecido nodular formado (LAW & BUSHBY, 1982). STREETER (1980) observou que nos primeiros dias de atividade fixadora em soja, há um rápido acúmulo de carboidratos nos nódulos o qual alcança concentrações superiores à de outros órgãos da planta.

PATE & MINCHIN (1980) observaram que o nitrogênio suprido via simbiose é transferido para o grão com mais eficiência do que através dos fertilizantes nitrogenados. Entretanto, a disponibilidade do nitrogênio no solo sob a forma inorgânica pode inibir tanto a formação do nódulo quanto a atividade da nitrogenase, dependendo da concentração (SCHILLING, 1983; STEPHENS & NEYRA, 1983). Daí o fato da fixação simbiôtica do nitrogênio constituir-se numa vantagem competitiva das leguminosas somente em solos com carência deste elemento.

HARDARSON *et alii* (1984) verificaram, entre-tanto, que existe grande variabilidade em estabelecer a simbiose sob 20 e 100 kg N/ha, ressaltando o cv. Dunadja, que fixa quantidades similares de N₂ em qualquer um dos dois ní-veis de N.

Fatores fisiológicos tais como a eficiência do sistema hidrogenase (Hup^+) na recuperação de moléculas de ATP, para a redução do N_2 , são apontados como de ação maior da bactéria (LAMBERT *et alii*, 1987). Porém, KEISER *et alii* (1982a) sugeriram influência hospedeira para a expressão da Hup^+ com base nas diferentes respostas de soja e caupi frente a duas estirpes de *Rhizobium*.

2.1.1. PROGRAMAS DE MELHORAMENTO E METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA

Segundo NUTMAN (1981) programas de melhoramento visando aumento da capacidade de fixação do N_2 carecem de estratégias mais definidas, devido à falta de conhecimento da genética da bactéria e da fisiologia e bioquímica da planta hospedeira. Tais estudos necessitam da contribuição de várias disciplinas que poderão prover estratégias alternativas para as diversas culturas de leguminosas. Os primeiros passos a serem seguidos definem a planta como sendo o centro da seleção, a qual é conduzida para minimizar os efeitos da bactéria ou da interação planta x bactéria. Desta forma serão detectados genes da planta com efeitos superiores na fixação. Posteriormente haveria uma seleção do hospedeiro para uma ótima performance simbiótica com alguns genótipos de bactérias, a fim de evitar alta especificidade ou dominância ecoló-

gica.

Procedimentos práticos quanto a estratégia inicial de alguns programas incluem a avaliação do germoplasma de leguminosas de grãos (ATTEWELL & BLISS, 1985) para posterior seleção de plantas com grande capacidade simbiótica (KIPE-NOLT & GILLER, 1985; TEMPLE DUQUE & KIPE-NOLT, 1986).

Um programa desenvolvido na América Latina incluiu a avaliação de 339 genótipos de feijão, quanto à variabilidade fenotípica da fixação para peso de nódulos, atividade da nitrogenase pelo método de redução do acetileno (ARA) e produção de grãos por planta (PEREIRA, 1984). O objetivo foi o de identificar genótipos com grande potencial de fixação para serem utilizados como parentais em cruzamentos com cultivares portadores de outras características agronômicas desejáveis segundo ROSAS & BLISS (1987).

Resultados de 8% de aumento para ARA em trevo, inoculado com uma estirpe de *R. trifolii*, foram obtidos num ciclo de seleção massal, cuja herdabilidade calculada foi de 63% (SMITH *et alii*, 1982).

Em alfafa a pressão de seleção para altos e baixos níveis de fixação do N_2 modificou a porcentagem de ocupação nodular de estirpes indígenas de *R. leguminosarum* para estirpes introduzidas no solo com marcas de resistência a an-

tibióticos (HARDARSON *et alii*, 1982).

Outros objetivos de programas de melhoramento visam a alteração de caracteres agronômicos que possam influenciar benéficamente a simbiose. Dentre elas estão mudanças na arquitetura foliar da planta, visando o aumento de fotossintatos para o nódulo (MICKE, 1984), maior capacidade de assimilação do N_2 fixado (KAPULNIK *et alii*, 1985) e obtenção de cultivares nitrato-tolerantes, ou seja, aqueles cuja fixação de N_2 não é inibida por nitrogênio exógeno (HERRIDGE & BETTS, 1985; IMSANDE, 1985).

A metodologia mais utilizada na avaliação do comportamento simbiótico inclui ARA, peso de nódulos, peso da parte aérea e N-total da planta além da produtividade, que serão abordados a seguir.

O método ARA é rápido, econômico e recomendado para avaliações comparativas da atividade da nitrogenase (AN). Seu valor é semi-quantitativo por não considerar a evolução do H_2 (SCHUBERT & EVANS, 1977) e ainda pelo declínio que o acetileno provoca na AN, observado em muitas leguminosas (MINCHIN, 1983). Valores de correlação positiva foram observados entre ARA e N-total em soja (MACARY *et alii*, 1981).

DUQUE *et alii* (1982) também verificaram que as melhores respostas da ARA por ocasião da floração refletiram numa maior incorporação de N-total na planta da estirpe 29W inoculada em 5 cultivares de soja. Por outro lado, PACOVSKY *et alii* (1984) discutem a validade desta medida em estudos de nodulação em feijoeiro, pois a maioria das características simbióticas foram afetadas pelo genótipo da planta hospedeira, exceto os valores relativos à ARA.

NUTMAN (1981), revisando os fatores hereditários do hospedeiro na fixação em trevo, salienta que a massa nodular é positivamente relacionada com a quantidade de N₂ fixado. De maneira similar BARNES *et alii* (1981) recomendam esta medida morfológica para avaliação da eficiência simbiótica frente aos resultados satisfatórios obtidos com melhoramento de alfafa.

A quantidade do N-total da parte aérea é uma medida de rendimento indicativa da quantidade de N₂ fixada e incorporada à planta (NEVES *et alii*, 1985). Valores de correlação positiva de N-total tem sido determinados para peso de nódulos (PERES & VIDOR, 1980), peso da parte aérea, em soja (LOPES & GIARDINI, 1976), alfafa (HEICHEL *et alii*, 1984) e fava (MYTTON, 1984) e também para produção e conteúdo de N em grãos de soja (BROCKWELL *et alii*, 1985).

HAYDOCK *et alii* (1980) demonstraram

.11.

através de tratamento estatístico adequado que é possível detectar simbioses eficientes somente com valores de peso da parte aérea quando o inóculo é formado por estirpes eficientes.

A incorporação do N_2 fixado às sementes foi constatado por PEREZ (1980) cujos coeficientes de correlação entre a porcentagem de proteínas na semente e peso de nódulos foram positivos e elevados.

Através de métodos comparativos entre a quantidade de N_2 fixado entre plantas nodulantes e controle não inoculado, em feijão, DUQUE *et alii* (1985) verificaram valores de até $28,3 \text{ kg N/ha}^{-1}$ no cultivar Carioca, inoculado pelas estirpes C05 + SEMIA 487, evidenciando que a simbiose representa um grande potencial para aumento da produtividade em leguminosas.

2.1.2. INFLUÊNCIA DO GRUPO DE MATURAÇÃO NA SIMBIOSE EM SOJA

Na soja, a resposta ao fotoperíodo é o fator determinante da latitude em que os cultivares devem ser cultivados, impedindo assim que o florescimento e crescimento reprodutivo sejam iniciados antes do desenvolvimento vegetativo adequado. Esta é a razão pela qual os genótipos de soja são enquadrados em diferentes grupos de maturação (CREGAN & HARTWIG, 1984).

Na avaliação da performance simbiótica de três

variedades, Hodgson, Amsoy-71 e Willians, pertencentes a três grupos distintos de maturação, foram observada diferenças acentuadas para o cv. Amsoy-71 quanto a maior produção da massa nodular (PEREZ, 1980). GRAHM & TEMPLE (1984) justificam a grande variação encontrada entre cultivares na fixação do N_2 às diferenças no período de pré-florescimento da soja, enquanto que a grande similaridade entre cultivares dentro de um mesmo grupo de maturação é atribuída à constituição genetica das plantas.

Num estudo da porcentagem de ocupação de nôdulos por estirpes de *B. japonicum*, as quais são recomendadas para uso em inoculantes comerciais nos E.U.A., foi verificado um aumento gradativo para cultivares plantados em latitudes maiores (GEORGE *et alii*, 1987). Embora limitada, a informação com respeito à variação da resposta simbiotica de genótipos pertencentes a diferentes grupos de maturação é um indicativo que mais estudos devem ser conduzidos com a planta hospedeira para aumento da eficiência do sistema.

2.2. AÇÃO DA BACTÉRIA NA EFICIÊNCIA DA FIXAÇÃO DO N_2

A infectividade de bactérias nodulantes dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium* não implica necessariamente na eficiência da fixação do N_2 , pois uma vez tendo

penetrado na planta hospedeira, através do cordão de infecção, necessita multiplicar-se dentro do nódulo e induzir a formação da nitrogenase e leghemoglobina para que, só então, se inicie a redução do N_2 atmosférico (PERES e SUHET, 1986). Entretanto, maior grau de eficiência simbiótica é observado entre espécies de bactérias com seus respectivos hospedeiros, de tal maneira que os termos eficiência ou ineficiência são de pouca validade se não for considerada a especificidade hospedeira (DATE, 1976).

A capacidade de infecção (Inf^+) e formação do nódulo (Nod^+) (YOUNG *et alii*, 1982; SUTTON *et alii*, 1984; WHEATCROF & WATSON, 1987) é relacionada com o reconhecimento do hospedeiro (RALEIGH & SIGNER, 1982; STACEY *et alii*, 1982), competitividade (AMARGUER, 1981) ou mesmo com outros aspectos ecológicos tais como a colonização da rizosfera (AMARGER & LOBREAU, 1982; MOAWAD *et alii*, 1984; OZAWA *et alii*, 1984) e antagonismo microbiano (FREIRE, 1976; VILLAMIL, 1986).

A síntese da nitrogenase, para redução do nitrogênio em amônia, é determinada por um conjunto de genes denominados ni λ , que expressam a atividade fixadora do nódulo (Fix^+ ou Fix^-) (ROBSON *et alii*, 1983). A regulação destes genes é independente daqueles responsáveis pela especificidade com a planta hospedeira (hsn) ou pelo estabele-

cimento do nódulo (nod) (MASTERSON *et alii*, 1982; MASTERSON *et alii*, 1985; STANLEY *et alii*, 1985; LONG, 1986; WHEATCROF & WATSON, 1987). PAAU & BRILL (1982) observaram maior quantidade de DNA nos bacteróides maduros do que em células vegetativas de *R. meliloti*, atribuindo este aumento à amplificação de genes essenciais específicos para a fixação do nitrogênio. Além da nitrogenase (BRILL, 1980), proteínas induzidas durante a organogênese do nódulo, denominadas nodulinas, desempenham importante papel metabólico para a eficiência do sistema simbiótico (SANCHEZ *et alii*, 1987). Dentre elas destaca-se a leghemoglobina, responsável pela respiração no bacteróide e proteção da nitrogenase contra a ação tóxica do oxigênio; a glutamina sintetase que participa da via metabólica da amônia após a fixação do N_2 e a uricase II, que contribui para a formação de ureídeos exportados via xilema (NOEL *et alii*, 1982; BRILL, 1980; SANCHEZ *et alii*, 1987; FULLER *et alii*, 1983).

Confirmando a natureza plasmidial na fixação do N_2 (ROLFE *et alii*, 1980), foram obtidos transconjugantes invasores (Inf^+) e eficientes (Fix^+) a partir de duas estirpes com características Inf^- e Fix^- , respectivamente, de *R. trifolii*.

Características simbióticas da bactéria são codificadas em plasmídios de alto peso molecular (HOOYKAAS *et alii*, 1981; KONDOROSI *et alii*, 1984; APPELBAUM *et alii*, 1985; ALVES, 1986).

Posteriormente JARVIS *et alii* (1983) puderam identificar sequências de bases do DNA responsáveis pelos fenótipos Nod⁺ e Fix⁺, para várias espécies de *Rhizobium*.

Estudos genéticos de bactérias pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* são restritos dada a dificuldade tanto na obtenção de mutantes estáveis, como na transferência conjugativa de genes plasmidiais para efetuar mapeamento genético (SUTTON *et alii*, 1984). Entretanto, uma nova espécie de bactéria nodulante pertencente ao gênero *Rhizobium*, denominada *R. fredii*, foi isolada do cv. Peking de soja, cujas características fisiológicas de crescimento rápido e produção de pH ácido no meio de cultura, diferem do *B. japonicum* (KEISER *et alii*, 1982). Neste grupo os resultados de análises genéticas tem-se mostrado mais reprodutíveis (SADOWSKY & BOHLOOL, 1983).

Um incremento do número de cópias dos genes *nif* tem sido sugerido para o aumento da eficiência simbiótica. MATHIS *et alii* (1985) chegaram a esta conclusão através de estudos onde a cura plasmidial de *B. japonicum* provocou atraso na nodulação e fixação do N₂.

2.2.1. PADRÃO DE NODULAÇÃO E EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA

O comportamento simbiótico de diferentes estirpes tem sido avaliada com os mesmos caracteres usados para

detectar diferenças quanto ao genótipo da planta. Neste enfoque os efeitos da leguminosa são fixos, variando somente a ação da bactéria quanto ao peso de nódulos, peso da parte aérea e N-total da planta (LOPES & GIARDINI, 1976; PERES & VIDOR, 1980; SAITO, 1982; OLIVEIRA & SUHET, 1984), valor de ARA (ZABLOTOWICZ & FOCHT, 1981; DUQUE *et alii*, 1982; HUNGRIA *et alii*, 1986), imobilização do N₂ fixado para a parte aérea em forma de ureídeos (NEVES *et alii*, 1985; HUNGRIA *et alii*, 1986) e aumento da produtividade (DUQUE *et alii*, 1982; WILLIAMS & PHILLIPS, 1983; NEVES *et alii*, 1985).

O número de nódulos por planta evidencia melhor os aspectos de especificidade e competitividade (PERES & VIDOR, 1980; ZABLOTOWICZ & FOCHT, 1981; OLIVEIRA & VIDOR, 1984) do que eficiência, sendo inversamente relacionado à massa nodular (NUTMAN, 1981).

Dados referentes à ARA foram positivamente correlacionados com a massa nodular por ZABLOTOWICZ & FOCHT (1981), embora resultados contraditórios tenham sido observados entre diferentes estirpes de *Rhizobium* por LAW & STRIDJON (1982) em *Vigna*.

PACOVSKY *et alii* (1984) discutem a validade da taxa de ARA para a avaliação da eficiência simbiótica, argumentando que esta é uma medida de benefícios e custos tran-

sitórios e que desconsidera aspectos importantes como a transferência e utilização do nitrogênio fixado pela planta hospedeira. NEVES *et alii* (1985) compararam resultados de nodulação e metabolismo do N_2 fixado para dois grupos de estirpes de *R. japonicum*. Bactérias do grupo I apresentaram maior massa nodular, porém, somente 21% de remobilização do nitrogênio da parte aérea para o enchimento das vagens, em relação ao percentual de 35% observado no grupo II. Da mesma maneira foi verificada variação do nitrogênio translocado para as sementes por quatro estirpes de *R. japonicum* (965, CB 1809, R 54 e 29 W), onde os maiores valores de nodulação e N-total da 29 W não corresponderam ao maior rendimento específico (kg grãos/kg N) da soja (DUQUE *et alii*, 1982).

Estudos comparativos da fisiologia entre nódulos eficientes e ineficientes, revelaram a síntese de um aminoácido desconhecido, em lugar da asparagina, em nódulos sem atividade da nitrogenase (WERNER *et alii*, 1980). De fato, a presença de asparagina e glutamina em lugar dos ácidos aspártico e glutâmico tem sido relacionados à alta eficiência na fixação do N_2 e o acúmulo de α aminobutirato associado à diminuição da atividade nodular (PERES & SUHET, 1986).

A taxa de evolução do H_2 no nódulo interfere no grau de eficiência por desviar energia necessária à redução do N_2 , devendo ser considerada na quantificação da atividade

de nodular (NEVES *et alii*, 1985; HUNGRIA *et alii*, 1986). A presença da hidrogenase (Hup^+) pode recuperar até um terço da energia dispendida na evolução do H_2 (SORENSEN & WYNDAELLE, 1986). Estirpes Hup^+ inoculadas em *Sesbania* produziram um aumento de 22% de N-total na planta, influenciando também no aumento da matéria seca em relação a Hup^- (SAINI *et alii*, 1987). Resultados contraditórios foram obtidos por DREVON *et alii* (1987) cuja aparente ineficiência do sistema hidrogenase em *B. japonicum* é justificada pelas condições limitantes de O_2 . Nestas circunstâncias a geração de ATP é destinada prioritariamente para a redução do N_2 .

Características morfológicas da cultura bacteriana tem sido associadas ao grau de eficiência simbiótica. Estirpes ineficientes de *B. japonicum* tem sido identificadas pelo tamanho reduzido da colônia, pouca produção de goma e incapacidade de utilizar manitol como fonte de carbono (SATO & SUGARA, 1981; MATHIS *et alii*, 1986a), enquanto JUAREZ (1984) verificou que variantes eficientes de *R. phaseoli* apresentavam colônias grandes e viscosas.

MATHIS *et alii* (1986a) relacionaram o crescimento em manitol ou glucose de um derivativo da estirpe USDA 110 de *B. japonicum* à sua alta eficiência simbiótica. Entretanto posteriores provas de hibridização com genes estruturais para a expressão da nitrogenase nif K, D e H, através de enzimas

de restrição, revelaram um modelo similar aos derivados incapazes de fixar N_2 e que utilizam manitol, concluindo assim que não é esta fonte de carbono a responsável pelos diferentes graus de eficiência simbiótica (MATHIS *et alii*, 1986b).

Estudos de hibridização com os genes *nif* KD e *nif* H para derivados da estirpe USDA 110 confirmaram que não foi o rearranjo genético destes genes responsável pela variação da performance simbiótica, mas não excluíram a possível ação de outros genes estruturais (MATHIS *et alii*, 1986c).

2.2.2. PADRÃO DE EFICIÊNCIA DE ESTIRPES E ISOLADOS

Poucos trabalhos na literatura dizem respeito ao estudo de variação da eficiência simbiótica dentro de estirpes, os quais fundamentam-se na variabilidade genética da fixação do N_2 .

PERES *et alii* (1984) conduziram experimentos em casa de vegetação com duas estirpes de *R. japonicum*, 965 e 29W, a fim de verificar o comportamento de cada uma delas quanto a atividade específica da nitrogenase (AE) de cada nódulo, pelo método ARA. A estirpe 965 revelou uma curva de frequência deslocada à esquerda, indicando um grande número de nódulos com baixa atividade, enquanto que a 29 W

apresentou uma distribuição normal. Estes nódulos, coletados na época de florescimento, foram agrupados, segundo seus valores de ARA e testados novamente. Em todos os parâmetros avaliados confirmou-se o grau de eficiência dos isolados das duas estirpes quanto aos nódulos dos quais foram originados.

Outro estudo de padrão comparativo da atividade nodular de isolados de três estirpes de *R. phaseoli*, demonstrou também comportamento diferencial nos padrões de nodulação (AE e tamanho nodular), sugerindo a presença de nodulação tardia e precoce, cujos ciclos curtos ou mais prolongados refletem a variação da capacidade simbiótica (VILLAMIL, 1986).

2.3. INTERAÇÃO ENTRE MACRO E MICROSSIMBIOTES

Pouco se sabe a respeito dos mecanismos moleculares que regem a interação entre as leguminosas e bactérias quanto a efetividade da simbiose (HALVERSON & STACEY, 1986a).

O primeiro sinal visível de infecção é o curvamento do pelo radicular (TURGEON & BAUER, 1982; SANTHARAM & WONG, 1982) significando que houve reconhecimento específico entre os simbiossiontes e aderência das bactérias à raiz da planta hospedeira (BROUGHTON, 1978; ROBERTSON *et alii*, 1981; HALVERSON & STACEY, 1986b).

BOHLOOL & SCHMIDT (1974) foram autores do tra-

balho pioneiro que apontam as lectinas da soja (SBL) como mediadoras da ligação específica com polissacarídeos de parede celular do *R. japonicum*. O processo assemelha-se à aglutinação antígeno-anticorpo e tem sido investigado extensivamente para outras espécies nodulantes (ALBERSHEIN & ANDERSON-PROUTY, 1975; PUEPKE *et alii*, 1982; ESTRADA-GARCIA, 1984; LAW & BRUN, 1984; HALVERSON & STACEY, 1986a).

A lectina é uma glicoproteína com peso molecular de 120.000, composta de quatro subunidades e dois sítios receptores (SHARON, 1977). Ela pode estar ausente na leguminosa e quando ocorre, a planta mutante é dita *lele* (PUEPKE, 1982) ou pode também ser inibida por nitrogênio exógeno, cessando o processo de reconhecimento entre os simbiontes (DAZZO e BRILL, 1978).

BHUVANESWARI & BAUER (1978) verificaram que receptores específicos de *R. japonicum* à SBL só se desenvolveram quando em associação a exudatos radiculares. Posteriormente foi demonstrado que a iniciação do nódulo pode ser fenotipicamente revertida pela presença de tais exudatos (BHAGWAT & THOMAS, 1982; HALVERSON & STACEY, 1984; HALVERSON & STACEY, 1985), os quais podem influenciar no número de nódulos (KUSH & DARDWAL, 1981) e alterar a composição capsular de células do *Rhizobium* (DAZZO *et alii*, 1981).

A aderência bacteriana à raiz da leguminosa é

descrita por DAZZO & TRUCHET (1984) em *R. trifolii*, a qual é dividida em 2 fases. Na fase I ocorre a adsorção preferivelmente na ponta da raiz, aonde existem células epidermais diferenciadas. Neste momento é que a lectina reconhece e media a ligação entre os simbiossiontes. A fase II é caracterizada por uma aderência irreversível da bactéria na raiz através de material fibrilar, identificada através de microscopia eletrônica, cuja origem é desconhecida. Este firme contato é necessário para desencadear o curvamento do pelo radicular e a penetração da bactéria durante o processo de infecção (HIGASHI & ABE, 1980 ; HIGASHI & ABE, 1986; MATHYSSE, 1983).

ANOLLÉS & FAVELUKES (1986) verificaram um percentual de 98% de competidores específicos de *R. meliloti* frente a 60% dos interespecíficos, salientando novamente a presença de sítios específicos de ligação, que são altamente seletivos ao microssimbionte.

A importância da quimiotaxia tem sido ressaltada quanto a colonização das bactérias nodulantes na rizosfera (GULASH *et alii*, 1984), mas embora facilite a infecção, não desempenha nenhum papel preponderante no reconhecimento específico entre os simbiossiontes (GAWORZEWSKA & CARLILE, 1982; CURRIER, 1985).

Os receptores específicos do *Rhizobium* na ligação com as lectinas são polissacarídeos da parede celular.

Estes açúcares são identificados como lipopolissacarídeos (LPS) (DAZZO *et alii*, 1981; CARLSON, 1984; HUGHES e ELKAN, 1985); polissacarídeos capsulares (CPS) (VASSE, DAZZO e TRUCHET, 1984) e exopolissacarídeos (EPS) (DUDMAN, 1981; CAVIEDES *et alii*, 1982; HUBER, AGARWAL e KLEISTER, 1984; FERNANDEZ PASCUAL, M. e CABEZAS DE HERRERA, 1986).

A caracterização do açúcar específico de cada espécie é feita através de estudos com inibidor específico. Em *R. japonicum* é a galactose e seu derivado N-acetilglucosamina (FERNANDEZ-PASCUAL e CABEZAS DE HERRERA, 1986). No trevo o inibidor específico da trifolina-A é 2-deoxiglicose (DAZZO *et alii*, 1982) e galactose (CAVIEDES *et alii*, 1982).

Um novo modelo de desenvolvimento do sítio de infecção na planta é sugerido por TURGEON e BAUER (1985) baseado em estudos da ultraestrutura de infecção em soja por *B. japonicum*. Foi sugerida a aderência bacteriana no mucigel que envolve as células na região de emergência dos pelos radiculares (SEHR), onde sua entrada só seria viável após a degradação deste mucigel para posterior enclausuramento das bactérias pela parede do pelo radicular.

Estudos do perfil de nodulação indicam que, após o reconhecimento, as bactérias infectivas iniciam a nodulação entre a ponta da raiz (RT) e SEHR, existindo um controle por parte da planta hospedeira quanto ao número de in-

fecções (CALVERT *et alii*, 1984; HALVERSON e STACEY, 1984; LAW e STRIDJON, 1984).

A interação entre leguminosas e estirpes tem sido avaliada nos programas que visam aumento da fixação simbiótica do N₂ (PULVER, BROCKMAN e WIEN, 1982; SMITH *et alii*, 1982). Os componentes genéticos considerados no estudo do fenótipo simbiótico (P) são do genótipo da leguminosa (GL) e do *Rhizobium* (GR), além da ação ambiental (E). Os efeitos específicos da interação são dados pela fórmula:

$$P = GL + GR + (GL \times GR) + E + (GL \times E) + (GR \times E) + (GL \times GR \times GE) \quad (\text{HOLL, 1983})$$

Resultados obtidos por MYTTON (1984) em experimentos com *Vicia faba* avaliando os efeitos de P, indicam que 8,9% foi devido à GL, 11,8% à GR e 73,8% à interação.

Também em alfafa ocorreram altos valores para o efeito da interação expressos na variação fenotípica do N-total e matéria seca da planta (PHILLIPS e TEUBER, 1985).

Uma estratégia já sugerida por MYTTON (1981) seria de que a seleção fosse dirigida tanto para a planta quanto para a bactéria. Desta forma os efeitos específicos da interação poderiam ser não somente explorados como também maximizados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ESTIRPES DE *Bradyrhizobium japonicum*

Foram utilizadas três estirpes de *B. japonicum*: CB-1809 (Austrália), SEMIA-5019 ou 29W, (RJ-Brasil) e SEMIA-587 (RS-Brasil), sendo que as duas últimas são recomendadas para fabricação comercial de inoculantes no Brasil.

3.2. GENÓTIPOS DE SOJA

Foram utilizados 90 genótipos de soja (*Glycine max* (L.) Merril) que incluem cultivares de uso comercial bem como linhagens experimentais. Deste total, 68 pertencem ao grupo de maturação precoce e 22 ao grupo de maturação tardia, conforme Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Relação dos 68 genótipos precoces de soja.

Tratamento/Genótipo	Tratamento/Genótipo	Tratamento/Genótipo
1- SOC 81-124	24- BR-1 (b)	47- Pérola
2- Sulina	25- OCEPAR-2 = IAP0	48- OC 79-84
3- FT 81-2163	26- OC 79-11	49- CNS
4- Década	27- TN 82-273	50- BR-6
5- La 49-10215	28- OC 79-5	51- OC 79-136
6- Jackson	29- Biloxi	52- SOC 81-228
7- Cobb	30- BR-1-Fosca	53- FT-2
8- Davis	31- SOC 81-145	54- IAC-1
9- Foster	32- OC 79-504	55- PI 322 694
10- BR 80-14887	33- FT 79-3408	56- GO 81-11075
11- Santa Maria	34- Planalto	57- SOC 81-119
12- BR-1 (a)	35- FT-5	58- FT 81-2706
13- CEPS 7716	36- FT 79-3415	59- OC 79-493
14- FT 81-2136	37- Bossier	60- FT-1
15- OC 79-7	38- BR-4	61- SOC 81-105
16- Dourados	39- União	62- FT-7
17- Kirby-F77	40- GO 81-8106	63- BR 80-6935
18- GO 81-8102	41- Tiaraju	64- FT-6
19- OC 79-230	42- BR-7	65- FT-9
20- OC 79-20	43- Centennial	66- SOC-81-76
21- IPAGRO 20	44- Pickett-71 (CN)	67- Kershaw
22- OC 78-503	45- Ax 53-55	68- Batavian Yellow
23- Pickett-71 (UT)	46- IAC-12	

Tabela 2 - Relação dos 22 genótipos tardios de soja.

Tratamento/Genótipo	Tratamento/Genótipo
69- UFV-1	80- UFV-Araguaia
70- Cristalina-2	81- PI 240 664
71- UFV-5	82- EMG0PA-301
72- BR 79-63	83- Doko
73- Paranaoiana	84- UFV-2
74- IAC-9	85- BR-11
75- Timbira 1	86- Tropical
76- BR-10	87- UFV-3
77- TN 82-264	88- GO 79-1084
78- Numaíra	89- Timbira 2
79- GO 79-1039	90- Cristalina-1

3.3. MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES UTILIZADAS

3.3.1. Y.M.B. (YEAST MANITOL BROTH (FRED *et alii*, 1932, MODIFICADO)

Manitol.	2,5 g
Glutamato de sódio	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,08 g/ml
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,10 g
CaCl ₂	0,04 g
FeCl ₃	4 mg
Extrato de levedura.	0,25 g
pH.	6,8

- Completar com água destilada até 1000 ml. Esterilizar por autoclavagem (1,0 atmosfera por 20 minutos).

3.3.2. Y.M.B. (YEAST MANITOL AGAR) (FRED *et alii*, 1932, MODIFICADO)

- Ao meio líquido (YMA) foram adicionados 12 g de ágar/l.

3.3.3. SOLUÇÃO DE VERMELHO CONGO

- Solução aquosa de vermelho congo 0,25%, utilizada na quantidade de 10 ml por litro de meio YMA, antes da autoclavagem.

3.3.4. SOLUÇÃO SALINA

- Solução aquosa de cloreto de sódio 0,89% distribuída em tubos ou Erlenmeyers, autoclavada a 1,0 atmosfera por 20 minutos.

3.3.5. SOLUÇÃO NUTRITIVA PARA PLANTAS (MODIFICADA DE MCKNIGHT, 1949)

$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	150 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20 g
KH_2PO_4	20 g
KCl	30 g
Sol. A-Z	100 ml
Sol. D	100 ml
H_2O destilada	4.700 ml
NaOH (1M)	70 ml
pH final = 6,4	

- Diluição em água destilada na proporção 1:10.

Solução A-Z de nutrientes

H_3BO_3	2,86 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2,03 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,22 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,08 g
$\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,09 g

- Diluição em 1000 ml de água destilada.

Solução D

$\text{FeCl}_3 \cdot \text{Sol.}$ (4 g/l)	16,8 ml
$\text{EDTA Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2,0 g

3.3.6. SOLUÇÃO DE HIPOCLORITO DE SÓDIO

- Solução aquosa de hipoclorito de sódio 1% (10%) esterilizado através de autoclavagem a 1,0 atmosfera, por 20 minutos.

3.4. ESTERILIZAÇÃO DE SEMENTES

As sementes foram mantidas por cinco minutos na solução de hipoclorito de sódio (ítem 3.3.6.), em seguida submetidas a seis lavagens com água esterilizada para retirar o excesso (SOMASEGARAN e HOBEN, 1985).

3.5. INOCULANTES

Foram produzidos inoculantes na forma líquida e introduzida na turfa.

O inoculante líquido é produzido com o crescimento das bactérias sob agitação em 50 ml de meio YMB, por 5 dias a 28°C.

A turfa utilizada como suporte para o inoculante líquido foi procedente da TURFAL - Indústria e Comércio, Quatro Barras, PR. Ela foi seca, moída, neutralizada a pH = 7 e acondicionada em sacos plásticos de 200 g.

3.6. AVALIAÇÃO GENOTÍPICA DO HOSPEDEIRO NA NODULAÇÃO DA SOJA

Foram utilizados dois experimentos em condições de campo, instalados na área experimental do Departamen-

to de Genética - ESALQ/USP, em Piracicaba (SP), em solo Terra Roxa Estruturada, sem histórico de inoculação e sem adubação nitrogenada. Estes experimentos fazem parte do programa que vem sendo desenvolvido pelo Setor de Genética Aplicada às Espécies Autógamas (SGAEA), com a finalidade principal de selecionar parentais para a síntese de populações de soja com base genética ampla e aplicação de seleção recorrente para produtividade. Os dois experimentos foram conduzidos pelo SGAEA em 1984/85, um deles compreendendo 68 genótipos precoces e o outro 22 tardios.

Cada experimento foi delineado em dois blocos casualizados com tratamentos organizados em conjuntos experimentais. Em cada conjunto foram colocadas três testemunhas-padrões: 'Davis', 'IAC-12' e 'Bossier', do grupo precoce e 'Tropical', 'IAC-9' e 'UFV-1', do grupo tardio (Figura 1). As testemunhas permitem tanto a identificação perfeita dos ciclos de maturação de cada genótipo quanto o ajustamento para compensar diferenças ambientais que são possíveis de ocorrer entre os conjuntos. As parcelas experimentais compreenderam cinco fileiras de 5 metros de comprimento, com 20 plantas por metro linear. O espaçamento foi de 60 cm entre fileiras. Uma das fileiras externas de cada parcela foi reservada para avaliação da nodulação e as demais para a obtenção dos dados de produtividade. A produtividade foi avaliada nas plantas locali-

Figura 1 - Mapa de campo dos experimentos Precoce e Tardio, em soja, com dois blocos divididos em conjuntos experimentais. As testemunhas-comuns intercalam os genótipos avaliados em cada conjunto.

zadas no centro das duas fileiras intermediárias, relativamente às quatro fileiras restantes da parcela.

3.5.1. INOCULAÇÃO DAS SEMENTES

Na véspera do plantio as sementes de cada genótipo foram inoculadas com a mistura das estirpes CB-1809, SEMIA-5019 e SEMIA-587, provenientes da coleção do MIRCEN - RS, em turfa (Ítem 3.4.), através de um "*pellet*" que compreendeu o envolvimento das sementes com uma solução de sacarose, CaCO_2 e a turfa portadora das estirpes, nas seguintes proporções:

Sementes de soja.	100 g
Solução de sacarose (10%). . . .	5,0 ml
CaCO_2 comercial	5,0 g
Turfa inoculada	3,5 g

3.5.2. AVALIAÇÃO DA NODULAÇÃO E PRODUTIVIDADE

Os caracteres avaliados nos dois experimentos de campo foram: número e peso dos nódulos, AN e produtividade. Os valores de peso referem-se à matéria seca.

A coleta dos dados foi realizada na Seção de Microbiologia do Solo (CENA/USP) e ocorreu 60 dias após a semeadura. Foi iniciada pela determinação da AN através do método da redução do acetileno (ARA). Raízes de 10 plantas por parcela foram arrancadas e colocadas em frascos previa

.34.

mente rotulados (capacidade 1000 ml). Estes foram vedados com tampas rosqueadas onde foi ajustada uma rolha do tipo "*serum cap*". Foram injetados 100 ml de C_2H_2 , com prévia retirada de um volume igual da atmosfera do frasco. Após 1 hora de incubação, 0,5 ml de cada amostra foram injetados no cromatógrafo gasoso que acusou, graficamente a concentração de etileno evoluído (CE).

Foi utilizado cromatógrafo gasoso modelo Beckman GC-65, acoplado com detector de ionização em chama. O gás carregador foi o N_2 a um fluxo de 40 ml por minuto. O padrão de C_2H_4 foi preparado na concentração de 500 vpm.

Para determinar o valor de ARA (μmol de $C_2H_4/\text{pl.h}$) utilizou-se a fórmula:

$$CE = L.A.K.V.R.$$

onde:

CE = concentração de etileno evoluído;

L = leitura do pico (mm) da amostra;

A = atenuação do pico;

K = fator de correção das amostras;

V = volume de incubação;

R = amplitude de variação do aparelho.

O fator K foi calculado da seguinte forma:

$$K = K' \times \frac{1}{\text{tempo de incubação}} \times \frac{1}{\text{volume injetado}} \times \frac{1}{\text{número de plantas}}$$

sendo K' o valor de correção, para o gás padrão (C_2H_4) cujo

cálculo é:

$$K' = \frac{\text{concentração de etileno}}{L \times A \times R}$$

onde:

L e A = leitura e atenuação do pico padrão;

R = amplitude de variação do aparelho.

O volume de padrão injetado foi de $0,5 \times 10^{-3} \text{ ml}^{-1}$.

A avaliação da nodulação constou ainda da contagem e pesagem dos nódulos. Os nódulos foram contados com auxílio de uma pinça após prévia retirada das raízes lavadas e em seguida mantidos em estufa regulada a 60°C até atingirem peso constante. O peso da matéria seca(em mg) foi aferido através de balança eletrônica digital, mod. Mettler PC-2200, com precisão de centésimo de grama.

Os dados de produtividade (kg/ha) foram fornecidos pelo SGAEA, conforme objetivo do programa mencionado no ítem 3.5.

3.5.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA UNIVARIADA

Foi realizada inicialmente uma análise da variância para detectar a existência de interação entre as testemunhas-padrões e conjuntos experimentais dos ensaios Precoce e Tardio.

As esperanças dos quadrados médios ($E(QM)$) obtidas são apresentadas na Tabela 3. As testemunhas (T) e a interação ($C \times T$) foram consideradas como sendo de efeito fixo e os conjuntos experimentais (C) e repetição (R) de efeito aleatório.

Os valores de número, massa nodular, ARA e produtividade foram submetidos individualmente a uma análise de variância simples.

3.5.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA MULTIDIMENSIONAL

Os quatro caracteres avaliados foram submetidos à análise multidimensional (GODOI, 1985) por serem procedentes da mesma parcela e relacionados direta ou indiretamente a um mesmo fenômeno biológico.

O processamento dos dados segundo a análise multidimensional foi realizado através do sistema MOLIMU (modelo Linear Multidimensional)*.

A versatilidade do sistema permite além dos resultados inerentes à opção multidimensional, valores relativos à variâncias individuais, covariâncias e correlações residuais. Também é possível a discriminação gráfica dos tratamentos após a análise estatística.

*Elaborado pelo Prof. Dr. Cássio de Melo Godoi - Departamento de Matemática e Estatística, ESALQ/USP.

Tabela 3 - Esperança dos quadrados médios para a análise da variância dos conjuntos experimentais.

F.V.	Q.M.	E (Q.M.)	F
Conjunto experimental (C)	Q_5	$\sigma^2 + RT \sigma_C^2$	Q_5/Q_1
Testemunhas (T)	Q_4	$\sigma^2 + R \sigma_{ct}^2 + CR \sigma_t^2$	Q_4/Q_3
C x T	Q_3	$\sigma^2 + R \sigma_{ct}^2$	Q_3/Q_1
Repetição (R)	Q_2	$\sigma^2 + CT \sigma_r^2$	Q_2/Q_1
Resíduo	Q_1	σ^2	

Para os experimentos do grupo Precoce e Tardio foi utilizada a seguinte opção do sistema MOLIMU:

- *Análise discriminante gráfica*, a qual refere-se a uma função linear dos dados originais que maximiza a diferença existente entre os genótipos. No eixo Y estão os valores da função discriminante previamente calculados na análise estatística.

O eixo X contém os índices dos genótipos em ordem crescente.

3.6. AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DE ESTIRPES DE *B. japonicum*

As estirpes SEMIA-587, SEMIA-5019 e CB-1809 utilizadas neste experimento são provenientes da coleção do Laboratório de Microbiologia do Solo (CENA/USP), onde são catalogadas como C-99, C-147 e C-55, respectivamente. Elas foram usadas individualmente como inoculantes nos genótipos 'Bossier' e 'IAC-9', representantes do grupo precoce e tardio, respectivamente, totalizando seis tratamentos.

O ensaio foi conduzido na Seção de Microbiologia do Solo (CENA/USP), em casa de vegetação, com delineamento experimental inteiramente casualizado constando de quatro repetições por tratamento.

Foram usados portanto, 24 vasos de cerâmica

(capacidade para 2.000 ml). A mistura de vermiculita e areia estéreis na proporção 2:1 (v/v) foi o substrato das plantas. Nesta mistura foram adicionados 500 ml da solução de McKNIGHT (1949), descrita no ítem 3.3.5. Em cada vaso foram plantadas seis sementes, esterilizadas com álcool e hipoclorito de sódio (SOMASEGARAN e HOBEN, 1985) e lavadas com água destilada. O plantio foi feito a uma profundidade de 5 cm, com auxílio de uma pinça e bastão de vidro estéreis. Antes da inoculação foi realizado um desbaste das plantas emergentes, mantendo-se três plantas por vaso.

3.6.1. INOCULAÇÃO E MANUTENÇÃO DO EXPERIMENTO

As plantas foram inoculadas com 20 ml da cultura líquida (ítem 3.4.), na concentração aproximada de 2×10^8 células por ml, com o auxílio de uma pipeta estéril. Foi acrescentada uma camada de 0,5 cm de areia grossa esterilizada por vaso, a fim de proteger os tratamentos de contaminação e perdas por evaporação.

O experimento foi mantido por regas alternadas de água estéril e solução nutritiva, a cada 2 dias. No 15º dia após a emergência foram colocados tutores de madeira como suporte para o crescimento das plantas.

A colheita ocorreu 60 dias após o plantio, no início do período de floração. A parte aérea foi separada

do sistema radicular e levada para uma estufa a 60°C a fim de se obter o peso da matéria seca. Determinou-se então o N-total da planta pelo método semi-micro Kjeldahl (SARRUGE & HAGG, 1974).

3.6.2. OBTENÇÃO E PADRÃO DE NODULAÇÃO DE ISOLADOS DAS ESTIRPES SEMIA-587, SEMIA-5019 E CB-1809

Foram destacados 60 nódulos por tratamento (15 de cada repetição). Estes foram avaliados individualmente quanto a atividade específica da nitrogenase (AE) pelo método ARA, e peso (mg). Os nódulos restantes foram contados e pesados quanto à massa nodular seca.

Para a determinação da ARA cada nódulo foi colocado dentro de uma seringa descartável de 3 ml, previamente numerada e incubado por 30 minutos num volume total de 2 ml, composto de 90% de ar atmosférico e 10% de acetileno. O intervalo de tempo do início da incubação entre um nódulo e outro foi de um minuto após o que, foram injetados 0,5 ml da primeira amostra no cromatógrafo gasoso (item 3.5.2.) para o registro do pico de etileno formado. No minuto seguinte injetou-se a amostra referente ao segundo nódulo e assim sequencialmente até o término da incubação do último nódulo.

Foi avaliado a seguir o peso da matéria fresca de cada um dos nódulos (mg) para então determinar a AE

.41.

(nmoles de C_2H_4 /mg nódulo . hora). Os cálculos da AE foram os mesmos do ítem 3.5.2., substituindo-se apenas no fator K o número de plantas por 1 mg de cada nódulo.

As informações da AE e peso de cada nódulo foram organizada em classes de frequência para determinar o padrão de nodulação das três estirpes.

Os nódulos remanescentes do sistema radicular foram destacados, contados e pesados (Ítem 3.5.2.). A parte aérea foi separada da raiz e mantida em estufa ($60^{\circ}C$) até atingir peso constante, o qual foi aferido em gramas. Posteriormente o N-total da parte aérea foi determinado pelo método semi-micro Kjeldahl.

Para posterior seleção, os 60 nódulos de cada estirpe foram esterilizados. Considerando que a parede cortical dos nódulos da soja é espessa, a esterilização constou da flambagem dos mesmos após imersão em álcool 90° , com auxílio de uma pinça. Cada nódulo foi esmagado e seu conteúdo colocado para crescer em placas de Petri, com 20 ml de YMA acrescido de solução de vermelho congo.

As placas foram subdivididas em quatro partes, cada uma contendo a cultura de um nódulo.

As bactérias foram crescidas a $28^{\circ}C$ e submetidas a processo de purificação. Foram então mantidas em tu-

bos de ensaio, com YMA e óleo mineral estéril (VINCENT,1970), que prolonga o período de conservação da cultura.

3.7. AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO ENTRE ISOLADOS DA ESTIRPE SEMIA-587 E GENÓTIPOS DE SOJA

Dos experimentos de avaliação da soja (ítem 3.5.) foram selecionados 3 genótipos de cada grupo: 'Bossier', 'Planalto' e 'SOC-8176' (precoces) e 'IAC-9', 'Tropical' e 'G0 79-1084' (tardios).

Dos isolados obtidos da estirpe SEMIA-587 (mesma origem do ítem 3.6.), quatro foram escolhidos para serem testados neste ensaio: I e II procedentes do genótipo 'Bossier' e III e IV do genótipo IAC-9.

O experimento foi conduzido na Seção de Microbiologia do Solo (CENA/USP) em casa de vegetação sob as mesmas condições descritas no ítem 3.6., onde foram mantidas duas plantas por vaso após o desbaste.

Para cada grupo (precoce e tardio) foi feita a combinação de 3 fatores relativos à planta (correspondente aos 3 genótipos selecionados) e 3 fatores relativos à bactéria (que incluem os dois isolados e a estirpe original SEMIA-587), resultando em 9 tratamentos por grupo.

A coleta dos dados foi feita no início da flo-

.43.

ração da soja, 60 dias aproximadamente após a emergência. As raízes foram separadas da parte aérea e colocadas em frascos para determinação do valor de ARA (Ítem 3.5.2.). Os nódulos foram contados, sendo aferido o peso da matéria seca nodular (mg/planta) e da parte aérea (g/planta) assim como o N-total da planta conforme descrito no Ítem anterior.

Os caracteres acima descritos foram submetidos aos seguintes testes da análise multidimensional: Roy, Wilks, Hotelling-Lamley e Pillai (Ítem 3.5.4.), para verificar a hipótese da interação entre os materiais testados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. AVALIAÇÃO GENOTÍPICA DO HOSPEDEIRO NA NODULAÇÃO DA SOJA

Com o objetivo de verificar se os caracteres de nodulação e produtividade, apresentaram diferenças entre os conjuntos experimentais (C) em que foram cultivados os 68 genótipos precoces e 22 tardios foi feita uma análise da variância, cujos resultados são mostrados nas Tabelas 4 e 5. A ocorrência da não significância estatística entre C bem como a não interação dos conjuntos com as testemunhas comuns permitiu analisar os genótipos precoces e tardios como conjunto único de blocos ao acaso.

A inoculação mista das três estirpes de *B. japonicum* (SEMIA-587, SEMIA-5019 e CB-1809) provavelmente não provocou o aparecimento de genótipos inefetivos (simbiose não estabelecida), nem ineficiente (ausência da AN). Mesmo que o solo onde o experimento foi conduzido não tenha tido contato prévio

Tabela 4 - Análise de variância para testemunhas comuns do Grupo Precoce. Avaliação de caracteres de nodulação e produtividade. Delineamento de blocos casualizados com tratamentos organizados em conjuntos experimentais. Soja, Piracicaba, 1984/85.

FV	G.L.	Q.M.			
		Nodulação/Planta		Atividade da Nitrogenase (ARA) ¹ ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{pl.h}$)	Produtividade de (kg/ha)
		Número ¹	Matéria seca (mg)		
Conjuntos	3	0,0396 < 1	10051,223 < 1	0,0108 < 1	376302
Testemunhas	2	0,1635 < 1	57946,875	0,2129	2128907*
C x T	6	0,1889	18449,263	0,0305 < 1	234375
Repetição	1	0,1180	3266,670 < 1	0,0125	243055
Resíduo médio	11	0,0680	13731,306	0,0599	167535

¹Dados transformados em $\log (x + 1)$.

Tabela 5 - Análise da variância para testemunhas comuns do Grupo Tardio. Avaliação de caracteres de nodulação e produtividade. Delineamento de blocos casualizados com tratamentos organizados em conjuntos experimentais. Soja, Piracicaba, 1984/85.

FV	G.L.	Q.M.			
		Nodulação/Planta		Atividade da Nitrogenase (ARA) ¹ ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{pl.h}$)	Produtividade de (kg/ha)
		Número ¹	Matéria seca (mg)		
Conjuntos	1	0,0287 < 1	9351,997	0,0048	1085 < 1
Testemunhas	2	0,6792*	43086,540	0,1119**	8898 < 1
C x T	2	0,0188 < 1	3633,127	0,0011 < 1	92014 < 1
Repetição	1	0,2682	7956,000	0,0413**	
Resíduo médio	5	0,1004	5803,100	0,0035	100694

¹Dados transformados em $\log (x + 1)$.

com as estirpes utilizadas, ainda existiria a possibilidade da inoculação ter ocorrido naturalmente com estirpes nativas do solo, já é conhecido o fato de alguns genótipos de soja terem capacidade de nodulação promíscua.

Na Tabela 6 encontram-se as médias gerais para cada caráter avaliado bem como a amplitude de variação observada para os dois grupos. Observou-se uma relação inversa para número e peso dos nódulos entre os grupos, a qual refletiu no seu tamanho (mg/número), quatro vezes maior para os genótipos precoces. Ainda neste grupo verificou-se os maiores valores de ARA. Por outro lado, a produtividade média foi mais alta no grupo tardio. Este fato era esperado em função da correlação positiva entre ciclo e produtividade.

Serão considerados a seguir alguns tratamentos que se destacaram quanto à nodulação (Tabelas 7 e 8) e produtividade (Tabelas 9 e 10) nos dois grupos.

No grupo precoce (Tabela 7) os genótipos OC 79-20, OC 78-503, OCEPAR-2, Bossier, Pickett-71-NC e OC 79-136 alcançaram os maiores valores de contagem com iguais ou acima de 30 nódulos por planta. Os menores valores estiveram em torno de 10 nódulos por planta, representados por SOC 81-124, Santa Maria, BR-1(a), BR-4, IAC-12 e FT-6.

Tabela 6 - Médias e amplitude de variação de 69 genótipos precoces e 22 tardios avaliados em campo para caracteres de nodulação e produtividade. Soja. Piracicaba, 1984/85.

	Grupo precoce		Grupo tardio	
	Média ¹	Intervalo de Variação	Média ²	Intervalo de Variação
- Número	17	5 - 32	45	116 - 5
Nodulação/planta	208	73 - 448	141	317 - 9
- Matéria seca (mg)				
Atividade da N ₂ -ase (ARA) (μmol C ₂ H ₄ /pl.h)	3,49	0,82 - 9,89	1,21	3,10 - 0,26
Produtividade (kg/ha)	2223	1410 - 3237	3026	3653 - 550

¹Média de 69 amostras.

²Média de 22 amostras.

Tabela 7 - Avaliação em campo dos 68 genótipos precoces de soja, inoculados com a mistura das estirpes SEMIA-5019, SEMIA-587 e CB-1809. Caracteres de nodulação. (Média de 2 repetições). Piracicaba, 1984/85.

Tratamento	Genótipo	Nodulação/Planta		Atividade da Nitrogenase (ARA) ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{pl.h}$)
		Número	Matéria seca (mg)	
1	SOC 81-124	8	111	2,32
2	Sulina	14	230	5,42
3	FT 81-2163	18	294	4,56
4	Década	19	331	2,21
5	La 49-10215	16	270	6,50
6	Jackson	18	226	2,26
7	Cobb	13	130	3,74
8	Davis	11	328	8,35
9	Foster	14	164	3,06
10	BR 80-14887	17	176	3,45
11	Santa Maria	9	123	3,00
12	BR-1 (a)	5	94	1,68
13	CEPS 7716	13	198	2,88
14	FT 81-2136	10	152	1,49
15	OC 79-7	14	182	3,92
16	Dourados	17	278	2,96
17	Kirby	13	118	1,52
18	GO 81-8102	17	320	4,22
19	OC 79-230	21	311	1,85
20	OC 79-20	31	298	4,91
21	IPAGRO 20	21	394	3,87
22	OC 78-503	32	256	6,81
23	Pickett-71 (a)	12	152	2,44
24	BR-1 (b)	12	88	0,82
25	OCEPAR 2 - IAP0	31	157	4,62
26	OC 79-5	22	254	4,86
27	TN 82-273	28	275	4,16
28	OC 795	26	178	5,61
29	Biloxi	18	262	1,45
30	BR-1 - Fosca	21	146	3,51
31	SOC 81-145	19	232	4,52
32	OC 79-504	17	171	3,22
33	FT 79-3408	16	208	3,31
34	Planalto	19	432	3,68
35	FT-5	11	101	1,12
36	FT 79-3415	27	205	3,44
37	Bossier	32	214	2,51
38	BR-4	6	100	1,28
39	União	10	131	3,08
40	GO 81-8106	14	212	3,54
41	Tiaraju	15	156	1,71
42	BR-7	12	96	2,12
43	Centennial	17	200	3,54
44	Pickett 71 (b)	30	248	4,31
45	Ax 53-55	22	214	3,94
46	IAC-12	8	123	2,46
47	Pérola	17	448	4,62
48	OC 79-84	12	100	2,13
49	CNS	10	144	1,11
50	BR-6	24	182	3,92
51	OC 79-136	32	342	4,51
52	SOC 81-228	26	334	5,92
53	FT-2	16	218	9,89
54	IAC-1	16	216	4,06
55	PI 322-694	15	233	3,98
56	GO 81-11075	19	268	3,33
57	SOC 81-119	13	109	1,23
58	FT 81-2706	15	194	5,59
59	OC 79-493	16	149	1,99
60	FT-1	17	105	1,26
61	SOC 81-105	22	304	3,56
62	FT-7	26	216	4,59
63	BR 80-6935	15	162	2,10
64	FT-6	7	237	2,81
65	FT-9	28	206	4,22
66	SOC 81-76	11	74	1,39
67	Kershaw	24	280	3,52
68	Batarian Yellow	19	223	5,28
MÉDIA GERAL		17	208	3,49

Tabela 8 - Avaliação em campo dos 22 genótipos tardios de soja inoculados com a mistura das estirpes SEMIA-5019, SEMIA-587 e CB-1809. Caracteres de nodulação (média de duas repetições). Piracicaba, 1984/85.

Tratamento	G e n ó t i p o	Nodulação/Planta		Atividade da nitrogenase (ARA) ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4$) pl./h)
		Número	Matéria seca (mg)	
69	UFV-1	16	55	0,76
70	Cristalina-2	60	220	1,64
71	UFV-5	29	123	1,14
72	BR 79-63	58	138	1,38
73	Paranagoiana	11	62	0,59
74	IAC-9	52	116	1,91
75	Timbira 1	110	298	1,82
76	BR-10	55	172	0,81
77	TN 82-264	15	96	0,58
78	Numbaíra	25	98	0,26
79	GO 79-1039	26	129	0,37
80	UFV-Araguaia	47	100	1,12
81	PI 240-664	55	178	2,11
82	EMGOPA	63	168	1,74
83	Doko	38	95	0,80
84	UFV-2	26	54	0,38
85	BR-11	116	293	1,46
86	Tropical	47	317	3,10
87	UFV-3	99	246	2,98
88	GO 79-1084	5	9	0,32
89	Timbira-2	9	41	0,37
90	Cristalina-1	27	96	0,94
MÉDIA GERAL		45	141	1,21

Tabela 9 - Produtividade dos 68 genótipos precoces de soja. Piracicaba, 1984/85.

Tratamento	Genótipo	Produção ¹ (kg/ha)	Tratamento	Genótipo	Produção ¹ (kg/ha)
6	Jackson	3237	12	BR-1 (a)	2239
39	União	3177	40	GO 81-8106	2229
37	Bossier	3139	47	Pérola	2212
53	FT-2	3043	52	SOC-81-228	2212
33	FT 79-3408	3022	41	Tiaraju	2210
17	Kirby F-77	2785	32	OC 79-504	2208
8	Davis	2766	4	Década	2198
20	OC 79-20	2722	14	FT 81-2136	2171
9	Foster	2687	26	OC 79-11	2150
16	Dourados	2687	63	BR 80-6935	2133
7	Cobb	2662	67	Kershaw	2089
25	Ocepar 2 - IAP0	2620	30	BR-1 Fosca	2039
28	OC 79-5	2580	13	CEPS 7716	2016
18	GO 81-8102	2553	51	OC 79-136	1993
46	IAC-12	2524	56	GO 81-11075	1958
2	Sulina	2522	10	BR 80-14887	1956
54	IAC-1	2506	31	SOC 81-145	1903
55	PI 322 694	2436	60	FT-1	1900
34	Planalto	2422	21	IPAGRO-20	1850
66	SOC-81-76	2408	62	FT-7	1841
68	Batavian Yellow	2405	44	PICKETT 71(CN)	1820
61	SOC 81-105	2364	43	Centennial	1804
65	FT-9	2351	42	BR-7	1787
5	La 49-10215	2348	1	SOC 81-124	1777
22	OC 78-503	2339	57	SOC 81-119	1773
50	BR-6	2325	3	FT 81-2163	1750
19	OC 79-230	2320	23	PICKETT 71(UT)	1583
48	OC 79-84	2318	38	BR-4	1574
29	BILOXI	2308	27	TN 82-273	1550
45	AX 53-55	2304	64	FT-6	1548
35	FT-5	2303	15	OC 79-3	1509
58	FT 81-2706	2269	11	Santa Maria	1443
36	FT 79-3415	2248	59	OC 79-493	1433
24	BR-1 (b)	2240	49	CNS	1410
				MÉDIA GERAL	2223

¹Média de duas repetições.

Tabela 10 - Produtividade dos 22 genótipos tardios de soja
Piracicaba, 1984/85.

Tratamento	Genótipo	Produtividade (kg/ha) ¹
70	Cristalina-2	3653
73	Paranagoiana	3608
82	EMGOPA	3601
78	Numbaíra	3595
84	UFV-2	3553
80	UFV-Araguaia	3493
69	UFV-1	3443
74	IAC-9	3358
79	GQ 79-1039	3289
71	UFV-5	3285
76	BR-10	3170
85	BR-11	3101
86	Tropical	3024
72	BR 79-63	3000
87	UFV-3	2945
90	Cristalina-1	2868
75	Timbira 1	2814
83	Doko	2795
89	Timbira 2	2564
88	GQ 79 1084	2529
81	PI 240 664	2335
77	TN 82-264	550
MÉDIA GERAL		3026

¹Média de 2 repetições.

Quanto ao peso nodular (Tabela 7), dois genótipos atingiram valores acima de 400 mg por planta que foram Planalto e Pérola, os quais refletem o alto potencial de nodulação da soja em campo e embora o menor valor tenha sido de 70 mg (SOC 81-76), 90% dos genótipos estiveram entre 100 e 300 mg por planta. Esta predominância correspondeu ao melhores resultados de campo obtido por HARDARSON *et alii* (1984), superando os valores encontrados por LOPES & GIARDINI (1976) e PERES & VIDOR (1980), em experimento de casa de vegetação.

Nodulação exuberante segundo PULVER *et alii* (1982) refletiria uma combinação altamente específica entre cultivares e estirpes de comprovada eficiência simbiótica.

Os dados de ARA (Tabela 7) apresentaram valores baixos em relação ao elevado peso de nódulos. Embora tenha havido correlação positiva e significativa entre eles ($r = 0,387^{**}$), a mesma foi de baixa magnitude. Os dados sugerem que o custo de produção da elevada massa nodular não correspondeu a uma AN igualmente intensa, conforme os dados de HARDARSON *et alii* (1984), obtidos em condições de campo. Isto implicaria em uma atividade específica baixa ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{mg}$ nódulo), ao contrário dos resultados obtidos por LAWN & BRUN (1974). Apenas FT-2 atingiu $9,89 \mu\text{moles de C}_2\text{H}_4/\text{pl.h}$, seguido por La 49-10215, OC 78-503 e SOC 81-228 com valores em torno de $6 \mu\text{moles de C}_2\text{H}_4/\text{pl.h}$, que representaram os melhores

resultados de ARA. O único genótipo com menos de 1 μmol de $\text{C}_2\text{H}_4/\text{pl.h}$ foi o BR-1 (b). A média dos demais tratamentos foi 3,43.

É notório o fato de que nenhum genótipo tenha se destacado simultaneamente para os três caracteres de nodulação neste grupo.

A Tabela 8 apresenta as médias de nodulação dos genótipos tardios. O número máximo observado esteve acima de 100 nódulos por planta (superior ao encontrado no grupo precoce) referente a Timbira-1 e BR-11, enquanto que Paranagoiana (11 nódulos), Timbira 2 (9 nódulos) e G0 79-1084 (5 nódulos) registraram os menores valores por planta.

Para o peso de nódulos (Tabela 8), entretanto, ocorreu uma diminuição do valor médio quando comparado ao grupo precoce. Os genótipos Timbira-1, BR-11 e UFV-3, que representaram 18% dos genótipos tardios, apresentaram peso de nódulos acima de 200 mg por planta, sendo que somente salientou-se o Tropical, atingindo 317 mg por planta. Por outro lado, apenas G0 79-1084 apresentou um valor muito baixo, com 9 mg por planta. Pouca variação foi verificada para os demais genótipos (média de 119 mg/pl.).

Dados de ARA foram ainda menores neste grupo, conforme a Tabela 8, pois 50% do total não chegaram a apresentar 1 μmol de $\text{C}_2\text{H}_4/\text{pl.h}$. Aqui também o genótipo Tropical, apresentou o valor máximo: 3,10 μmoles de $\text{C}_2\text{H}_4/\text{pl.h}$ e revelou

ser um dos melhores genótipos quanto à nodulação.

As Tabelas 9 e 10 apresentam os dados de produtividade (kg/ha) listados de forma crescente nos grupos precoce e tardio, respectivamente.

No grupo precoce (Tabela 9) cinco tratamentos estiveram acima de 3.000 kg/ha; Jackson (3.237 kg/ha), União (3.177 kg/ha), Bossier (3.139 kg/ha), FT-2 (3.043 kg/ha) e FT 79-3408 (3.022 kg/ha). Abaixo de 1.400 kg/ha foram para Santa Maria, OC 79-493 e CNS, que representaram os menores valores.

Ao serem comparados os dados de nodulação (Tabela 7) com a produtividade (Tabela 9) não se evidenciou uma relação direta entre ambos. Apenas FT-2 coincidiu alta produtividade com um valor de ARA mais intenso. Entretanto, a ausência de correlação (Tabela 12) entre a produtividade e os demais caracteres avaliados sustenta a idéia de que neste caso os benefícios da simbiose não estariam afetando a produtividade.

Para o grupo tardio (Tabela 10) tornou-se evidente maiores valores de produtividade que no grupo precoce, sendo que aqui 60% dos genótipos apresentaram produtividade média superior a 3.000 kg/ha. Os genótipos restantes estiveram acima de 2.000 kg/ha, exceto o material TN 82-264 que apresentou um valor discrepante: 550 kg/ha. Este resultado poderia ser explicado pelo fato desta linhagem ter sido intro

duzida, como genótipo tolerante ao complexo de acidez do solo, da "The University of Tennessee" em 1983 e portanto não adaptada às condições ambientais brasileiras (Vello¹).

Também neste grupo foi clara a independência dos efeitos da simbiose com a produtividade. Sobretudo pelo valor médio encontrado para a massa nodular e ARA.

Os resultados da análise da variância, para cada caráter dos dois grupos de genótipos (precoce e tardio) estão na Tabela 11. No grupo precoce não foram detectadas diferenças significativas quanto ao número de nódulos e produtividade. Este fato pode ser justificado através da pequena variação entre genótipos observada para ambos (Tabelas 7 e 8).

Para os caracteres de nodulação do grupo tardio não foi observada diferença significativa somente para a massa nodular; isto ocorreu provavelmente devido ao menor número de tratamentos em relação ao grupo precoce. Por outro lado, a diferença acusada entre os genótipos quanto à produtividade ocorreu em função do valor discrepante apresentado pelo genótipo TN 82-264.

Correlação significativa (Tabelas 12) foi verificada nos dois grupos para número e peso de nódulos ($r=0,560^{**}$ para o precoce e $r=0,744^{*}$, para o tardio). Estes resultados

¹VELLO, N.A. (Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP, Piracicaba, SP.). Comunicação Pessoal, 1987.

Tabela 11 - Análise da variância para os caracteres de nodulação e produtividade dos genótipos precoces e tardios. Soja. Piracicaba, 1984/85.

Grupo de Maturação	FV	G.L.	Q.M.			
			Nodulação/Planta		Atividade da nitrificação (ARA) ¹ ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{pl.h}$)	Produtividade de (kg/ha)
			Número ¹	Matéria seca (mg)		
Precoce	Genótipos	67	0,0633	14443,66**	0,0527**	375854
	Resíduo	68	0,0548	4577,29	0,0261	279662
Tardio	Genótipos	21	0,1931**	15091,40	0,0433*	907532**
	Resíduo	22	0,0605	10597,80	0,0181	185792

¹Dados transformados em $\log (x + 1)$.

Tabela 12 - Valores de correlação residual obtidos pela associação entre caracteres de nodulação e produtividade para os genótipos precoces e tardios de soja. Piracicaba, SP. 1984/85.

		Atividade da N ₂ -ase(ARA) (μ mol C ₂ H ₄ /pl.h)	Peso de nódulos (mg/pl.)	Produtividade (kg/ha)
Número (nódulos/planta)	(Precoco ¹)			
	(Tardio ²)			
AN (μ mol C ₂ H ₄ /pl.h)	(Precoco)	0,454**	0,560**	- 0,156
	(Tardio)	0,635	0,744*	- 0,230
	(Precoco)	-	0,387	- 0,034
	(Tardio)	-	0,589	- 0,497
Peso de nódulos (mg/pl.)	(Precoco)	-	-	- 0,231
	(Tardio)	-	-	- 0,184

¹ 66 gl.

² 18 gl.

contestaram a relação inversa entre estes dois parâmetros sugerida por NUTMAN (1981). As demais medidas de associação positiva e significativa entre caracteres de nodulação ocorreram no grupo precoce, muito embora os coeficientes de correlação tenham sido baixos (menos que 0,5). No grupo tardio os coeficientes foram mais altos e embora não significativos indicariam relação positiva de ARA com número e peso de nódulos.

Os valores de produtividade foram elevados (HAM *et alii*, 1975; PULVER *et alii*, 1982) especialmente no grupo tardio (Tabela 10), mas não estão correlacionados aos dados de nodulação. NEVES *et alii* (1985) não encontraram relação entre peso de nódulos e produção de grãos. Também DUQUE *et alii* (1982) não verificaram relação entre produtividade e rendimento específico de grão (kg grão/kg N) para cultivares de soja dependentes da fixação simbiótica do N₂.

Os baixos valores de ARA para a soja confirmam os resultados acima obtidos. Entretanto, o fato das plantas não terem apresentado sintomas de deficiência em N₂ impediria afirmações conclusivas quanto à ineficiência simbiótica neste experimento. A própria avaliação da AN pode ter contribuído para estes resultados, uma vez que esteve sujeita à extrema variação ambiental nas condições de campo. Por outro lado, o método ARA expressa benefícios transitórios da simbiose (LAW & BUSHBY, 1982; PACOVSKY *et alii*, 1984), além de desconsiderar a energia des-

viada para a evolução do H_2 , que pode ser influenciada pelo genótipo do hospedeiro.

O conjunto de todas as características avaliadas para os genótipos precoces (Figura 2) e tardios (Figura 3), quando submetidos à análise multidimensional, foram discriminados graficamente quanto à variação máxima ocorrida entre eles.

No grupo precoce (Figura 2) não foram detectados claramente genótipos com comportamento inferior. Entretanto os tratamentos nº 34 (Planalto) e nº 47 (Pêrola) foram discriminados positivamente. Eles apresentaram altos valores de peso de nódulos e ARA (Tabela 7), o que fornece indícios de constituírem materiais promissores para estudos da simbiose em programas de melhoramento.

No grupo tardio (Figura 3) os tratamentos nº 85 (BR-11), nº 86 (Tropical) e nº 87 (UFV-3) foram os melhores, enquanto que os de nº 77 (TN 82-264) e nº 81 (PI 240664) foram visivelmente inferiores. A discriminação negativa destes genótipos poderiam estar ocorrendo em função dos mesmos representarem material exótico, não adaptado às condições ambientais brasileiras, sobretudo quanto à produtividade. Isto sugere que a análise multidimensional empregada como ferramenta para a seleção genotípica para a fixação do N_2 poderia considerar somente variáveis diretamente relacionadas à nodulação; com base

Análise Discriminante

Figura 2 - Discriminação gráfica dos 68 tratamentos correspondentes aos genótipos precoces de soja submetidos à análise multidimensional (variáveis de número, peso dos nódulos, atividade da nitrogenase e produtividade).

Análise Discriminante

Figura 3 - Discriminação gráfica dos 22 tratamentos correspondentes aos genótipos tardios de soja submetidos à análise multidimensional (variáveis dependentes: número e peso de nódulos, atividade da nitrogenase e produtividade).

nisto dados de produtividade poderiam ser excluídos desse tipo de análise.

Os resultados aqui apresentados permitiram concluir que existe variabilidade na fixação do N_2 em diferentes genótipos. Entretanto, não foi possível atribuir esta variação so mente às diferenças genéticas. Provavelmente, isto ocorreu porque a nodulação, especialmente a AN, possuiria herança quantitativa (HOLL, 1983) e, como tal, seria extremamente sujeita aos efeitos do ambiente. Esta influência poderia ter sido controlada com o emprego de maior número de repetições.

Outros trabalhos desta natureza tem sido conduzidos (PEREIRA *et alii*, 1984) com o objetivo de explorar o potencial da leguminosa e orientar a seleção de cultivares ou parentais usados em programas de melhoramento (TEMPLE *et alii*, 1986; ROSAS & BLISS, 1987). O simples processo de seleção massal para caracteres associados à fixação do N_2 poderia significar mudanças na preferência da leguminosa por estirpes mais eficientes (HARDARSON *et alii*, 1982).

Na literatura são escassas as informações a respeito de extensa avaliação genotípica para a fixação do N_2 em soja (WACEK & BRILL, 1976). Por esta razão, a presente pesquisa, embora apresente restrições advindas da condição de campo e variação biológica do material testado, poderá servir de base para a seleção de características satisfatórias de nodulação.

A avaliação de outros caracteres que medem o grau de eficiência simbiótica tais como o N total da planta, transporte de ureídeos (NEVES *et alii*, 1985) e métodos com isótopos ^{15}N , poderão confirmar a eficácia da seleção no campo.

4.2. EFICIÊNCIA SIMBIÓTICA DAS ESTIRPES DE *B. japonicum*

No estudo do comportamento médio individual das estirpes SEMIA-587, SEMIA-5019 e CB-1809 (Tabela 13) verificou-se que a primeira sobressaiu-se às demais quanto ao número de nódulos por planta e tamanho médio unitário. A CB 1809 apresentou AN mais intensa aos 60 dias após o plantio. De um modo geral, não houveram diferenças relativas à parte aérea, indicando que todos os tratamentos mantiveram um mesmo nível de eficiência simbiótica.

Quanto aos genótipos Bossier (precoce) e IAC-9 (tardio) não foram observadas diferenças marcantes quanto à nodulação e rendimento da parte aérea (Tabela 13).

Os resultados de médias das três estirpes inoculadas nos dois genótipos representativos de cada grupo de maturação da soja encontram-se nas Tabelas 14 e 15.

Quanto aos caracteres da parte aérea (Tabela 14) não se observou grande variação entre os dois grupos,

Tabela 13 - Valores médios de nodulação e parte aérea das 3 estirpes de *B. japonicum* e dos genótipos representantes dos grupos precoce (Bossier) e tardio (IAC-9) em casa de vegetação, 60 dias após plantio. Piracicaba, 1986.

	Nodulação/Planta			Atividade da nitro- genase (ARA) ¹ (nmol C ₂ H ₄ /mg nódulo.h)	Parte aérea		
	Núme- ro	Matéria seca (mg)	Tamanho ¹ (mg/nódulo)		Matéria seca (g/pl.)	N (%)	N-total (mg/planta)
<u>ESTIRPE</u>							
CB-1809	83	518	38,25	4,77	14,17	2,89	410
SEMIA-5019	111	734	39,94	1,56	12,60	2,90	365
SEMIA-587	125	570	50,71	3,14	13,40	2,65	355
<u>GRUPO</u>							
<u>PRECOCE</u>							
- Bossier	125	630	35,75	3,33	13,22	2,79	371
<u>GRUPO</u>							
<u>TARDIO</u>							
- IAC-9	88	584	50,19	4,30	13,56	2,84	383

¹Dados calculados na média de 60 nódulos individuais.

Tabela 14 - Eficiência simbiótica de 3 estirpes de *B. japonicum* inoculadas nos genótipos de soja Bossier (precoce) e IAC-9 (tardio), crescidos em casa de vegetação, aos 60 dias após o plantio. 1- Caracteres da parte aérea (média de quatro repetições).

	Estirpe	Parte Aérea ¹		
		Matéria seca (g/planta)	N (%)	N-total (mg/planta)
Grupo Precoce	CB-1809	14,88 b	2,93a	435 b
	SEMIA-5019	12,52a	2,78a	348a
	SEMIA-587	12,25a	2,67a	329a
Grupo Tardio	CB-1809	13,46a	2,86a	384a
	SEMIA-5019	12,68a	3,02 b	382a
	SEMIA-587	14,54a	2,63a	382a
DMS (Tuckey 5%)		2,32	0,37	85

Tabela 15 - Eficiência simbiótica de 3 estirpes de *B. japonicum* inoculados nos genótipos de soja Bossier (precoce) e IAC-9 (tardio), crescidos em casa de vegetação, aos 60 dias após o plantio. II- Caracteres de nodulação (média de quatro repetições).

	Nodulação/Planta			Atividade específica da nitrogenase (ARA) (nmol C ₂ H ₄ /mg nódulo.h) ²
	Número ¹	Matéria seca (mg)	Tamanho ² (mg/nódulo)	
Grupo Precoce	CB-1809	10,4a	602,5a	31,65
	SEMIA-5019	11,2a	671,8a	32,56
	SEMIA-587	11,8a	552,5a	43,04
Grupo Tardio	CB-1809	7,5a	432,5a	44,85
	SEMIA-5019	9,9a	732,5a	47,33
	SEMIA-587	10,4a	587,5a	58,38
DMS (Tukey 5%)	2,41	389,0		

¹Dados transformados em $\sqrt{x + 0,5}$

²Dados baseados na média de 60 nódulos individuais.

confirmando o exposto na Tabela 13. O desempenho das estirpes dentro de cada grupo expressa a superioridade estatisticamente significativa da CB 1809 quanto ao peso da matéria seca e N-total (em mg) da parte aérea, dentro do grupo precoce o que não ocorreu no grupo tardio.

Somente a SEMIA-5019 (Tabela 14) apresentou diferença significativa quanto à porcentagem de N na planta. Entretanto, a razão entre o N (%) por unidade de peso da parte aérea (mg) não mantém esta diferença em relação às duas outras estirpes. A baixa variação ocorrida na avaliação destes parâmetros poderia ser explicada pela utilização de estirpes de comprovada eficiência simbiótica (PERES & VIDOR, 1986). As diferenças que ocorreram poderiam ser atribuídas à interação entre a bactéria e o genótipo da leguminosa, conforme já foi antes relatado por outros autores (PERES & VIDOR, 1980; DUQUE *et alii*, 1982).

Para os caracteres de nodulação (Tabela 15) destacaram-se os maiores valores no grupo tardio do quanto ao tamanho unitário e sobretudo para ARA.

Entretanto, dentro de cada grupo não apareceram as mesmas diferenças observadas para o rendimento da parte aérea (peso (g/planta), N-total (% e mg/pl)). Existe assim evidências de que a estirpe SEMIA-5019 estaria fixando menores quantidades de N_2 na época da amostragem. Os resultados desta Tabela 15 contrariam a diferença discrepante observada por NEVES *et alii*

(1985) entre peso nodular da CB 1809 e SEMIA-5019 (ou 29W), que dividiu-as em dois diferentes grupos quanto à eficiência simbiótica.

A Tabela 16 apresenta os valores absolutos e específicos da nitrogenase (método ARA) para a média de 60 nódulos avaliados individualmente. Logo, estes resultados forneceram somente uma estimativa do sistema radicular completo. Embora o método apresente restrições relativas à quantificação da atividade enzimática (SCHUBERT & EVANS, 1977) foi possível estabelecer um padrão de comparação das estirpes intra e intergrupos.

A primeira diferença visível ocorreu para os maiores valores apresentados pelo grupo tardio. Houve também um incremento significativo para a SEMIA-587, onde a atividade absoluta foi quatro vezes maior que a observada no grupo tardio. Segundo VILLAMIL (1986) este é um indicativo de que existe alta atividade fixadora em pleno florescimento, consequência de uma maior persistência nodular em determinados genótipos.

Embora cada ciclo (precoce e tardio) esteja aqui representado por um genótipo, não pode ser excluída a possibilidade de que a maturação precoce na soja estaria restrinjindo os benefícios da fixação. Por outro lado, poderia estar revertendo mais rapidamente os fotossintatos supridos ao nódulo pa

Tabela 16 - Atividade da nitrogenase absoluta e específica das 3 estirpes de *B. japonicum* inoculadas nos grupos precoce (Bossier) e tardio (IAC-9) de soja, 60 dias após plantio. Piracicaba, 1986.

Grupo	Estirpe	Atividade da Nitrogenase ¹	
		Absoluta (nmoles C ₂ H ₄ /nódulos.h)	Específica (nmoles C ₂ H ₄ /mg de matéria fresca nódulos.h)
Precoce	- CB-1809	146,80	3,95
	- SEMIA-5019	16,73	0,47
	- SEMIA-587	71,09	1,61
Tardio	- CB-1809	246,36	5,59
	- SEMIA-5019	138,76	2,65
	- SEMIA-587	269,50	4,66

¹Dados calculados na média de 60 nódulos individuais.

ra o enchimento de grãos. No presente experimento a não observação de sintomas de deficiência do N_2 nas plantas conduziu à segunda hipótese.

4.2.1. PADRÃO DE NODULAÇÃO: ATIVIDADE E TAMANHO

De cada uma das três estirpes de *B. japonicum* foram avaliados 60 nódulos por grupo quanto à atividade específica da nitrogenase (expressa em $\text{nmol C}_2\text{H}_4/\text{mg}$ de nódulo.h) e ao tamanho nodular ($\text{mg}/\text{nódulo}$). A distribuição dos mesmos em classes de frequência para os dois caracteres pode ser visualizada nas Figuras 4, 5 e 6.

A estirpe CB 1809 (Figura 4) assumiu padrão de normalidade para a atividade nodular. Os valores médios foram de 7 e 6 nmoles de $\text{C}_2\text{H}_4/\text{mg}$ nódulo.h, nos grupos 1 e 2, respectivamente.

Em ambos, os valores máximos de ARA excederam 12 nmoles $\text{C}_2\text{H}_4/\text{mg}$ nódulo.h). Entretanto, o tamanho nodular, apresentou uma concentração maior de nódulos entre 30 e 40 mg no grupo precoce e 45 mg no grupo tardio, cuja distribuição foi mais equilibrada. Tais resultados confirmam as boas características simbióticas atribuídas à esta estirpe (NEVES *et alii*, 1985). Entretanto, sua alta especificidade tem restringido muitas vezes seu potencial simbiótico quando inoculada em certos cultiva-

Figura 4 - Padrão de atividade (nmol de C₂H₄/mg nódulo.hora) e tamanho (mg/nódulo) de 60 nódulos individuais da estirpe CB-1809 de *B. japonicum* inoculada nos genótipos de soja Bossier (precoce) e IAC-9 (tardio).

Figura 5 - Padrão de atividade (nmol de C₂H₄/mg nódulo.hora) e tamanho (mg/nódulo) de 60 nódulos individuais da estirpe SEMIA-5019 de *B. japonicum*, inoculada nos genótipos de soja Bossier (precoce) e IAC-9 (tardio).

Figura 6 - Padrão de atividade (nmol de C₂H₄/mg nódulo.hora) e tamanho (mg/nódulo) de 60 nódulos individuais da estirpe SEMIA-587 de *B. japonicum* inoculada nos genótipos de soja Bossier (precoce) e IAC-9 (tardio).

res de soja como o cv. IAC-2 (PERES & VIDOR, 1980).

Para as estirpes SEMIA-5019 (Figura 6) e SEMIA-587 (Figura 7) verificou-se alta frequência de nódulos com baixa atividade no grupo precoce. Tal comportamento refletiu em uma distribuição assintótica visivelmente deslocada à esquerda. Resultados similares foram observados por VILLAMIL (1986) em *R. phaseoli*.

A mesma tendência não foi observada para o grupo tardio, cuja distribuição é contínua, assim como na CB-1809.

A SEMIA-5019 (Figura 5) apresentou 80% dos nódulos com atividade abaixo de 1 nmol C_2H_4 /mg nódulo.h no grupo precoce, não chegando a 4 nmoles os valores máximos. Em contraposição, o tamanho nodular não se restringiu a uma única classe, ainda que 72% tenham estado entre 10 e 40 mg.

A presença de nódulos grandes com aparente eficiência, aliada à alta frequência de atividade nodular baixa permitiria sugerir a existência de uma nodulação precoce onde o período de florescimento não coincidiu com o pico de atividade máxima da nitrogenase. Esta hipótese justificaria os dados encontrados na Tabela 13.

No grupo tardio a curva de distribuição para atividade mostrou-se contínua, com valor médio de 3 e máximo de 7 nmoles de C_2H_4 /mg nódulo.h. Da mesma maneira, o ta-

manho nodular apresentou maior variação na frequência, atingindo até 120 mg/nódulo. O visível decréscimo ocorrido para a classe de 50 mg não implicou em correspondente queda de atividade devendo, por isso, ter sido casual.

Para a SEMIA-587 (Figura 6), embora tenha havido a mesma tendência assintótica de atividade específica na combinação com o genótipo Bossier que a SEMIA-5019, a alta frequência ocorreu para nódulos de até 3 nmoles de C_2H_4 /mg nódulo.pl. A distribuição do tamanho nodular acusou maior concentração em torno de 20 mg sendo, no entanto, contínua até 100 mg por nódulo.

O comportamento similar ocorrido para estas duas estirpes em um mesmo genótipo de soja veio reforçar a possibilidade de estar havendo interação entre os simbiossomas que determina um ciclo de maturação precoce. A detecção de maiores benefícios à planta, oriundos deste tipo de associação requerem a determinação do transporte de ureídeos da parte aérea, N-total das vagens assim como taxa de evolução do H_2 (HUNGRIA & NEVES, 1986) que permitiriam expor eventuais diferenças não acusadas na presente avaliação.

Os resultados da SEMIA-587 para o grupo tardio indicaram uma curva com tendência de normalidade, tanto para atividade como para o tamanho dos nódulos. O valor médio da atividade (6 nmoles C_2H_4 /mg nódulo.h) foi semelhante ao encontrado para a CB-1809, embora a curva da SEMIA-587 tenha sido

um pouco mais deslocada à esquerda. Também nesta combinação apareceram nódulos que chegaram a apresentar 11 nmol de C_2H_4 /mg nódulo.h.

O tamanho, embora não tenha revelado uma continuidade na distribuição dos nódulos quanto ao número de classes de frequência, atingiu valores de até 110 mg por nódulo.

A tendência de normalidade apresentada para todas as estirpes testadas no genótipo representante do grupo tardio poderia sugerir um tipo de interação diferente do observado no grupo precoce para SEMIA-5019 e SEMIA-587). Segundo VILLAMIL (1986) a alta frequência de nódulos aparentemente inativos poderia ser um indicativo de nodulação precoce, enquanto que uma distribuição mais equilibrada poderia refletir um ciclo de nodulação tardia.

Também PERES *et alii* (1984) encontraram diferentes padrões de nodulação em duas estirpes de *R. japonicum*. A distribuição assimétrica de uma delas poderia ter ocorrido devido à desconsideração da evolução do H_2 pelo método ARA, o qual superestima a AN. Por esta razão, tal método não poderia ser recomendado para uma avaliação segura da variabilidade intrínseca de qualquer estirpe. Também, a variação encontrada quanto à fixação do N_2 para nódulos individuais numa mesma planta poderia ser ocasionada por fatores ambientais como o maior suprimento de açúcares aos nódulos da raiz principal ou à maior quantidade de água disponível na porção

inferior dos vasos. Segundo PACOVSKY³ a falta de um controle mais rigoroso para estes efeitos não permitiria concluir que a variabilidade observada é devida somente às diferenças genéticas das estirpes.

As características gerais da cinética de nodulação (ciclo precoce) das estirpes SEMIA-5019 e SEMIA-587 confirmaram os seus atributos de alta competitividade por sítio de infecção nodular (PERES & VIDOR, 1986).

A nodulação exuberante observada neste experimento comprovou também o componente auto regulador sugerido por NUTMAN (1981), o qual restringiria o número de infecções para garantir a formação de nódulos grandes e mais espaçados no sistema radicular. Tal padrão de nodulação definiria a associação soja x *B. japonicum* como sendo um sistema eficiente na fixação do N₂.

4.3. INTERAÇÃO SIMBIÓTICA ENTRE ISOLADOS DA ESTIRPE SEMIA-587 E GENÓTIPOS DE SOJA

Foram selecionados dois isolados ao acaso da SEMIA-587 a partir das curvas de frequência de ARA obtidas no estudo anterior: uma relativa ao grupo precoce (isolados I e II) e outra ao grupo tardio (isolados III e IV).

³PACOVSKY, R.S. (U.S. Department of Agriculture/Albany, California). Comunicação Pessoal, 1987.

.79.

Através de experimento em casa de vegetação estes isolados foram testados em três genótipos de soja, os quais representaram comportamento diferencial de nodulação em campo: Planalto, Bossier e SOC 81-76 (grupo precoce) e Tropical, IAC-9 e GO 79-1084 (grupo tardio) considerados de nodulação boa, média e fraca, respectivamente. Os genótipos Bossier e IAC-9 foram tomados como padrão para comparação com os demais, em cada grupo.

Não foi detectada a presença de interação B x G significativa (Tukey $P < 0,01$) onde B referiu-se à SEMIA-587 e seus isolados e G aos genótipos de soja, através de estudo fatorial realizado. Resultado semelhante foi verificado tanto pela análise da variância para cada um dos caracteres de nodulação e rendimento da parte aérea (Tabela 17) como pelos testes da análise multidimensional (Tabela 18), que considerou todos os caracteres avaliados simultaneamente.

Na presente condição experimental a ausência de interação entre os materiais testados não está associada ao reconhecimento dos simbioss, uma vez que não ocorreram combinações inefetivas, mas esta foi atribuída à falta de combinações simbióticas que tivessem se distinguido dos demais tratamentos. Efeito similar foi verificado por PACOVSKY (1984) ao testar cultivares de feijão com estirpes de *R. phaseoli*.

Tabela 17 - Análise da variância para os caracteres de nodulação e rendimento da parte aérea referente à interação entre isolados da estirpe SEMIA-587 (B) e genótipo de soja (G), dos grupos Precoce e Tardio. Casa de Vegetação, Piracicaba, 1986.

Q.M.

F.V.	G.L.	Nodulação/Planta				Atividade da Nitrogenase ¹				Parte Aérea			
		Número ¹		Matéria seca (mg)		Atividade da Nitrogenase ¹		Atividade da Nitrogenase ¹		Parte Aérea		Parte Aérea	
		Grupo Precoce	Grupo Tardio	Grupo Precoce	Grupo Tardio	Grupo Precoce	Grupo Tardio	Mat. seca (g/pl)	N-Total (mg/pl)	Grupo Precoce	Grupo Tardio	Grupo Precoce	Grupo Tardio
Bactéria(B)	2	0,165**	0,259**	16892,36**	31019,44**	0,107*	0,043	2,99**	1,05	7353,75**	9162,52**		
Genótipo(G)	2	0,043*	0,172**	67013,19**	23675,69**	0,055	0,132	6,36**	3,75**	10007,96**	1640,35		
B x G	4	0,001	0,014	567,36	4195,49	0,026	0,001	0,33	1,33	75,63	779,23		
Resíduo	27	0,009		2694,21		0,020		0,42	0,64	479,77	635,87		

¹Dados segundo $\log(x + 1)$.

Tabela 18 - Análise multidimensional (variáveis de número, peso de nódulo, atividade da nitrogenase (ARA), peso da parte aérea e N-total) para interação entre isolados da SEMIA-587 (B) e genótipos de soja (G). Piracicaba, 1986.

F.V.	G.L.	Testes M0LIMU ¹							
		Roy		Wilks		Hotelling-Lawley		Pillai	
		Grupo precoce	Grupo tardio	Grupo precoce	Grupo tardio	Grupo precoce	Grupo tardio	Grupo precoce	Grupo tardio
Tratamentos	17								
Bactéria (B)	2	**	**	0	0	0	0	0	0
Genótipo (G)	4	**	**	0	0	0	0	0	0
I x G	4	ns	ns	0,664	0,258	0,608	0,173	0,591	0,190
Resíduo	54								

¹Segundo o sistema Modelo Linear Multidimensional.

Com base nos resultados apontados pelo tratamento estatístico foi considerada de forma independente a ação da bactéria e do genótipo da soja para as diversas combinações a que ambos foram submetidos.

4.3.1. AÇÃO DA SELEÇÃO PARA OS ISOLADOS DA SEMIA-587 E PARA OS GENÓTIPOS DE SOJA

Nas Figuras de número 7 a 12 foi visualizada de forma comparativa a resposta da seleção dos isolados frente a SEMIA-587 e dos genótipos selecionados de cada grupo em relação aos padrões Bossier (precoce) e IAC-9 (tardio) referente ao número, peso e tamanho dos nódulos, ARA, peso da parte aérea e N-total, respectivamente.

Os isolados provocaram um aumento significativo do peso de nódulos (Figura 7a) no grupo tardio e do tamanho nodular em ambos os grupos (Figura 9a e b). O decréscimo correspondente ao número de nódulos observado na Figura 8a e b foi indicativo de aumento da eficiência simbiótica, onde a energia dispendida no estabelecimento da simbiose teria sido convertida para intensificar a atividade nodular. Estudos relativos ao custo energético da fixação do N_2 em soja confirmariam esta conclusão ao quantificar 80% da energia utilizada como sendo proveniente da fixação. Entretanto, o restante da energia (20%), é requerida ao processo de construção nodular e advém de

Figura 7 - Ação da seleção para os isolados da estirpe SEMIA-587 de *B. japonicum* (a e b) e para os genótipos precoces (c) e tardios (d) de soja, relativa ao peso de nódulos (mg/pl.). Casa de Vegetação (Média de quatro repetições).

*1sd, $P < 0,05$

Figura 8 - Ação da seleção para os isolados da estirpe SEMIA-587 de *B. japonicum* (a e b) e para os genótipos precoces (c) e tardios (d) de soja, relativa ao número de nódulos (nº/planta). Casa de Vegetação (Média de quatro repetições).

*1sd, $P < 0,05$.

Figura 9 - Ação da seleção para os isolados da estirpe SEMIA-587 de *B. japonicum* (a e b) e para os genótipos precoces (c) e tardios (d) de soja, relativa ao tamanho dos nódulos (mg/nóculo). Casa de Vegetação (Média de quatro repetições).

*1sd, $P < 0,05$.

Figura 10 - Ação da seleção para os isolados da estirpe SEMIA-587 de *B. japonicum* (a e b) e para os genótipos precoces (c) e tardios (d) de soja, relativa a ARA (μmol de C₂H₄ (planta.hora). Casa de Vegetação. (Média de quatro repetições).

*1sd, P < 0,05.

Figura 11 - Ação da seleção para os isolados da estirpe SEMIA-587 de *B. japonicum* (a e b) e para os genótipos precoces (c) e tardios (d) de soja relativa ao peso da parte aérea (mg/planta). Casa de Vegetação (Média de quatro repetições).
*1sd, $P < 0,05$.

Figura 12 - Ação da seleção para os isolados da estirpe SEMIA-587 de *B. japonicum* (a e b) e para os genótipos precoces (c) e tardios (d) de soja relativa ao N-total (mg/planta). Casa de Vegetação (Média de quatro repetições).

*1sd, $P < 0,05$.

fontes exógenas (RUSSEL e SAITO, 1981).

A AN (Figura 10a e b) não provocou mudanças significativas detectadas pelo método ARA. Provavelmente os componentes genéticos responsáveis pela complexa estrutura da nitrogenase não teriam se manifestado diferencialmente na presente condição de avaliação.

Quanto aos caracteres relativos à planta verificou-se ganhos significativos para o peso da parte aérea pela ação dos isolados I e II (Figura 11a) e para o N total pelos quatro isolados, significando que os benefícios anteriormente observados na nodulação foram igualmente refletidos no rendimento da planta. Segundo observações de LAW & BUSHBY (1982) este é um indício de que o nitrogênio fixado não foi retido no nódulo mas transportado eficientemente para a parte aérea. Trabalhos de quantificação dos compostos nitrogenados transportados na seiva do xilema para combinações simbióticas efetivas em soja indicaram predominância de 40 a 90% de ureídeos (HUNGRIA & NEVES, 1986). Eles representam economia para o sistema devido a sua baixa relação C:N e são positivamente correlacionados com o N total da planta (GOI & NEVES, 1987). Também ISRAEL *et alii* (1986) afirmaram que a informação genética para o metabolismo dos compostos nitrogenados é codificada pela planta hospedeira, porém a bactéria seria responsável pela expressão destes genes. Logo, o au

mento verificado para o N-total poderia estar evidenciando uma expressão diferencial dos isolados da SEMIA-587.

A tendência geral observada pelos caracteres avaliados foi indicativa da variabilidade intrínseca da estirpe SEMIA-587, a qual pôde ser manifestada pelo simples processo de seleção ao acaso.

Os genótipos Bossier e IAC-9, utilizados como padrão devido ao seu comportamento médio de nodulação em campo, expressaram resultados tão elevados quanto Planalto e Tropical em casa de vegetação. De fato, não foram detectadas diferenças significativas entre eles quanto ao peso (Figuras 7c e d), número (Figura 8c e d) e tamanho dos nódulos (Figura 9c e d), assim como peso da parte aérea (Figura 11c e d) e N-total (Figura 12c e d). Alguns trabalhos tem apontado o cv. Bossier como portador de características simbióticas desejáveis (PULVER *et alii*, 1982; KUENEMAN *et alii*, 1984) e isto foi comprovado na expressão do seu potencial máximo sob condições de cultivo controladas. Comportamento simbiótico variável entre cultivares, foi atribuído por BOHL00L (1987) não só à constituição genética da planta para a nodulação mas por outros fatores ambientais como sensibilidade à variações da temperatura. Em feijão também foi constatado que o cv. Venezuela 350 apresentou nodulação exuberante em casa de vegetação a qual não foi mantida sob condições de campo (DUQUE *et*

alii, 1985).

O genótipo precoce SOC 81-76 teve um desempenho significativamente inferior a Bossier quanto ao peso, tamanho dos nódulos, peso da parte aérea e N total conforme as Figuras 7, 9, 11 e 12 (c), respectivamente. Entretanto estes resultados não permitiram classificar SOC 81-76 como sendo ineficiente mas indicaram que este genótipo apresenta limitações na capacidade de fixar N_2 . Esta característica genotípica possivelmente restringiu a manifestação máxima de uma estirpe eficiente como a SEMIA-587, conforme observado por HUNGRIA e NEVES, 1986, no sistema feijão x *R. phaseoli*.

Ao contrário do que foi observado para SOC 81-76 o genótipo tardio GO 79-1084 apresentou resultados significativamente superiores ao seu padrão (IAC-9) conforme os dados de nodulação (peso, Figura 7d; tamanho, Figura 9d) e rendimento da planta aonde ocorreu 66% de acréscimo no peso da parte aérea (Figura 11d) e 77% do conteúdo de N-total (Figura 12d). Isto refletiu novamente a alta variabilidade da planta quanto à fixação, a qual poderia estar associada a outras características da planta. Esta constatação é apoiada por ROSAS & BLISS (1987) que dirigiram programa de melhoramento cujo objetivo é reunir num só genótipo boas características simbióticas e agronômicas.

Mais uma vez os resultados de ARA (Figuras 10c e d)

Figura 13 - Ação da estirpe SEMIA-587 de *B. japonicum* e seus isolados em genótipos precoces (a) e tardios (b) de soja, relativa ao peso de nódulos. Casa de Vegetação (Média de quatro repetições).
*1sd, $P < 0,05$.

Figura 14 - Ação da estirpe SEMIA-587 de *B. japonicum* e seus isolados em genótipos precoces (a) e tardios (b) de soja, relativa ao número de nódulos. Casa de vegetação (Média de quatro repetições). *1sd, $P < 0,05$.

Figura 15 - Ação da estirpe SEMIA-587 de *B. japonicum* e seus isolados em genótipos precoces (a) e tardios (b) de soja, relativa ao tamanho dos nódulos. Casa de Vegetação (Média de quatro repetições). *1sd, $P < 0,05$.

Figura 16 - Ação da estirpe SEMIA-587 de *B. japonicum* e seus isolados em genótipos precoces (a) e tardios (b) de soja, relativa a ARA ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_4/\text{planta.hora}$). Ca-
sa de Vegetação (Média de quatro repetições).

*1sd, $P < 0,05$.

Figura 17 - Ação da estirpe SEMIA-587 de *B. japonicum* e seus isolados em genótipos precoces (a) e tardios (b) de soja, relativa ao peso da parte aérea (g/planta). Casa de Vegetação (Média de quatro repetições).

*1sd, $P < 0,05$.

Figura 18 - Ação da estirpe SEMIA-587 de *B. japonicum* e seus isolados em genótipos precoces (a) e tardios (b) de soja, relativa ao N-total (mg/planta). Casa de Vegetação (Média de quatro repetições). *1sd, $P < 0,05$.

não acompanharam a tendência demonstrada pela avaliação dos demais caracteres. Os valores obtidos poderiam estar refletindo diferentes ciclos de nodulação, como foi sugerido por VILLAMIL (1986). A confirmação desta suposição exigiria uma avaliação temporal da AN a fim de estimar com maior precisão esta medida fisiológica.

4.3.2. AÇÃO DA SEMIA-587 E SEUS ISOLADOS NOS GENÓTIPOS SELECIONADOS DE SOJA

As Figuras 13 a 18 demonstram a ação comparativa entre os isolados da SEMIA-587 e a estirpe original, inoculados em cada um dos genótipos selecionados em campo. Os caracteres foram os mesmos avaliados no item 4.3.1.

Para o isolado I combinado com os genótipos precoces SOC 81-76 e Planalto foi verificado aumento do peso e tamanho dos nódulos (Figuras 13 e 15a) e do N total na planta (Figura 18a), concordando com os resultados observados pela ação deste mesmo isolado no genótipo Bossier. O isolado II, apresentou ganho significativo somente quanto ao tamanho dos nódulos (Figura 15a). Entretanto, a diminuição observada em ambos os isolados para o número de nódulos confirmaram a tendência de aumento de eficiência simbiótica pela possível economia energética do sistema para a nodulação.

Para os caracteres de rendimento da parte aérea sob a ação dos isolados I e II (Figuras 17 e 18) observou-se que não ocorreram aumentos expressivos de peso (Figura 17). Entretanto o isolado I sobressaiu-se significativamente em ambos os genótipos precoces para o N-total. A ausência de significância estatística para o isolado II aos dois caracteres em questão poderia estar refletindo algum tipo de interação que não permitiria sua expressão simbiótica máxima.

Ao considerar a ação dos isolados III e IV sobre os genótipos tardios G0 79-1084 e Tropical verificou-se resultados semelhantes aos obtidos para os isolados II, ou seja, aumento para o tamanho dos nódulos (Figura 15b) com diminuição correspondente do número (Figura 14b). Mais uma vez constatou-se uma ação positiva ocorrida pela seleção dentro da estirpe. Por outro lado, o fato de que somente o genótipo Tropical tenha apresentado ganhos quanto ao N-total da planta (Figura 18b), 53% pelo isolado III e 45% pelo isolado IV, expõe a necessidade de maior conhecimento dos fatores intrínsecos da planta hospedeira relacionados com a expressão do microsimbionte na fixação do N_2 .

4.3.3. RESPOSTA DO GENÓTIPOS PRECOCES E TARDIOS DE SOJA À INOCULAÇÃO DOS ISOLADOS DA SEMIA-587

Nesta abordagem foi comparada a resposta dos três

genótipos de cada grupo frente à inoculação dos respectivos isolados da SEMIA-587 (I e II para os precoces; III e IV para os tardios). Os resultados são mostrados nas Figuras de número 19 a 24 referentes aos caracteres de nodulação e de rendimento da planta.

O comportamento do genótipo precoce SOC 81-76, bem caracterizado no ítem 4.3.1., não foi alterado sob a ação dos isolados I e II conforme observado pelo decréscimo do peso de nódulos (Figura 19a), número (Figura 20a), peso da parte aérea (Figura 23a) e N-total (Figura 24a) incluindo o tamanho nodular para o isolado II (Figura 21a). Esta tendência demonstrou que os benefícios constatados pelos isolados frente à estirpe matriz não foram igualmente manifestados pela inoculação neste genótipo.

Os resultados obtidos para o genótipo Planalto não acusaram diferenças significativas quanto ao padrão Bossier para todos os caracteres, conforme mostraram as Figuras de 19 a 24a. Este fato confirmou novamente a alta capacidade simbiótica já evidenciada para ambos.

Quanto aos genótipos tardios (G0 79-1084 e Tropical) não foram igualmente detectadas diferenças do padrão IAC-9 (Figuras 19, 20, 21, 23 e 24b). Somente na Figura 22b observou-se um decréscimo significativo de ARA na combinação G0 79-1084 x isolado IV. Apesar desta medida não ter contri

Figura 19 - Resposta dos genótipos selecionados de soja (precoce e tardios) a inoculação dos isolados I e II (a); III e IV (b) da estirpe SEMIA-587, de *B. japonicum*, relativa ao peso de nódulos (mg/planta). Casa de Vegetação (Média de quatro repetições).
*Isd, $P < 0,05$.

Figura 20 - Resposta dos genótipos selecionados de soja (precoces e tardios) a inoculação dos isolados I e II (a); III e IV (b) da estirpe SEMIA-587, de *B. japonicum*, relativa ao número de nódulos (nº/planta). Casa de Vegetação (Média de quatro repetições). *1sd, $P < 0,05$.

Figura 21 - Resposta dos genótipos selecionados de soja (precoces e tardios) a inoculação dos isolados I e II (a); III e IV (b) da estirpe SEMIA-587, de *B. japonicum*, relativa ao tamanho dos nódulos (mg/nódulo). Casa de Vegetação (Média de quatro repetições). *Isd, $P < 0,05$.

Figura 22 - Resposta dos genótipos selecionados de soja (precoces e tardios) a inoculação dos isolados I e II (a); III e IV (b) da estirpe SEMIA-587, de *B. japonicum*, relativa a ARA (μmol de C₂H₄/planta.hora). Casa de Vegetação (Me-dia de quatro repetições).

*1sd, P < 0,05.

Figura 24 - Resposta dos genótipos selecionados de soja (precoces e tardios) a inoculação dos isolados I e II (a); III e IV (b) da estirpe SEMIA-587, de *B. japonicum*, relativo ao N-total (mg/planta). Casa de Vegetação (Média de quatro repetições). *1sd, $P < 0,05$.

buído para a confirmação das tendências simbióticas observadas até aqui, foi peculiar o fato de que na primeira avaliação este genótipo tenha apresentado os valores de ARA diminuídos (Figura 10d). Isto poderia ser indicativo de um ciclo precoce de nodulação, ou seja, a época de florescimento não estaria correspondendo ao pico máximo da atividade enzimática.

Os resultados observados neste estudo reforçam a necessidade de maior enfoque à planta hospedeira nas pesquisas de fixação biológica do N_2 . Embora aumentos significativos tenham sido documentados quanto à *R. phaseoli* (PACOVSKI, 1984), *R. leguminosarum* (SMITH *et alii*, 1982) e também em *B. japonicum* (WILLIAMS *et alii*, 1981) estes estão ligados à intensa manipulação dirigida somente à bactéria. Por outro lado, apesar das grandes barreiras de ordem genética e fisiológica quanto ao entendimento da ação do hospedeiro na simbiose (NUTMAN, 1981) não pode ser desconsiderado que os benefícios finais advindos da prática da inoculação são expressados na leguminosa, que contribui com aumento da produtividade e qualidade proteica dos grãos (KUENEMAN *et alii*, 1984).

5. CONCLUSÕES

a) Foi detectada variação genotípica da soja, avaliada em campo, quanto à capacidade de nodulação. A média baixa, obtida para os caracteres de número, peso e principalmente para ARA, indicou que a ação ambiental interferiu na resposta da fixação do N_2 .

b) Não foi encontrada correlação entre dados de nodulação e produtividade, evidenciando a necessidade de melhoramento a fim de aumentar a eficiência simbiótica do sistema soja x *B. japonicum*.

c) A estirpe CB-1809 apresentou um padrão normal de distribuição da ARA quando inoculada nos genótipos Bossier (precoce) e IAC-9 (tardio). Entretanto, foram observadas diferenças entre estes genótipos sob a ação das estirpes SEMIA-587 e SEMIA-5019, sugerindo haver influência do grupo de maturação no ciclo de nodulação da estirpe.

d) A variação da resposta obtida dentro das estirpes, observada através do padrão de atividade e tamanho dos nódulos individuais, indicou potencial de seleção intrínseco para o microssimbionte.

e) A ação dos isolados da estirpe SEMIA-587 provocou aumentos significativos quanto a eficiência simbiótica expressa pela nodulação e rendimento da parte aérea da planta.

f) Os genótipos Bossier e Planalto (precoces) assim como IAC-9, Tropical e GO 79-1084 revelaram alto potencial simbiótico, sob condições de cultivo controlado. Porém, o genótipo SOC 81-76 não acompanhou a média alta obtida para os demais, o que sugere limitações na obtenção de benefícios da simbiose, provavelmente devido à sua constituição genética.

g) A inoculação dos isolados da SEMIA-587 nos três genótipos selecionados de cada grupo de maturação não alterou a resposta simbiótica em relação à estirpe original. Isto refletiu a necessidade de manipulação da planta hospedeira para que os benefícios do suprimento de N_2 através da inoculação sejam eficientes.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERSHEIM, P. & ANDERSON-PROUTY, A.J. Carbohydrates, proteins, cell surfaces, and the biochemistry of pathogenesis. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, Stanford, 26:31-52, 1975.
- ALVES, M.F. & SILVA, F.P. Ocorrência de plasmídeos em estirpes de *Rhizobium* nativas do Brasil. In: REUNIÃO LATINO-AMERICANA SOBRE *Rhizobium*, 12, Campinas, 1984. *Anais*. Campinas, IAC, 1986. p.445-60.
- AMARGER, N. & LOBREAU, J.P. Quantitative study of nodulation competitiveness in *Rhizobium* strains nitrogen fixation. *Applied Environ. Microbiol.*, Washington, 44(3):583-8, 1982.
- ANOLLÊS, G.C. & FAVELUKES, G. Quantitation of adsorption of *Rhizobia* in low numbers to small legume roots. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, 52:371-6, 1986.

APPELBAUM, E.R.; McLOUGHLIN, T.J.; O'CONNELL, M.; CHARTRAIN, N.

Expression of symbiotic genes of *Rhizobium japonicum*. USDA, 191 in other rhizobia. *J. Bacteriol.*, Baltimore, 163(1): 385-8, 1985.

ATTEWELL, J. & BLISS, F.A. Host plant characteristics of common bean lines selected using indirect measures of N₂ fixation. In: EVANS, H.J.; BOTTOMLEY, P.J.; NEWTON, W.E., ed. *Nitrogen Fixation Research Progress*. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1985.

BARNES, D.K.; HEICHEL, G.H.; VANCE, C.P.; VIANOS, D.R.; HARDARSON, G. Successes and problems encountered while breeding for enhanced N₂ fixation in alfalfa. In: LYONS, J.M., ed. *Genetic engineering of symbiotic nitrogen fixation and conservation of fixed nitrogen*. New York, Plenum Press, 1981. p.233-48.

BHAGWAT, A.A. & THOMAS, J. Legume-*Rhizobium* interactions: cowpea root exudate elicits faster nodulation response by *Rhizobium* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, 43:800-5, 1982.

BHUVANESWARI, T.V. & BAUER, W.D. Role of lectins in plant microorganism interactions. *Plant Physiol.*, Lancaster, 62:71-4, 1978.

- BOHLOOL, B.B. & SCHMIDT, E.L. Lectins: a possible basis for specificity in the *Rhizobium*-legume root nodule symbiosis. *Science*, Lancaster, 185:269-71, 1974.
- BRILL, W.J. Biochemical genetics of nitrogen fixation. *Microbiol. Rev.*, Washington, 44:449-67, 1980.
- BROUGHTON, W.J. A review-control of specificity in legume-*Rhizobium* associations. *J. Appl. Bacteriol.*, Reading, 45:195-204, 1978.
- CALVERT, H.E.; PENCE, M.K.; PIERCE, M.; MALIK, N.S.A.; BAUER, W.D. Anatomical analysis of the development and distribution of *Rhizobium* infections in soybean roots. *Can J. Bot.*, Ottawa, 62:2375-84, 1984.
- CARLSON, R.W. Heterogeneity of *Rhizobium* lipopolysaccharides nitrogen fixing bacteria. *J. Bacteriol.*, Baltimore, 158:1012-17, 1984.
- CARRÃO-PANIZZI, M.C. Soja: proteína para milhões. *Ci. Hoje*, São Paulo, 6:25-31, 1987.
- CAVIEDES, M.A.; MEGIAS, M.; GIL, A.M.; PALOMARES, A.J.; RUIZ-BERRAQUERO, F. Correlation between extracellular polysaccharide composition and nodulating ability. *Arch Microbiol.*, Berlin, 133:20-2, 1982.

- CREGAN, P.B. & HARTWIG, E.E. Characterization of flowering response to photoperiod in diverse soybean genotypes. *Crop Sci.*, Madison, 24:659-62, 1984.
- CURRIER, W.W. Response of bieldsfoot-trefoil nodulating *Rhizobium* to lectins and trefoil chemotactin. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, 31:587-9, 1985.
- DATE, R.A. Especificidad en la simbiosis *Rhizobium*/leguminosas. In: REUNION LATINOAMERICANA SOBRE *Rhizobium*, 8, Cali, 1976. *Anais.* Cali, CIAT, 1976. p.42-9.
- DAZZO, F.B. & BRILL, W.J. Regulation by fixed nitrogen of host-symbiont recognition in the *Rhizobium*-clover symbiosis. *Plant. Physiol.*, Lancaster, 62:18-21, 1978.
- DAZZO, F.B.; HRABAK, E.M.; URBANE, M.R.; SHERWOOD, J.E.; TRUCHET, G. Regulation of recognition in the *Rhizobium*-clover symbiosis. In: GIBSON, A.H. & NEWTON, W.E., ed. *Current perspectives in nitrogen fixation*. Canberra, Australian Academy of Science, 1981, p.292-5.
- DAZZO, F.B. & TRUCHET, G.L. Attachment of nitrogen-fixing bacteria to roots of Rost Plants. In: SUBBA RAO, N.S. *Current developments in Biological Nitrogen Fixation*. New Delhi, Oxford & IBM, 1984. p.65-99.

- DAZZO, F.B.; TRUCHET, G.L.; SHERWOOD, J.E.; HRABAK, E.M.;
GARDIOL, A.E. Alteration of the trifolin A- Binding
capsule of *Rhizobium trifolii* 0403 by enzymes released
from clover roots. *Appl. Environ. Microbiol.*,
Washington, 44:478-90, 1982.
- DEVINE, T.E. & BREITHAUPT, B.H. Significance of
incompatibility reactions of *Rhizobium japonicum* strains
with soybean host genotypes. *Crop. Sci.*, Madison, 20:
269-71, 1980.
- DILWORTH, M. & GLENN, A. How does a legume nodule work.
Trends biochem. Sci., Amsterdam, 9:519-23, 1984.
- DREVON, J.J.; KALIA, V.C.; HECKMANN, M.O.; SALSAC, L.
Influence of the *Bradyrhizobium japonicum* hydrogenase on
the growth of *glycine* and *Vigna* species. *Appl. Environ.*
Microbiol., Washington, 53:610-20, 1987.
- DUDMAN, W.F. The extracellular glucans of *Rhizobium japonicum*
strain 311 b 135. In: GIBSON, A.H. & NEWTON, W.E., ed.
Current perspectives in nitrogen fixation. Canberra,
Australian Academy of Science, 1981. p.427.

- DUQUE, F.F.; DIDONET, A.D.; DÖBEREINER, J. Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* visando maior eficiência na fixação biológica do nitrogênio e na competitividade e sobrevivência no solo. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 2, Brasília, 1981. *Anais*. Londrina, EMBRAPA/CNPSo, 1982. p.752-65.
- DUQUE, F.F.; NEVES, M.C.P.; FRANCO, A.A.; VICTORIA, R.L.; BODDEY, R.M. The response of field grown *Phaseolus vulgaris* to *Rhizobium* inoculation and the quantification of N₂ fixation using ¹⁵N. *Plant and Soil*, The Hague, 88:333-43, 1985.
- ESTRADA-GARCIA, M.T.; REYNA-TELLEZ, S.; GARCIA-CASTAÑEDA, M.T. Posible utilization de las lectinas para la identificacion de cepas infectivas de *Rhizobium*, empleando la prueba de aglutinación bacteriana. *Rev. Lat.amer. Microbiol.*, México, 26:273-5, 1984.
- FERNANDEZ-PASCUAL, M. & CABEZAS DE HERRERA, E. Relación entre las lectinas de las leguminosas e los exopolisacaridos bacterianos. In: REUNIÓN LATINO-AMERICANA SOBRE *Rhizobium*, 12, Campinas, 1984. *Anais*. Campinas, IAC, 1986. p.180-90.
- FISHBECK, K.A. & PHILLIPS, D.A. Host plant and *Rhizobium* effects on acetylene reduction in alfafa during regrowth. *Crop. Sci.*, Madison, 22:251-54, 1982.

FREIRE, J.R.J. Inoculation of soybeans. In: VINCENT, J.M.; WHITNEY, A.S.; BOSE, J., ed. Exploiting the legume-*Rhizobium* symbiosis in Tropical Agriculture. Hawaii, University of Hawaii, 1977, p.335-79 (Proceedings of a Workshop, Kahului, 1976).

FULLER, F.; KUNSTNER, P.W.; NGUYEN, T.; VERMA, D.P.S. Soybean nodulin genes analysis of c DNA clones reveals several major tissue-specific sequences in nitrogen-fixing root nodules *Glycine max*, *Rhizobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Washington, 80:2594-98, 1983.

GAMORZEWSKA, E.T. & CARLILE, M.J. Positive chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* and other bacteria towards root exudates from legumes and other plants *Pisum sativum*, nitrogen fixation. *J. Gen. Microbiol.*, London, 128(6): 1179-88, 1982.

GEORGE, T.; BOHLOOL, B.B.; SINGLETON, P.W. *Bradyrhizobium japonicum* environment interactions: nodulation and interstrain competition in soils along an elevation transect. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, 53:1113-7, 1987.

GODOI, C.R.M. *Análise estatística multidimensional*. Piracicaba, ESALQ/Departamento de Matemática e Estatística, 1985. 187p.

- GOI, S.R. & NEVES, M.C.P. Efeito da cultivar, estirpe de *Rhizobium* e nitrogênio mineral na produção de ureídeos em soja, feijão e leucena. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 22:163-170, 1987.
- GRAHAM, P.H. & TEMPLE, S.R. Selection for improved nitrogen fixation in *Glycine max* (L.) Merr. and *Phaseolus vulgaris* L. *Plant and Soil*, The Hague, 82:315-27, 1984.
- GULASH, M.; AMES, P.; LAROSILIERE, R.C.; BERGMAN, K. Rhizobia are attracted to localized sites on legume roots. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, 48:149-52, 1984.
- HAM, G.E.; LIENER, I.E.; EVANS, S.O.; FRAZIER, R.O.; NELSON, W.W. Yield and composition of soybeans seed as affected by N and S fertilization. *Agron. J.*, Madison, 67:293-297, 1975.
- HALVERSON, L.J. & STACEY, G. Host recognition in the *Rhizobium*-soybean symbiosis. *Plant Physiol.*, Lancaster, 74:84-9, 1984.
- HALVERSON, L.J. & STACEY, G.S. Host recognition in the *Rhizobium*-soybean symbioses. Evidence for the involvement of lectin in nodulation. *Plant Physiol.*, Lancaster, 77:621-5, 1985.

HALVERSON, L.J. & STACEY, G.S. Effect of lectin on tradulation by wild-type *Bradyrhizobium japonicum* and a nodulation defective mutant. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, 51:753-60, 1986a.

HALVERSON, L.J. & STACEY, G.S. Signal exchange in plant microbe interactions. *Microbiol. Rev.*, Washington, 50:193-225, 1986b.

HARDARSON, G.; ZAPATA, F.; DANSO, S.K.A. Effect of plant genotype and nitrogen fertilizer on symbiotic nitrogen fixation by soybean cultivars. *Plant and Soil*, The Hague, 82:397-405, 1984.

HARDARSON, G.; HEICHEL, G.H.; BARNES, O.K.; VANCE, C.P. Rhizobial strain preference of alfafa populations selected for characteristics associated with N₂ nitrogen fixation genotypes *Medicago sativa*, *Rhizobium meliloti*. *Crop. Sci.*, Madison, 22(1):55-8, 1982.

HAYDOCK, K.P.; NORRIS, D.O.; TMANNETJE, L. The relation between nitrogen percent and dry weight of inoculated legumes *Rhizobium* effectiveness. *Plant and Soil*, The Hague, 57(2/3):353-62, 1980.

- HEICHEL, G.H.; HARDARSON, G.; BARNES, D.K.; VANCE, C.P.
Dinitrogen fixation herbage yield and rhizobial preference
os selected alfafa clones. *Crop. Sci*, Madison, 24(6):
1093-7, 1984.
- HERRIDGE, D.F. & BETTS, J.H. Nitrate tolerance in soybean:
variation between genotypes. In: EVANS, H.J.; BOTTOMLEY,
P.J.; NEWTON, W.E., ed. *Nitrogen Fixation Research
Progress*. Dordrecht, Martinus Nihoff, 1986. p.32.
- HIGASHI, S. & ABE, M. Promotion of infection thread
formation by substances from *Rhizobium*. *Appl. Environ.
Microbiol.*, Washington, 39:297-301, 1980.
- HIGASHI, S. & ABE, M. Scanning electron microscopy of
Rhizobium infected root hairs of white clover. In:
GIBSON, A.H. & NEWTON, W.E., ed. *Current perspectives in
nitrogen fixation*. Canberra, Australian Academy of
Science, 1981. p.421.
- HOLL, F.B. Host plant control of inheritance of dinitrogen
fixation in the *Pisum-Rhizobium* symbiosis. *Euphytica*,
Wageningen, 24:767-70, 1975.
- HOLL, F.B. Plant genetics; manipulation of the host. *Can.
J. Microbiol.*, Ottawa, 29:945-53, 1983.

- HOOYKAAS, P.J.J.; BRUSSEL, A.A.N.; DULK-RAS, H.; SLOGTEREN, G.M.S.; SCHILPEROORT, B. Symplasmid of *Rhizobium trifolii* expressed in different rhizobial species and *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature*, London, 291:351-3, 1981.
- HUBER, T.A.; AGARWAL, A.K.; KEISTER, D.L. Extracellular polysaccharide composition, ex planta nitrogenase activity, and DNA homology in *Rhizobium japonicum* nitrogen fixing bacteria. *J. Bacteriol.*, Baltimore, 158(3):1168-71, 1984.
- HUGHES, T.A. & ELKAN, G.H. Lads of specific binding of labeled *Rhizobium japonicum* lipopolissacarides to wild soybean (*Glycine soja*) roots. *Plant and Soil*, The Hague, 84:115-9, 1985.
- HUNGRIA, M. & NEVES, M.C. Interação entre cultivares de *Phaseolus vulgaris* e estirpes de *Rhizobium* na fixação e transporte do nitrogênio. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 21:127-140, 1986.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M.C.P.; SPRENT, J. Atividade da nitrogenase, evolução do H₂ e transporte de nitrogênio em cinco cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. inoculadas com estirpes de diferentes eficiências na fixação do nitrogênio. In: REUNIÃO LATINO-AMERICANA SOBRE *Rhizobium*, 12, Campinas, 1984. *Anais*. Campinas, IAC, 1986. p.563.

- IMSANDE, J. Plant genotype and the control of nitrogen fixation in soybean. In: EVANS, H.J.; BOTTOMLEY, P.J.; NEWTON, W.E., ed. *Nitrogen Fixation Research Progress*, Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1985. p.34.
- ISRAEL, D.W.; MATHIS, J.N.; BARBOUR, W. MARK; ELKAN, G.H. Symbiotic effectiveness and Host-Strain. Interactions of *Rhizobium fredii* USDA 191 on different soybean cultivars. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, 51:898-903, 1986.
- JARVIS, B.D.W.; SCOTT, K.F.; HUGHES, J.E.; OJORDJEVIC, M.; ROLFE, B.G.; SHINE, J. Conservation of genetic information between different *Rhizobium* species. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, 29:200-9, 1983.
- JUÁREZ, J.R. Isolamento e caracterização de variantes de *Rhizobium phaseoli*. Porto Alegre, 1984. 86p. (Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul).
- KAPULNIK, Y.; TEUBER, L.R.; PHILLIPS, D.A. Genetic improvements in plant growth an nitrogen assimilation. In: EVANS, H.J.; BOTTOMLEY, P.J.; NEWTON, W.E., ed. *Nitrogen Research Progress*. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1985. p.36.

KEYSER, H.H.; BERKUM, P.; WEBER, D.F. A comparative study of the physiology of symbioses formed by *Rhizobium japonicum* with *Glycine max*, *Vigna unguiculata* e *Macroptilium atropurpureum*. *Plant Physiol.*, Lancaster, 70:1626-30, 1982a.

KEYSER, H.H.; BOHLOOL, B.B.; HU, T.S.; WEBER, D.F. Fast growing rhizobia isolated from root nodules of soybean. *Science*, Lancaster, 215:1631-2, 1982b.

KIPE-NOLT, J.A. & GILLER, K.E. An evaluation of tropical *Phaseolus vulgaris* genotypes from a breeding program for improved nitrogen fixation. In: EVANS, H.J.; BOTTOMLEY, P.J.; NEWTON, W.E., ed. *Nitrogen Fixation Research Progress*. Dordrecht, Martinus Nijhoff, 1985. p.37.

KNEEN, B.E. & LARUE, T.A. Peas (*Pisum sativum*) with strain specificity for *Rhizobium leguminosarum*. *Heredity*, London, 52:383-90, 1984.

KONOROSI, A.; KISS, G.B.; DUSHA, I., 1984. Plasmids governing symbiotic nitrogen fixation. In: SUBBA RAO, N.S. *Current developments in biological nitrogen fixation*. New Delhi, Oxford & IBM, 1984. p.135-71.

- KUENEMAN, E.A.; ROOT, W.R.; DASHIELL, K.E.; HOHENBERG, J.
Breeding soybeans for the tropics capable of nodulating effectively indigenous *Rhizobium* spp. *Plant and Soil*, The Hague, 82:387-96, 1984.
- KUSH, A.K. & DADARWAL, K.R. Root exudates as pre-invasive factors in the nodulation of chick pea varieties. *Soil Biol. Biochem*, London, 13:51-5, 1981.
- LA FAVRE, J.S. & EAGLESHAM, A.R.J. Increased nodulation of non-nodulating (rj₁-rj₁) soybeans by high dose inoculation. *Plant and Soil*, The Hague, 80:297-300, 1984.
- LAMBERT, G.R.; HARKER, A.R.; CANTRELL, M.A.; HANUS, F.J.; RUSSEL, S.A.; HAUGLAND, R.A.; EVANS, H.J. Symbiotic expression of cosmid-borne *Bradyrhizobium japonicum* hydrogenase genes. *Appl. Envir. Microbiol.*, Washington, 53:422-8, 1987.
- LAWN, R.J. & BRUN, W.A. Symbiotic nitrogen fixation in soybeans; I- Effect of photosynthetic source-sink manipulations. *Crop. Sci.*, Madison, 14:11-6, 1974.
- LAWN, R.J. & BUSHBY, H.V.A. Effect of root, shoot and *Rhizobium* strain on nitrogen fixation in four asiatic *Vigna* species. *New. Phytol.*, London, 92:425-34, 1982.

- LAW, I.J. & STRIJDOM, B.W. Role of lectin in the specific recognition of *Rhizobium* by *Lotonis bainesii*. *Plant Physiol.*, Lancaster, 74(4):779-85, 1984.
- LIE, T.A. Gene centres, a source for genetic variants in symbiotic nitrogen fixation: host-induced ineffectivity in *Pisum sativum* ecotype fulvum. *Plant and Soil*, The Hague, 61(1/2):125-34, 1981.
- LIE, T.A. Host genes in *Pisum sativum* L. conferring resistance to European *Rhizobium leguminosarum* strain. *Plant and Soil*, The Hague, 82:415-25, 1984.
- LIE, T.A. Symbiotic nitrogen fixation under stress conditions. In: Biological nitrogen fixation in natural and agricultural habitats. *Plant and Soil*, The Hague, (Special vol.):117-27, 1971.
- LIE, T.A.; TIMMERMANS, P.C.J.M.; LADIZINSKI, A. Host-controlled nitrogen fixation in *Pisum sativum* ecotype fulvum. In: GIBSON, A.H. & NEWTON, W.E. *Current perspectives in nitrogen fixation*. Canberra, Australian Academy of Science, 1981. p.419.
- LONG, S.R. Genetics advances in the study of *Rhizobium* nodulation. In: SETLOW, J.K. & HOLLAENDER, A., ed. *Genetic engineering principles and methods*. New York, Plenum Press, 1986. v.8, p.135-50.

- LOPES, E.S. & GIARDINI, A.R. Especificidade hospedeira e pré-seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* para as variedades Santa Rosa, Viçosa e IAC-2 de soja. *Bragantia*, Campinas, 35:1-11, 1976.
- MACARY, H.S.; BEUNARD, P.; PICHOT, J. Nodulation and nitrogen fixation of five soybean varieties in mist culture. *Agronomie Tropicale*, Paris, 36(1):42-53, 1981.
- MASTERSON, R.V.; PRAKASH, R.K.; ATHERLY, A.G. Conservation of simbiotic nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.*, Baltimore, 163:21-6, 1985.
- MASTERSON, R.V.; RUSSEL, P.R.; ATHERLY, A.G. Nitrogen fixation (nif) genes and large plasmids of *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.*, Baltimore, 152(2):928-31, 1982.
- MATHIS, J.N.; BARBOUR, W.M.; ELKAN, G. Effect of sym plasmid curing on symbiotic effectiveness in *Rhizobium fredii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, 49:1385-8, 1985.

MATHIS, J.N.; KUYKENDALL, L.D.; ELKAN, G.H. Restriction endonuclease and *nif* homology patterns of *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 derivatives with and without nitrogen fixation competence. *Appl. Envir. Microbiol.*, Washington, 51:477-80, 1986a.

MATHIS, J.N.; BARBOUR, W.M.; MILLER, T.B.; ISRAEL, D.W.; ELKAN, G. Characterization of a manitol-utilizing, nitrogen-fixing *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 derivative. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, 52:81-5, 1986b.

MATHIS, J.N.; ISRAEL, D.W.; BARBOUR, W.M.; JARVIS, B.O.W.; ELKAN, G.H. Analysis of the symbiotic performance of *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 and its derivative I-110 and discovery of a new mannitol-utilizing, nitrogen-fixing USDA 110 derivative. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, 52:75-80, 1986c.

MATHYSSE, A.G. Role of bacterial cellulose fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* infections. *J. Bacteriol.*, Baltimore, 154:906-15, 1983.

MICKE, A. Mutation breeding of grain legumes. *Plant and Soil*, The Hague, 82:337-57, 1984.

- MINCHIN, F.R.; WITTY, J.F.; SHEENY, J.E.; MULLER, M. A major error in the acetylene reduction assay: decreases in nodular nitrogenase activity under assay conditions. *J. Exp. Bot.*, Oxford, 34:641-9, 1983.
- MOAWAD, H.A.; ELLIS, W.R.; SCHMIDT, E.L. Rhizosphere response as a factor in competition among 3 serogroups of indigenous *Rhizobium japonicum* for nodulation of field-grown soybeans. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, 47(4):607-12, 1984.
- MYTTON, L.R. Breeding legumes for symbiotic characteres. In: GIBSON, A.H. & NEWTON, W.E., ed. *Current perspectives in nitrogen fixation*. Canberra, Australian Academy of Science, 1981. p.420.
- MYTTON, L.R. Developing a breeding strategy to exploit quantitative variation in symbiotic nitrogen fixation. *Plant and Soil*, The Hague, 32:329-35, 1984.
- NUTMAN, P.S. Hereditary host factors affecting nodulation and nitrogen fixation. In: GIBSON, A.H. & NEWTON, W.E. *Current perspectives in nitrogen fixation*. Canberra, Australian Academy of Science, 1981. p.194-204.

- NEVES, M.C.P.; DIONET, A.D.; DUQUE, F.F.; DÖBEREINER, J.
Rhizobium strain effects on nitrogen transport and
distribution in soybeans. *J. Exp. Bot.*, Oxford,
36:1179-92, 1985.
- NOEL, K.D.; STACEY, G.; TANDON, S.R.; SILVER, L.E.; BRILL,
W.J. *Rhizobium japonicum* mutants defective in
symbiotic nitrogen fixation. *J. Bacteriol.*, Baltimore,
152(1):485-94, 1982.
- OLIVEIRA, L.A. & VIDOR, C. Seleção de estirpes de *Rhizobium*
japonicum em soja; I- Eficiência e especificidade
hospedeira. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 8:37-42, 1984.
- OZAWA, T.; TAKEMI, A.; YAMAGUCHI, M. Decrease in the
proportion of cells capable of inducing nodules to the
population of *Rhizobium japonicum* introduced into soil.
Soil Sci. Plant. Nutr., Tokyo, 30(4):479-84, 1984.
- PAAU, A.S. & BRILL, W.J. Comparison of the genomic
arrangement and the relative transcription of the
nitrogenase genes in *Rhizobium meliloti* during symbiotic
development in alfafa root nodules. *Can. J. Microbiol.*,
Ottawa, 28:1330-9, 1982.

- PACOVSKY, R.S.; BAYNE, H.G.; BETHLENFALVAY, G.L. Symbiotic interactions between strains of *Rhizobium phaseoli* and cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. *Crop. Sci.*, Madison, 24:101-5, 1984.
- PATE, J.S. & MINCHIN, F.R. Comparative studies of carbon and nitrogen nutrition of selected grain legumes. In: SUMMERFIELD, R.J. & BUNTING, A.H. *Advances in Legume Science*, London, Royal Botanic Gardens, 1980. p.105-14.
- PEREIRA, P.A.A.; ARAÚJO, R.S.; ROCHA, R.E.M.R.; STEINMETZ, S. Capacidade de genótipos de feijoeiro de fixar N₂ atmosférico. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 19:811-5, 1984.
- PERES, J.R.R. & SUHET, A.R. Relações de especificidade na fixação de N₂. In: REUNIÃO LATINOAMERICANA SOBRE *Rhizobium*, 12, Campinas, 1984. *Anais*. Campinas, IAC, 1986. p.445-60.
- PERES, J.R.R.; VARGAS, M.A.T.; SUHET, A.R. Variabilidade na eficiência em fixar nitrogênio entre isolados de uma mesma estirpe de *Rhizobium japonicum*. *R. bras. Ci. Solo*, Campinas, 8:193-6, 1984.
- PERES, J.R.R. & VIDOR, C. Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* e competitividade por sítios de infecção nodular em cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). *Agron. Sulriograndense*, Porto Alegre, 16:205-19, 1980.

- PEREZ, M.A.C. Especificidad en la simbiosis entre tres variedades de soja (*Glycine max* L.) Merrill y cuatro razas de *Rhizobium japonicum*. *An. INIA Ser. Prod. veg.*, Buenos Aires, 12:269-77, 1980.
- PHILLIPS, D.A.; TEUBER, L.R.; JUE, S.S. Variation among alfalfa genotypes for reduced nitrogen concentration. *Crop Science*, Madison, 22:606-10, 1982.
- PUEPKE, S.G. *Rhizobium* infection triads in root hairs of *Glycine max* (L.) Merr., *Glycine soja* Sieb. & Zucc., and *Vigna unguiculata* (L.) Walp. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, 29:69-76, 1982.
- PUEPKE, S.G.; FREUND, T.G.; SCHULZ, B.C.; FRIEDMAN, H.P. Interaction of soybean lectin with rhizobia from peanut (*Arachis hypogea* L.). In: GIBSON, A.H. & NEWTON, W.E., ed. *Current perspectives in nitrogen fixation*. Canberra, Australian Academy of Science, 1981. p.423.
- PULVER, E.L.; BROCKMAN, F.; WIEN, H.C. Nodulation of soybean cultivars with *Rhizobium* spp and their response to inoculation with *R. japonicum*. *Crop Sci.*, Madison, 22(5):1065-70, 1982.
- RALEIGH, E.A. & SIGNER, E.R. Positive selection of nodulation-deficient *Rhizobium phaseoli* nitrogen fixation. *J. Bacteriol.*, Baltimore, 151:83-8, 1982.

- ROBERTSON, J.G.; LYTTLETON, P.; PANKHURST, C.E. Preinfection and infection processes in the legume-*Rhizobium* symbiosis. In: GIBSON, A.H. & NEWTON, W.E., ed. *Current perspectives in nitrogen fixation*. Canberra, Australian Academy of Science, 1981. p.280-91.
- ROBSON, R.; KENNEDY, C.; POSTGATE, J. Progress in comparative genetics of nitrogen fixation. *Can.J. Microbiol.*, Ottawa, 29:954-67, 1983.
- ROLFE, R.G.; GRESSHOFF, P.M.; SHINE, J.; VINCENT, J.M. Interaction between a non-nodulating and a ineffective mutant of *Rhizobium trifolii* resulting in effective (nitrogen-fixing) nodulation. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, 39:449-52, 1980.
- ROSAS, J.C. & BLISS, F.A. Breeding beans for BNF improvement in Latin America. In: SYMPOSIUM ON THE CONTRIBUTION OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION TO PLANT PRODUCTION, Cisarua, 1987. *Abstracts*. Cisarua, AARD, 1987. p.82.
- RUSCHEL, A.P. & SAITO, S.M.T. Bioenergetics of N-utilization from soil, fertilizer and atmosphere in symbiotic systems. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE ENGENHARIA GENETICA, Piracicaba, 1981. *Anais*. São Paulo, Ed. Hamburg, 1981. p.85-8.

- SADOWSKY, M.J. & BOHLOOL, B.B. Possible involvement of a megaplasmid in nodulation of soybeans by fast-growing rhizobia from China. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, 46:906-11, 1983.
- SAINI, I.; DOGRA, R.C.; NAGPAL, P. Uptake hydrogenase in fast-growing strains of *Rhizobium* sp. (Sesbania) in relation to nitrogen fixation. *J. Appl. Bacteriol.*, Reading, 62:449-52, 1987.
- SAITO, S.M.T. Field evaluation of the capacity for symbiotic fixation among for strains of *Rhizobium phaseoli*. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, 17(7):999-1006, 1982.
- SANCHEZ, F.; PADILLA, J.; CAMPOS, F.; LARA, M.; VAZQUES; ZAMUDIO, M. Developmental expression of nodule-specific genes in tropical legumes. In: SYMPOSIUM ON THE CONTRIBUTION OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION TO PLANT PRODUCTION, Cisarua, 1987. *Abstracts*. Cisarua, AARD, 1987. p.83.
- SARRUGE, J.R. & HAAG, H.P. *Análises químicas em plantas*. Piracicaba, ESALQ/USP, 1974. 27p. (mimeografado).

- SATO, T. & SUGAWARA, S. Characteristics of effective and host specific ineffective strains of *Rhizobium japonicum* nitrogen fixation symbiosis soybean. *Agric. Biol. Chem.*, Tokyo, 45(3):751-3, 1981.
- SCHILLING, G. Genetic specificity of nitrogen nutrition in leguminous plants. *Plant and Soil*, The Hague, 72(213): 321-34, 1983.
- SCHUBERT, K.R. & EVANS, H.J. The relation between hydrogen reactions to nitrogen fixation in nodulated symbionts. In: NEWTON, W.; POSTGATE, J.R.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C., ed. *Recent developments in nitrogen fixation*. Londres, Academic Press, 1977. p.469-89.
- SHANTHARAN, S. & WONG, P.P. Recognition of leguminous host by a promiscuous *Rhizobium* strain. *Applied Environ. Microbiol.*, Washington, 43:677-85, 1982.
- SHARON, N. Lectins. *Sci. Am.*, New York, 236:108-19, 1977.
- SMITH, G.R.; KNIGHT, W.E.; PETERSON, H.L. The inheritance of N_2 fixation efficiency in crimson clover. *Crop. Sci.*, Madison, 22(6):1091-4, 1982.
- SOMASEGARAN, P. & HOBEN, H.J. *Methods in legume-Rhizobium tecnology*. Hawaii, University of Hawaii, 1985. 367p.

- SORENSEN, G.M. & WYNDAELE, R. Effect of transfer of symbiotic plasmids and of hydrogenase genes (hup) on symbiotic efficiency of *Rhizobium leguminosarum* strains. *J. Gen. Microbiol.*, London, 132:317-24, 1986.
- STACEY, G.; PAAU, A.S.; NOEL, K.O.; MAYER, R.J.; SILVER, L.E.; BRILL, W. Mutants of *Rhizobium japonicum* defective in nodulation. *Arch Mikrobiol.*, Berlin, 132:219-24, 1982.
- STANLEY, J.; BROWN, G.G.; VERMA, D.P.S. Slow-growing *Rhizobium japonicum* comprises two highly divergent symbiotic types. *J. Bacteriol.*, Baltimore, 163:148-54, 1985.
- STEPHENS, B.O. & NEYRA, C.A. Nitrate and nitrite reduction in relation to nitrogenase activity in soybean nodules and *Rhizobium japonicum* bacteroids. *Plant Physiol.*, Lancaster, 71(4):731-5, 1983.
- STREETER, J.G. Carbohydrates in soybean nodules: II. Distribution of compounds in seedling during the onset of nitrogen fixation *Rhizobium japonicum*. *Plant Physiol.*, Lancaster, 66(3):471-6, 1980.

SUTTON, B.C.S.; STANLEY, J.; ZELECHOWSKA, M.G.; VERMA, D.P.S.

Isolation and expression of *Rhizobium japonicum* cloned DNA encoding an early soybean (*Glycine soja*) nodulation function. *J. Bacteriol.*, Baltimore, 158(3):920-7, 1984.

TEMPLE, S.R.; DUQUE, A.; KIPE-NOLT, J.A. Seleccin para

aumentar la fijacion de nitrógeno in *Phaseolus vulgaris*.

In: REUNIÃO LATINO-AMERICANA SOBRE *Rhizobium*, 12., Campinas, 1984. *Anais.* Campinas, IAC, 1986, p.570.

TURGEON, B.G. & BAUER, W.D. Early errents in the infection of

soybean by *Rhizobium japonicum*. Time cause and cytology of the initial infection process nitrogen fixation. *Can. J. Bot.*, 60(2):152-61, 1982.

TURGEON, B.G. & BAUER, W.D. Ultrastructure of infection-thread

development during the infection of soybean by *Rhizobium japonicum*. *Planta*, 163:328-49, 1985.

VASSE, J.M.; DAZZO, F.B.; TRUCHET, G.L. Reexamination of

capsule development and lectin-binding sites on *Rhizobium japonicum* 311B110 by the glutaraldehyde/rutherfordium red/uranyl acetate staining method. *J. Gen. Microbiol.*, London, 130(11):3037-48, 1984.

- VILLAMIL, A.B. Caracterização e seleção de *Rhizobium phaseoli* para a produção de inoculantes comerciais. Piracicaba, 1986. 171p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- VINCENT, J.M., ed. *Manual of the practical study of root nodule bacteria*. Oxford, Blackwell, 1970. 163p. (Handbook, 15).
- WACEK, T.J. & BRILL, W.J. Simple, rapid assay for screening nitrogen-fixing ability in soybean. *Crop. Sci.*, Madison, 16:519-23, 1976.
- WANG, C.L.; BERINGER, J.E.; HIRSCH, P.R. Host plant effects on hybrids of *Rhizobium leguminosarum* Biovar *Viciae* e *trifolii*. *J. Gen. Microbiol.*, London, 132:2063-70, 1986.
- WEBER, C.R. Nodulating and nonnodulating soybeans isolines: II. Response to applied nitrogen and modified soil conditions. *Agron. J.*, Madison, 58:46-9, 1966.
- WERNER, O.; MORSCHER, E.; STRIPF, R.; WINCHENBACH, B. Development of nodules of *Glycine max* infected with an ineffective strain of *Rhizobium japonicum*. *Planta*, Berlin, 147(3):320-9, 1980.

- WHEATCROF, R. & WATSON, R.J. Identification and characterization of insertion sequence ISRm1 in *Rhizobium meliloti* JJe10. *Can. J. Microbiol.*, Ottawa, 33:314-21, 1987.
- WILLIAMS, L.E. & PHILLIPS, D.A. Increased soybean productivity with a *Rhizobium japonicum* mutant. *Crop. Sci.*, Madison, 23(2):246-50, 1983.
- WILLIAMS, L.E. ; JUG, S.S.; CASSMAN, K.G.; PHILLIPS, D.A. Evaluating potentially superior *Rhizobium* strains in soybeans. In: LYONS, J.M., ed. *Genetic engineering of symbiotic nitrogen fixation and conservation of fixed nitrogen*. New York, Plenum Press, 1981. p.195-205.
- YOUNG, J.P.W.; JOHNSTON, A.W.B.; BREWIN, N.J. A search for peas (*Pisum sativum* L.) showing strain specificity for symbiotic *Rhizobium leguminosarum*. *Heredity*, London, 48:197-201, 1982.
- ZABLOTOWICZ, R.M. & FOCHT, D.D. Physiological characteristics of cowpea rhizobia: evaluation of symbiotic efficiency in *Vigna unguiculata*. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, 41(3):679-85, 1981.