

NÓDULOS PRETOS NO ESTUDO DA INOCULAÇÃO CRUZADA
E DA COMPETIÇÃO ENTRE ESTIRPES DE *RHIZOBIUM*
EM LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS TROPICAIS

TESE

Apresentada à Escola de Pós-Graduação da
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
para o grau de *Magister Scientiae*

NEWTON PEREIRA STAMFORD

Dezembro de 1971

BIOGRAFIA DO AUTOR

Natural do Estado de Pernambuco, engenheiro agrônomo diplomado pela Escola Superior de Agricultura de Pernambuco no ano de 1966.

No período de 1965 a 1966, como estagiário, no Instituto de Pesquisas Agronômicas e no Instituto de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, colaborou na realização de trabalhos de fertilidade e microbiologia de solos.

No ano de 1967 foi distinguido com uma bolsa de estudos, concedida pelo CONTAP, para realizar o curso de mestrado em solos na Escola de Pós-Graduação da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Em 1968 foi contratado pelo Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Nordeste, respondendo pelo Setor de microbiologia de solos por 2 anos.

Em 1970 foi aprovado em concurso para agrônomo do Banco do Nordeste do Brasil S.A. e, no mesmo ano, contratado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco como professor de microbiologia de solos, funções que exerce até hoje.

AGRADECIMENTOS

Desejamos expressar nosso reconhecimento: ao Diretor do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Nordeste, à Universidade Federal Rural de Pernambuco e à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro que nos proporcionaram a oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação em Solos, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Expressamos a mais sincera homenagem e gratidão à professora Dra. Johanna Döbereiner, que com altruísmo e dedicação tornou possível a realização desta tese, com sua orientação firme e dedicada.

Fazemos sentir também nossos agradecimentos ao professor Dr. Abeillard Fernando de Castro, e ao professor Ary Carlos Xavier Velloso, pelas sugestões, apoio e estímulo constante.

Ao pessoal do Setor de Microbiologia de Solos do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Centro-Sul, pela valiosa colaboração, e ao professor Cornélio Raimalho Campêlo pela revisão da nomenclatura botânica das espécies citadas no trabalho.

Agradecimentos são estendidos a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração deste trabalho.

ÍNDICE

	página
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1. LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS TROPICAIS	5
2.1.1. Considerações gerais	5
2.1.2. Comparação com as leguminosas tem- peradas.....	7
2.2. INOCULAÇÃO CRUZADA	8
2.3. COMPETIÇÃO ENTRE ESTIRPES DE <i>RHIZOBIUM</i>	13
2.4. MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE ESTIRPES DE <i>RHIZOBIUM</i>	16
2.4.1. Sorologia.....	16
2.4.2. Clorose induzida	18
2.4.3. Nódulos pretos.....	20
3. NÓDULOS PRETOS E INOCULAÇÃO CRUZADA	22
3.1. INTRODUÇÃO.....	22
3.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
3.4. CONCLUSÕES.....	61

	página
4. NÓDULOS PRETOS E COMPETIÇÃO COM ESTIRPES NATIVAS.....	63
4.1. INTRODUÇÃO.....	63
4.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	64
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	71
4.4. CONCLUSÕES.....	89
5. SUMÁRIO.....	91
6. BIBLIOGRAFIA.....	93

RELAÇÃO DOS QUADROS

Quadro	Página
1. Solução nutritiva para vasos Leonard (Norris)	27
2. Meio de cultura para <i>rhizobium</i> (meio 79)	28
3. Resultado geral do experimento I (vasos Leonard)	36
4. Análise da variância - números de nódulos.....	40
5. Análise da variância- peso seco dos nódulos.	41
6. Análise da variância - peso seco das plantas.	42
7. Análise da variância - teor de nitrogênio das plantas	43
8. Análise da variância - nitrogênio total das plantas.....	44
9. Resultado geral do experimento II (vasos Leonard).....	47
10. Análise da variância - número de nódulos	49
11. Análise da variância - peso seco dos nódulos....	50
12. Análise da variância - peso seco das plantas...	51
13. Análise da variância - teor de nitrogênio das plantas.....	52
14. Análise da variância - nitrogênio total das plantas.....	53

Quadro	Página
15. Resultado geral do experimento III (vasos Leonard).....	57
16. Análise da variância do experimento III.....	57
17. Resultado geral do experimento IV (vasos Leonard).....	59
18. Análise da variância do experimento IV	59
19. Resultado geral do experimento V (vasos com solo).....	73
20. Análise da variância - número de nódulos.	74
21. Análise da variância - peso seco de nódulos.....	75
22. Análise da variância - peso seco das plantas.....	76
23. Análise da variância - teor de nitrogênio das plantas	77
24. Análise da variância - nitrogênio total das plantas	78
25. Resultado do experimento VI (microparcelas)	82
26. Análises da variância - número e peso seco de nódulos e peso seco das plantas	82
27. Resultado do experimento VII (microparcelas).....	85
28. Análises da variância - número e peso seco dos nódulos e peso seco das plantas.....	85

Quadro	Página
29. Resultado do experimento VIII (parcelas usuais).....	88
30. Análises da variância do número e peso seco dos nódulos e peso seco das plantas	88

RELAÇÃO DAS FIGURAS

Figuras	Página
1. Vista geral da casa de vegetação do IPEACS	25
2. Vasos de Leonard.....	25
3. Aspecto interno e coloração dos nódulos pretos e normais em labe labe	33
4. Diferença da fixação do nitrogênio atmosférico em labe labe inoculada com estirpes eficientes e estirpes menos eficientes	33

1. INTRODUÇÃO GERAL

As leguminosas oferecem inúmeras formas de aproveitamento e, sem dúvida podemos afirmar que é ponderável o papel das mesmas como forrageiras.

No Brasil, ainda não se concedeu importância real às leguminosas forrageiras, havendo maior interesse para a utilização das gramíneas, que como sabemos, necessitam de complementação proteica, mormente nas estiagens prolongadas, quando o animal mais se ressentir da alimentação deficiente.

As leguminosas forrageiras, segundo autores como Moore (1962), Dirven (1965) e Williams (1967), são capazes de eliminar a deficiência proteica das pastagens gramíneas ou, pelo menos diminuir em muito a complementação com tortas, farelos ou outras fontes de proteína.

As leguminosas forrageiras podem ser divididas nos dois grandes grupos: leguminosas forrageiras de clima temperado e leguminosas forrageiras tropicais. Dentre as primeiras, incluem-se a alfafa (*Medicago sativa* L.), e os trevos (*Trifolium* sp) e, no segundo grupo, Leite (1959) e Salette (1967) citam como principais a alfafa do nordeste (*Stylosanthes guianensis* Sw.), kudzu tropical (*Pueraria javanica* Benth.), calopogônio (*Calopogonium mucunoides* Desv.), centrosema (Cen-

trosema pubescens Benth.), soja perene (*Glycine wishtii* (L) Cv.) labe labe (*Dolichos lablab* L.) e desmodio (*Desmodium* sp).

As pesquisas levadas a efeito para estudar a fixação do nitrogênio atmosférico, a especificidade hospedeira, a nutrição e inoculação com *Rhizobium*, são abundantes nas leguminosas forrageiras temperadas, enquanto que para as leguminosas forrageiras tropicais poucos trabalhos têm sido desenvolvidos.

Pesquisadores como Date e Vincent (1962), Neme (1962), Oke (1966, 1967a, 1967b e 1967c) e outros, afirmam que, em condições propícias, diversas leguminosas forrageiras tropicais possuem características idênticas e, em certos casos, superiores às leguminosas forrageiras de clima temperado.

No Brasil, um dos problemas que se apresenta com relação à fixação do nitrogênio atmosférico pelas leguminosas forrageiras tropicais, é o estudo da necessidade de inoculação e, mais adiante, a obtenção e seleção de estirpes específicas e realmente mais eficazes para cada região.

No estudo dos diversos fatores que interferem na simbiose, e conseqüentemente no sucesso da inoculação, necessário se faz a obtenção de um método simples para a identificação dos nódulos formados pela bactéria inoculada e que permita estudar a competição das estirpes de *Rhizobium* empregadas no inoculante.

Os métodos usados, atualmente, para a identificação

de *Rhizobium* são o da clorose induzida e o sorológico. O primeiro, específico para soja anual, é baseado na clorose (amarellecimento das folhas) que temporariamente ocorre em certas variedades, promovida por determinadas estirpes. O segundo, fundamentado nas reações antigênicas, específicas para cada estirpe, é um método complexo, laborioso e especializado, por isso mesmo pouco utilizado, apesar de sua alta eficiência.

O presente trabalho pretende verificar a possibilidade de obter um processo mais simples, que permita observar a competição de *Rhizobium* do inoculante quando em presença das estirpes não provenientes da inoculação. O método a ser exposto permitirá avaliar o grau de competição, pela simples observação da cor dos nódulos produzidos por estirpes específicas e que possuem a característica de formar nódulos pretos.

Os nódulos pretos foram pela primeira vez observados em *Dolichos lablab* L., por Cloonan (1963) na Austrália, e posteriormente em *Centrosema pubescens* Benth., por Döbereiner (1964) no Brasil.

O uso de estirpes que formam nódulos pretos, permitirá avaliar a competição e a necessidade de inoculação, possibilitará observar o efeito dos diversos fatores que interferem na sobrevivência de *Rhizobium* no solo, e também realizar estudos relacionados com a genética da bactéria e da planta hospedeira.

O nosso trabalho pretende verificar a viabilidade do emprego de estirpes que produzem nódulos pretos, como um méto-

do de avaliação da inoculação e, ao mesmo tempo, observar a inoculação cruzada, destas estirpes, com as diversas leguminosas forrageiras empregadas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. LEGUMINOSAS FORRAGEIRAS TROPICAIS

2.1.1. Considerações gerais

O uso das leguminosas em pastagens merece especial atenção, sobretudo em regiões onde ocorre uma estação seca que paraliza o crescimento das gramíneas, reduzindo assim o suprimento de proteína necessário para os animais (Williams, 1967).

Os estudos de fixação do nitrogênio do ar atmosférico através da simbiose *Rhizobium* - leguminosas tropicais se desenvolveram recentemente, tendo recebido maior atenção dos pesquisadores nos últimos anos (Norris, 1958 e 1967; Ferrari al., et 1967; Souto e Döbereiner, 1968a, 1968b e 1970) Bowen e Kennedy, 1961).

Considerando inclusive a influência dos demais nutrientes necessários ao desenvolvimento de *Rhizobium* e da planta, Freitas em 1970 estimou que para a região centro oeste do Brasil a adição do nitrogênio fixado pelas leguminosas pode atingir valor equivalente a 20 milhões de cruzeiros, o que vem conferir relevante papel à microbiologia dos solos a apresentar um problema básico para a economia do país.

Os trabalhos referentes a plantas forrageiras distinguem, de acordo com a região de origem, dois principais grupos de leguminosas: leguminosas de clima temperado e leguminosas tropicais.

Fazendo um retrospecto geral sobre a ocorrência e importância das leguminosas forrageiras tropicais, Salette e Williams em 1967 destacaram entre outras: a soja perene, labe labe, centrosema, kudzu e calopogônio.

A soja perene é considerada uma leguminosa forrageira com amplas possibilidades de emprego, nos países tropicais pela sua resistência à seca, elevado teor de proteína, palatabilidade e grande poder de competição com as ervas daninhas, entretanto poucos trabalhos têm sido realizados com relação à nutrição e fixação do nitrogênio por essa leguminosa (Neme, 1962; Schaaffhansen, 1963; Bogdan, 1966; Souto e Döbereiner, 1970).

Labe labe, pode ser usada como forragem, fenada ou ensilada e também como adubo verde, e devido ao seu sistema radicular profundo resiste bem a estiagens prolongadas e aproveita melhor os nutrientes do solo (Inforzato e Mascarenhas, 1967).

Kudzu e calopogônio apresentam amplas possibilidades de uso nos países tropicais, possuindo satisfatória capacidade de fixação do nitrogênio atmosférico, já comprovada por Oke (1967b), trabalhando no Congo. Calopogônio por sua grande adaptabilidade chega a tornar-se uma planta invasora)

dominando as espécies nativas.

Segundo Watson (1957), Gargantini e Catani (1958) Gargantini e Galli (1954), Gargantini e Wutke (1960) e Catani, Gargantini e Montojos (1963), centrosema possui capacidade de fixação de nitrogênio superior a várias outras leguminosas tropicais, podendo atingir cerca de 200 kg/ha/ano a quantidade de nitrogênio fixado por essa leguminosa.

2.1.2. Comparação com leguminosas temperadas

Trabalhando com leguminosas tropicais em consorciação com gramíneas, Moore (1960; 1962), Douglas (1962) e Bruce (1965), verificaram que o efeito destas era comparável ao das leguminosas de clima temperado, quando em tipos de solo e condições apropriadas. Rajagopalan (1964), também cita a importância do tipo de solo no desenvolvimento da nodulação, concordando com Norris (1958) no ponto de vista de que as leguminosas tropicais não necessitam calagem, o que as diferencia das leguminosas temperadas.

Riveros (1960) estudando o comportamento de diversas leguminosas temperadas e tropicais concluiu que a quantidade de nitrogênio fixado por estas pode ser considerado equivalente, se forem levadas em conta a disponibilidade de nutrientes essenciais e as exigências da planta e da bactéria.

Trabalhando com mucuna, centrosema, calopogônio kudzu e outras leguminosas tropicais, Oke (1966; 1967a 1967b; 1967c) considerou que a fixação por estas espécies pode ser equivalente e até superior à realizada pelas legumino-

sas temperadas, se forem observados fatores como nutrição da planta e da bactéria e procurando obter estirpes específicas e mais eficientes.

A fixação do nitrogênio utilizando 5 leguminosas tropicais, em cultura isolado, foi realizada por Singh e Chatterjee em 1968, concluindo estes pesquisadores que centrosema e alfafa do nordeste persistiram por mais de dois anos e a quantidade de nitrogênio fixado foi equivalente a das leguminosas de clima temperado.

Estudando a resposta à adubação nitrogenada por várias espécies tropicais e alfafa, em solos de cerrado, recentemente, Jones e Quagliato (1970) verificaram que a adição deste elemento ao solo por alfafa e alfafa do nordeste foram 210% e 75%, respectivamente.

Comparando o efeito da soja perene e alfafa em pastagens consorciadas, Kleinschmidt (1967) observou que a inclusão destas leguminosas elevou o nível do nitrogênio do solo em 70 e 260 quilos, por hectare por ano, respectivamente.

Milford (1967) trabalhando em solos da Austrália, comparou o efeito de 7 leguminosas tropicais com a alfafa, e também chegou à conclusão de que esta última deu produção superior às demais espécies.

2.2. GRUPOS DE INOCULAÇÃO CRUZADA

No estudo da simbiose verificou-se que algumas leguminosas possuem a capacidade de formar nódulos quando inoculadas com estirpes de outras espécies, surgindo então o concei-

to de inoculação cruzada, que compreende um número de espécies hospedeiras com capacidade de nodular e fixar nitrogênio eficientemente quando inoculadas com estirpes isoladas de nódulos de um membro deste grupo (Norris, 1967).

O conceito de grupos de inoculação cruzada foi bastante discutido, depois dos trabalhos de Fred, Baldwin e McCoy (1932), que propuzeram a existência de cerca de 20 grupos de inoculação cruzada, os quais foram depois reduzidos a apenas meia dúzia (Allen e Allen, 1947; Allen e Baldwin 1954).

Wilson (1939), Norris (1956) e Habish e Khairi (1968) consideraram que esta classificação era deficiente, principalmente com referência ao grupo "cowpea".

O grupo trifolium de inoculação cruzada compreende espécies do gênero *Trifolium* e é o mais restrito (Nutman, 1956). *Trifolium ambiguum* Bieb. ocupa neste grupo, uma posição especial devido a formar nódulos apenas com estirpes específicas (Parker, Allen e Ahlgren, 1949) Parker e Allen, 1952).

Utilizando enxertos de *T.ambiguum* tendo *T.repens* L. como cavaleiro, Hely, Bonnier e Manil (1953) demonstraram ser possível superar a dificuldade de *T.ambiguum* formar nódulos com estirpes isoladas de outras espécies do gênero.

O grupo de inoculação cruzada da ervilha é também bastante coerente e possui poucas irregularidades. Experimentos realizados por Hauke-Pacewiszova (1952), sugerem a inclusão de *Gallega officinalis* L. neste grupo, por haver esta no-

dulado com estirpes de *Vicia faba* L. e *Vicia sativa* L. estes resultados não foram confirmados por Proctor (1963), que considerou *G.officinalis* como pertencente ao grupo do tremoço.

Kleczkowska e Thornton (1944) e Kleczkowska, Nutman e Bond (1944), observaram um caso de inoculação cruzada entra uma espécie de trevo e ervilha, conseguindo através de passagens sucessivas nas plantas, e que foi evidenciado por reinoculação com isolamentos dos nódulos produzidos nestas espécies e que foram identificados por testes sorológicos e da susceptibilidade a fagos.

O grupo de inoculação cruzada de *Medicago*, *Mellilotus* e *Trigonella* - é também bastante diferenciado, apresentando apenas dois casos especiais; *Medicago laciniata* Mill e *Medicago hispida* Gaertn. que são resistentes a nodulação por estirpes isoladas das demais espécies do grupo e inclusive por espécies do próprio gênero (Purehase, Vincent e Ward, 1951; Vincent, 1954).

Também pouco se conhece a respeito de irregularidades do grupo de inoculação cruzada *Lupinus-Ornithopus*. Bushnell e Sarles (1939) fazem menção à relação entre o grupo de soja e este grupo. Jensen (1967) evidencia a existência de um grupo de inoculação cruzada envolvendo os gêneros *Ornithopus*, *Lotus*, *Anthilis*, *Caragana*, *Astragalus*, *Ononis*, *Genista*, *Mimosa* e outros, incluindo tanto *Rhizobium* de crescimento lento como de crescimento rápido.

O grupo de inoculação cruzada de cowpea e soja que

deveria ser um das mais estudados pela sua grande importância econômica, possui poucos trabalhos desenvolvidos neste sentido. Estas duas espécies formavam grupos separados (Fred, Baldwin e McCoy, 1932), sendo atualmente consideradas, pela maioria dos autores como formando um único grupo.

Reid (1936) Bushnell e Sarles (1937) e Bushnell e Sarles (1939) e Wilson (1944), verificaram um pequeno grau de inoculação cruzada entre o grupo cowpea e soja com o grupo do tremoço, dependendo sobretudo da época de realização dos testes. Consideraram que deve existir um grande número de tipos sorológicos entre estirpes de *Rhizobium* isoladas de cowpea, soja e tremoço.

Uma grande variedade de leguminosas tropicais e sub-tropicais são incluídas neste grupo, por demais heterogêneo e promíscuo (Sears e Conell, 1927; Walker e Brown, 1935; Allen e Allen, 1936; 1939). Neste grupo foram descritos numerosos casos de inoculação cruzada não recíproca, verificando-se que estirpes isoladas de sesbania nodularam cowpea e soja, entretanto, nenhuma estirpe de cowpea ou soja formou nódulos nestas plantas (Johnson e Allen, 1952).

Burton em 1952 observou determinada especificidade no grupo cowpea, verificando que, em geral estas não necessitam inoculação, entretanto, não fica assegurado o benefício da simbiose. Bowen (1959a; 1959b), mostrou maior especificidade de centrosema com relação a várias outras leguminosas tropicais, sendo difícil seu estabelecimento sem inoculação com

estirpes eficientes. Habish e Khairi (1968) encontraram que *Arachis hypogaea* L. e *Acacia* sp também devem possuir estirpes próprias. Döbereiner (1970), Guzman e Döbereiner (1969) confirmaram a especificidade de centrosema.

Galli (1958) observou que no grupo cowpea algumas espécies ocupam posição especial, formando grupos de inoculação cruzada aos quais não pertence nenhuma das demais espécies. Considerou que dentre as leguminosas empregadas no seu trabalho, *Leucena glauca* Benth. e *Cratylia floribunda* Benth. formavam um grupo isolado, concordando com Wilson (1944) que refere-se a *L. glauca* como incapaz de nodular com estirpes isoladas dos principais grupos de inoculação cruzada. Souto et al. (1970), Döbereiner (1970) observaram que certas variedades de alfafa do nordeste foram unilateralmente específicas, igualmente a centrosema.

No estudo da inoculação cruzada alguns gêneros possuem representantes em diferentes grupos, como é o exemplo de *Phaseolus* em que algumas espécies estão incluídas no grupo de *Phaseolus vulgaris* L. e outras no grupo de *Vigna sinensis* (L.) Endl.

Com referência ao grupo de inoculação cruzada de *Phaseolus*, observou-se um caso de inoculação cruzada não recíproca entre *Dalea alopecuroides* Willd. e *P. vulgaris* por estirpes isoladas de *Vicia faba* L. (Ming Tien, 1963).

Norris (1967) e Robinson (1969) sugerem que as leguminosas, em geral, nodulam mais rápido e eficientemente quan-

do inoculadas com culturas isoladas de hospedeiros homólogos. Em estudo mais detalhado Guzman e Döbereiner (1969) verificaram que não houve correlação entre a origem das estirpes e sua eficácia.

Em livros de texto o gênero *Rhizobium* responsável por cada grupo de inoculação cruzada é considerado como possuindo 6 espécies, sendo *R.trifolii* Dangeard para o grupo dos trêvos, *R.meliloti* Dangeard específico para o gênero da alfafa, *R. leguminosarum* Frank para a ervilha, *R.lupinii* Eckharolt para lupinos, *R.jaconicum* Ruchanan para soja e *Rhizobium* sp para o grupo cowpea. A literatura mais recente tem apresentando argumentos contra esta classificação, entretanto, foge do assunto desta tese entrar em detalhes sobre a conveniência ou não, das diferentes propostas de classificação dentro do gênero *Rhizobium*.

2.3. COMPETIÇÃO COM ESTIRPES NATIVAS

No estudo e seleção de inoculantes mais eficazes é essencial considerar que as estirpes aplicadas como inóculo competem com as existentes no solo, para a formação dos nódulos. Esta competição não está relacionada unicamente com o número de bactérias para as quais as raízes das plantas estão expostas, mas depende também da capacidade relativa de competição das estirpes nos pontos dos pelos absorventes a serem infectados (Jenkins et al., 1954; Means et al., 1961 Purchase e Nutman, 1957; Vincent e Waters, 1953; Vincent e Waters, 1954; Waters, 1956).

Nicol e Thornton (1941) e Read (1953) observaram a grande necessidade da realização de pesquisas sobre a ecologia de *Rhizobium* na proximidade das raízes a fim de se assegurar o estabelecimento de uma simbiose eficiente, tendo Thornton e Kleczkowska (1950), Baird (1955), Vincent (1962) e Johnson e Means (1964) demonstrado haver grande variação entre estirpes na capacidade de formar nódulos nas diferentes espécies de hospedeiros.

Read em 1953 observando a competição entre estirpes de *Rhizobium* em trevo vermelho, verificou que mais de 50% dos nódulos foram formados pelo inoculante, todavia estes experimentos foram conduzidos em solos onde não se cultivava trevo por muitos anos, e é reconhecido que as estirpes nativas específicas para o trevo são de uma maneira geral ineficientes (Vincent e Waters, 1953 e Vincent, 1954). Por outro lado, Abel e Erdman (1964) e Hartwig (1964) verificaram diferença significativa na nodulação de soja quando inoculada com estirpes eficientes. A inoculação foi eficaz quando o plantio foi realizado em solos onde nunca se havia cultivado essa leguminosa e sem efeito em solos onde havia sido plantado soja com inoculante artificial.

Aplicando estirpes isoladas e misturas, variando também o número de células do inoculante Jenkins et al. (1954) verificaram diferença marcante na competição entre estirpes e também, que aumentando o número de células do inoculante favoreceu a formação de nódulos sob várias condições de clima e

solo. Marshall (1956), Waters (1956) e Erdman (1960), estudando a competição entre estirpes de inoculantes comerciais também verificaram uma resposta mais eficiente quando aplicaram misturas de estirpes.

Johnson et al. (1965) trabalhando com soja, verificaram que a proporção dos nódulos formados pelo inoculante aumentava com o aumento do número de bactérias presente no inoculante. Foi observado também que aplicando o inoculante com aditivos (peleteio), aumentou o número de nódulos, embora estes resultados não tenham sido obtidos em todos os experimentos realizados. Cloonan (1966) e Cloonan e Vincent (1967) realizaram trabalhos semelhantes empregando leguminosas forrageiras tropicais e chegaram às mesmas conclusões.

Mais recentemente, Franco et al. (1970) em estudos prévios utilizando estirpes que produzem nódulos pretos verificaram que o peleteio com calcário em centrosema, promoveu um aumento de 78% na formação dos nódulos pelo inoculante e incrementou a fixação do nitrogênio, em solos com toxidês de manganês.

Means et al. (1961) e Johnson e Means (1964) empregando a estirpe 76 que induz clorose em soja, concluíram que esta estirpe foi superior às demais, chegando a formar 86% dos nódulos.

Vincent (1962), Johnson e Means (1963) Damirgi et al. (1967) distinguiram vários serogrupos de *Rhizobium jaconicum* em diferentes tipos de solos, verificando que a ocorrên-

cia destas estirpes era mais condicionada ao tipo de solo do que aos tipos climáticos das regiões onde foram realizados os trabalhos. Por outro lado McLeod (1962), Caldwell (1969) e Simpson e Gibson (1970) verificaram que a resposta à inoculação é diferente para cada local e depende sobretudo da espécie cultivada.

Trabalhando com soja, por 3 anos consecutivos, Caldwell e Hartwig (1970) demonstraram que em cada ano predominavam estirpes diferentes, estando determinado serogrupo de *R. japonicum* associado a um genótipo de soja.

Caldwell e Grant (1968) e mais recentemente Caldwell e Weber (1970) verificaram que sem reinoculação a distribuição dos serogrupos é influenciada pelas diferentes épocas de plantio, estando a ocorrência de determinado serogrupo correlacionada com os diferentes tipos de solo e clima.

2.4. MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE ESTIRPES DE *RHIZOBIUM*

2.4.1. Sorologia

O primeiro trabalho indicando que estirpes isoladas da mesma espécie de planta ou do mesmo grupo de inoculação cruzada poderiam ser sorologicamente diferenciadas foi realizado por Wright em 1925.

Bushnell e Sarles (1939), Kleczkowska e Thornton (1944) e Kleczkowska et al. (1944) empregando Este método verificaram que algumas estirpes de diferentes grupos de inoculação cruzada eram sorologicamente relacionadas.

A heterogeneidade dos nódulos do mesmo grupo de inoculação cruzada foi evidenciada por Vincent (1941; 1942) em alfafa, e por Furchase e Vincent (1949) em trevo.

Pesquisadores como Thornton e Kleczkowska (1950), Vincent e Waters (1953), Abel e Erdman (1964), Simpson e Gibson (1970) evidenciaram a eficiência do método sorológico para identificação do *Rhizobium* inoculado, em estudos de competição com estirpes do solo.

A técnica de aglutinação foi muito bem descrita por Koontz (1961), tendo sido considerada a ocorrência de 6 grupos sorologicamente distintos, dentre 28 estirpes de *Rhizobium japonicum* e 3 de *Rhizobium* sp. Date (1962) e Date e Decker (1965) estudaram 28 estirpes, incluindo 8 das estudadas por Koontz e Faber, verificando a ocorrência de 17 grupos sorológicos. Enquanto Skrdleta (1965) trabalhando com *R. japonicum* dividiu 40 estirpes em apenas 4 grupos sorológicos independentes.

Graham em 1963 testou antígenos de estirpes de *Rhizobium* (3 grupos distintos) contra *Agrobacterium*, observando afinidade de *Rhizobium lupini* e *Rhizobium japonicum* com *agrobacterium radiobacter* e *Agrobacterium tumefaciens*.

Means et al. (1964) desenvolveram um método rápido de identificação de estirpes de *Rhizobium* baseando-se na reação antigênica dos nódulos e não da cultura isolada dos nódulos, como usado no método geral. O método é eficiente dentro de certo limite, e reduz consideravelmente o tempo de determi-

nação, entretanto foi verificado que se deve tomar sérias precauções devido ao efeito das células da planta na reação sorológica do antígeno dos nódulos.

Vincent (1962), Johnson e Means (1963), Damirgi et al. (1967) e outros pesquisadores empregaram este método para distinguir os nódulos formados pelas estirpes do inoculante, quando em competição com as estirpes de *Rhizobium* existentes no solo.

Mais recentemente vem sendo usado o método da imuno-fluorescência para identificação e estudo da ocorrência de *Rhizobium* diretamente no solo e na diferenciação de estirpes isoladas dos nódulos (Bohloul e Schmidt, 1967; Schmidt et al. 1968; Bohloul et al 1968; Bohloul e Schmidt, 1968; Bohloul e Schmidt, 1970).

Dudman e Brockell (1968) e Skrdleta (1970) utilizaram a técnica da imuno-difusão em gel para estudos envolvendo competição e eficiência de estirpes de *Bhizobium japonicum*, obtendo ótimos resultados.

2.4.2. Clorose induzida por *Rhizobium*

Os trabalhos realizados por Clarck (1957a; 1957b), Erdnan et al. (1956), Erdman et al. (1957) e Johnson et al. (1958) comprovaram que algumas variedades de soja apresentavam uma clorose característica quando inoculadas com certas estirpes de *Rhizobium japonicum*.

Trabalhando com 40 variedades de soja, para testara susceptibilidade à clorose induzida por *Rhizobium*, Erdman et

al. (1957) concluíram que o comportamento destas variedades era bastante diferenciado, e apenas seis apresentaram elevada susceptibilidade.

Johnson et al. (1958) verificaram que o aparecimento da clorose induzida está condicionado à interferência de diversos fatores como: concentração de elementos maiores, tratamentos realizados na planta, tipo de substrato utilizado e outros.

Nos estudos de competição com outras estirpes a identificação dos nódulos formados pela estirpe do inoculante é realizada através de testes com seedlings de sorgo (Johnson et al., 1959) que possuem elevada sensibilidade na resposta à clorose quando crescendo em suspensão de nódulos esmagados. Quando não ocorre o aparecimento da clorose em 72 horas, a suspensão é usada para reinocular a soja para confirmação do resultado.

As estirpes que promovem o aparecimento da clorose induzida foram usadas para avaliar a contribuição das estirpes do inoculante quando em competição com as estirpes nativas, por Means et al. (1961), obtendo excelentes resultados fazendo avaliação através da observação visual, no campo, dos diversos graus de clorose apresentados pelas plantas inoculadas com estas estirpes em diferentes proporções. Neste trabalho obteve-se estreita correlação da clorose observada com a percentagem de nódulos produzidos pelas estirpes que induzem clorose.

Usando este método Johnson e Means (1964) tostaram a capacidade de 300 estirpes, em experimentos com condições controladas, verificando que apenas 13 destas competiram com a estirpe 76 que induz clorose. Mesmo quando usada na proporção de 1,1% em mistura com outras estirpes, 85% dos nódulos formados foram provenientes da estirpe 76.

2.4.3. Nódulos pretos

Os nódulos pretos foram observados pela primeira vez por Allen e Allen (1936), em *Vigna marina* Merrill., cultivada ao longo do mar. Mais tarde foram verificados por Cloonan (1963) em *Dolichos lablab* L., na Austrália, e por Döbereiner (1964) em *Centrosema pubescens* Benth., no Brasil. Posteriormente, foi constatada por este último pesquisador a ocorrência deste tipo de nódulos em *Calopogonium mucunoides* Desv., em *Pueraria javanica* Benth., e em *Phaseolus vulgaris* L.

Cloonan (1963) sugeriu que a ocorrência do pigmento preto seria devido a melaninas formadas no tecido bacteróide dos nódulos.

O aparecimento de nódulos pretos independe da eficiência da simbiose e, nódulos pretos mas ineficientes, foram encontrados em *Phaseolus vulgaris* L. inoculado com uma estirpe preta isolada de *Mimosa caesalpinicaeolia* Benth. (Stamford et al., 1968).

Os nódulos pretos podem ser facilmente identificados quando em comparação com os nódulos normais. Enquanto os

nódulos normais têm o tecido bacteróide da cor rosa a vermelho tijolo e a cortex branca, os nódulos pretos possuem o tecido bacteróide púrpura escuro a preto que parece brilhar através da cortex branca.

Os nódulos pretos oferecem uma rara oportunidade para o reconhecimento imediato dos nódulos formados por uma determinada estirpe. O método possibilitará estudar os fatores que interferem na nodulação como: nutrição, reação do solo, toxidês de manganês e alumínio, temperatura do solo, genética da planta e da bactéria, além de permitir avaliar o grau de competição das estirpes do inoculante quando em competição com os microrganismos do solo, colaborando decisivamente para a seleção de inoculantes mais específicos e eficazes.

Cloonan em 1966 e Cloonan e Vincent em 1967 estudaram a nodulação de diversas leguminosas tropicais usando a estirpe CD-756 que produz nódulos pretos em labe labe e verificaram pelo não aparecimento de nódulos com esta característica, que o inóculo havia falhado.

Döbereiner e Coser (1970) estudaram a fixação do nitrogênio e a inoculação cruzada em várias leguminosas tropicais, utilizando estirpes que produzem nódulos pretos, verificando que houve grande variação entre as espécies usadas.

3. NÓDULOS PRETOS E INOCULAÇÃO CRUZADA

3.1. INTRODUÇÃO

A maioria das leguminosas forrageiras tropicais estão geralmente incluídas no clássico grupo de inoculação cruzada "cowpea", considerado como nodulados por uma única espécie que é o *Rhizobium* sp. Este grupo como sugerido por Wilson (1939) apresenta muitas inconsistências. Por outro lado Allen e Allen (1947) consideram que a relação existente entre a planta e a bactéria é a única forma prática de que se pode lançar mão para a classificação de *Rhizobium* merecendo então destaque especial.

Vários trabalhos têm se desenvolvido, recentemente, com a finalidade de estudar as diferentes associações existentes entre as leguminosas tropicais e a bactéria específica, tendo alguns pesquisadores observado a necessidade de se criar sub-grupos de acordo com os diferentes graus de especificidade apresentados pelas diversas espécies.

Algumas leguminosas tropicais mostram-se altamente específicas, só formando nódulos com estirpes homólogas (Galli, 1958; Habish e Khairi, 1968), enquanto outras mostram especificidade unilateral como centrosema (Dowen, 1959a) e al-

gumas variedades de alfafa do nordeste (Döbereiner, 1970 e Souto et al., 1970).

Procurando dar uma contribuição para o complicado estudo da inoculação cruzada, principalmente para o grupo "cowpea", Guzman e Döbereiner (1969) realizaram trabalhos sobre os vários aspectos da simbiose, incluindo a formação, desenvolvimento e eficiência do tecido dos nódulos. Sob esse ponto de vista foi observado que havia uma estreita ligação entre determinadas espécies, formando grupos distintos.

O nosso trabalho pretende verificar a viabilidade do emprego das estirpes que produzem nódulos pretos, como um método de identificação de estirpes de *Rhizobium*, e observar a inoculação cruzada entre as diversas leguminosas forrageiras empregadas.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram instalados em casa de vegetação (Figura 1) quatro experimentos com vasos de Leonard esterilizados, na sede do Instituto de Pesquisas Agropecuárias do Centro Sul (IPEACS - Km 47).

O vaso de Leonard (Figura 2) consiste de uma garrafa, cortada na sua parte inferior, colocada, em posição invertida, dentro de outra garrafa de diâmetro mais largo, sendo esta cortada na parte superior. As garrafas podem ser cortadas facilmente utilizando-se uma resistência que é aquecida até o rubro, diretamente em contato com o vidro, e em seguida provocando-se o resfriamento com água.

Na garrafa que compõe a parte superior do vaso coloca-se areia da praia, lavada em água corrente até eliminação total dos sais solúveis. Introduz-se no gargalo uma bucha de algodão, a fim de impedir a passagem da areia e permitir a contínua ascensão da solução nutritiva adicionada na garrafa inferior, que constitui a parte inferior do vaso.

Depois de convenientemente preparados os vasos são envolvidos em papel e esterilizados em autoclave a 120°C, por uma hora, a 1,5 atm. de pressão.

3.2.1. Delineamento experimental

O primeiro experimento em vasos de Leonard foi conduzido no delineamento em blocos ao acaso com 4 repetições, utilizando um fatorial de quatro leguminosas e oito estirpes, das quais quatro formavam nódulos normais e quatro produziam nódulos pretos nos respectivos hospedeiros de origem. As leguminosas foram: *Glycine wightii* (L.) Cv, (soja perene), *Dolichos lablab* L. (labe labe), *Centrosema pubescens* Benth. (Centrosema) e *Pueraria javanica* Benth. (kudzu tropical). As estirpes pretas foram: CB-756, Do-37, C-101 e CM-7; e as estirpes normais: K-28, Do-4b, C-100 e CM-2.

O experimento II foi um fatorial 5 X 8 com 3 repetições, utilizando as mesmas fontes de variação do primeiro experimento, incluindo ainda a leguminosa *Calopogonium mucunoides* Desv. (calopogônio).

No experimento III foi utilizado o delineamento experimental em blocos ao acaso com 3 repetições, sendo emprega-

Figura 1. Vista geral da casa de vegetação do IPEACS-Km 47.

Figura 2. Vasos de Leonard utilizados nos experimentos em casa de vegetação para controle da contaminação.

da a leguminosa labe labe inoculada com as mesmas estirpes dos dois primeiros experimentos.

O experimento IV foi realizado no delineamento experimental inteiramente casualizados, com 4 repetições, utilizando como planta teste a leguminosa centrosema, inoculada com 6 estirpes específicas, das quais 3 normais e 3 que formam nódulos pretos.

3.2.2. Adubação e inoculação

Em todos os experimentos em vasos de Leonard foi realizada uma adubação básica, sem nitrogênio, usando-se a solução de Norris (1964), constante do quadro 1.

Foram adicionados 250ml da solução nutritiva, na parte inferior dos vasos e 50ml na parte superior, por ocasião do plantio. 15 dias após a primeira aplicação foram colocados mais 250ml em todos os vasos, com exceção de labe labe que recebeu 500ml. Posteriormente foi adicionado água fervida sempre que necessário.

A inoculação compreendeu duas fases distintas: o preparo do inoculante e a inoculação propriamente dita. No preparo do inoculante as estirpes foram purificadas por repicagem para placas de petri com meio 79 (Fred e Waksman, 1928) modificado (quadro 2), usando-se o indicador vermelho congo para diferenciar as colônias de *Rhizobium*, das colônias dos contaminantes, que absorvem o corante tomando coloração vermelha.

Depois de purificadas, as estirpes foram repicadas

Quadro 1. Solução para vasos de Leonard, sem nitrogênio
(Norris, 1964).

Reagente	Quantidade (g)
(1) KCl	2,98
(2) K_2HPO_4	2,00
(3) KH_2PO_4	5,00
(4) $CaSO_4 \cdot 2H_2O$	13,76
(5) $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	9,86
(6) $CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,17
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0,44
$MnSO_4 \cdot 2H_2O$	0,40
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	0,02
H_3BO_3	2,86
(completar para 1000 ml com água destilada)	
(7) $FeSO_4 \cdot 7H_2O$	5,00
Ácido cítrico	5,00
(completar para 1000 ml com água destilada)	

Para cada 20 litros de solução adicionar (1), (2),
(3) e (5).

Adicionar (4) na hora de usar a solução.

Colocar 10 ml de (6) e 20ml de (7).

Quadro 2. Meio de cultura para *Rhizobium* (meio 79 de Fred e Waksman, 1928) modificado.

Reagente	Quantidade/litro
KH_2PO_4	0,4g
K_2HPO_4	0,1g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2g
NaCl	0,1g
Extrato de levedura	100,0ml
Açúcar cristal	10,0g

Para o meio 79 sólido e semi-sólido adicionar respectivamente 20g e 2g de agar-agar comercial desidratado.

para tubos estoque, com meio 79 sólido, tendo azul de bromotimol como indicador, adicionando-se, após o crescimento da cultura, óleo mineral para cobrir as colônias e preservar as estirpes (Means e Erdman, 1963; Vincent, 1970). As estirpes foram repicadas, em duplicata, para frascos erlenmeyers de 125ml com meio 79 semi líquida, usando-se agitador rotativo em temperatura ambiente durante 5 a 7 dias, a fim de promover aeração e acelerar a multiplicação. Só foram usados para inoculação os frascos que apresentaram coloração característica do desenvolvimento de *Rhizobium* produtor de álcali. A inoculação foi realizada 8 dias após a germinação das sementes, adicionando-se duas gotas da cultura por planta.

3.2.3. Semeadura e tratos culturais

As sementes de soja perene, centrosema, kudzu e calopogônio foram escarificadas em ácido sulfúrico concentrado, por 5 minutos, e após, lavadas em água corrente. Antes do plantio todas as sementes foram esterilizadas colocando em álcool etílico a 95% durante 5 minutos, em bicloreto de mercúrio (HgCl_2) 1:500, por mais 5 minutos e logo após lavadas várias vezes com água fervida.

Foram plantadas, por vaso, 5 sementes de *labes labes* e 10 a 12 sementes das demais leguminosas.

Os experimentos I, III e IV foram plantados respectivamente em 28 de julho, 12 e 19 de outubro de 1967, e o experimento II em 23 de março de 1968.

Após a germinação foi feito um desbaste deixando,

por vaso, 2 plantas de labe labe e 5 plantas das demais leguminosas. Apenas no experimento II foi necessário fazer uma pulverização com malatol a 2% para combate ao pulgão.

3.2.4. Colheita

O primeiro experimento foi colhido na seguinte ordem: labe labe em 19 de setembro, centrosema em 2 de outubro e kudzu e soja perene em 8 de outubro de 1967. Os experimentos III e IV foram colhidos no dia 10 de dezembro de 1967, enquanto no experimento II; labe labe, centrosema e calopogônio foram colhidos em 18 de maio e soja perene e kudzu em 20 de maio de 1968.

Foi feita colheita, lavando-se cuidadosamente as raízes das plantas em água corrente, sobre uma peneira, a fim de reter todos os nódulos e raízes por acaso desprendidos. Após as determinações do número e da coloração internas dos nódulos e realizadas as observações preliminares, as plantas e os nódulos foram secos em estufa a 65°C por 72 horas, até peso constante. Posteriormente, foram feitas as determinações de peso seco dos nódulos e peso seco e teor de nitrogênio das plantas. O nitrogênio foi determinado, apenas para os experimentos I e II, usando o método de Kjeldhal semi-micro.

A digestão foi realizada adicionando-se a 200mg da amostra, 2g de sulfato de sódio, 10mg de óxido de mercúrio e 3ml de ácido sulfúrico concentrado. A amostra foi destilada, colocando-se 40mg de sulfato de zinco e 10ml de soda (500g de hidróxido de sódio e 100g de tiosulfato/litro de solução). A

amônia desprendida foi retirada em solução de H_3BO_3 a 2% e titulada com ácido clorídrico, em presença do indicador (vermelho de metila 60mg, verde de bromocresol 150mg e 100 ml de álcool etílico). Foi usado 10 ml do indicador misto por litro de solução de ácido bórico a 2%.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos em casa de vegetação com vasos de Leonard tiveram por finalidade precípua estudar a inoculação cruzada com algumas leguminosas forrageiras tropicais e ainda verificar a formação de nódulos pretos (figura 3) nas diversas combinações, para estudar a possibilidade do uso das estirpes que produzem nódulos pretos como método de identificação de *Rhizobium*.

Experimento I

No primeiro experimento foi estudada a inoculação cruzada entre 4 leguminosas forrageiras tropicais de amplo emprego na região, inoculadas com 4 estirpes que produziam nódulos normais e 4 estirpes que produziam nódulos pretos, quando inoculadas nos seus hospedeiros de origem.

Os resultados gerais obtidos neste experimento, referentes a peso e número de nódulos, peso seco, teor de nitrogênio e nitrogênio total das plantas, estão resumidos nos quadros 3 e 3a, sendo apresentadas as respectivas análises estatísticas nos quadros 4 a 8.

Durante o período do experimento pode-se constatar o início da fixação de nitrogênio, nas plantas que apresentavam simbiose eficiente. Usando as reservas contidas nas sementes, inicialmente as plantas mostravam-se verdes, e após 20 dias, quando se esgotaram estas reservas, começaram a apresentar sintomas de deficiência de nitrogênio, tornando-se verde pálidas. Após 28 dias já se observava o efeito inicial da inoculação, nas plantas dos vasos com estirpes eficientes, sendo este efeito mais evidente 37 dias após o plantio (figura 4).

Figura 3. Aspecto interno e coloração dos nódulos pretos e normais em labe labe.

Figura 4. Fixação do nitrogênio em labe labe, observando-se a diferença na coloração das plantas inoculadas com estirpes eficientes quando em comparação com menos eficientes.

Observa-se nos quadros 3 e 3a, que o número de nódulos formados e o desenvolvimento desses, varia de acordo com a espécie inoculada.

Soja perene e labe labe mostraram-se mais promíscuas, formado nódulos com todas as estirpes usadas, entretanto, estas estirpes apresentaram grande variação na eficácia. As estirpes C-100 e CB-756 foram as mais eficazes para estas espécies, enquanto as estirpes K-28 e C-101 foram incapazes de suprir o nitrogênio necessário à soja perene, e labe labe.

Labe labe segundo Guzman e Döbereiner (1969), apresenta nódulos extremamente grandes quando inoculado com estirpes eficientes e mostrando variação na nodulação, de acordo com a estirpe usada. Diante dos resultados obtidos nesse experimento verificou-se que a variação com referência a número de nódulos nesta leguminosa não foi tão pronunciada, todavia ocorreu diferença significativa com respeito ao peso dos nódulos, comprovando as conclusões daqueles pesquisadores.

Kudzu apresentou uma certa especificidade, não nodulando com a estirpe CM-2. CB-756 a estirpe recomendada na Austrália para a inoculação das espécies mais promíscuas, inclusive kudzu, ficou entre as piores, enquanto Do-37 e C-100 foram as mais eficazes.

Verifica-se que as estirpes isoladas do centrosema nodularam todas as espécies. Por outro lado, esta leguminosa mostrou alta especificidade hospedeira, nodulando apenas com as estirpes isoladas de nódulos de centrosema e com a estirpe

CM-7, que apesar de ter sido isolada de calopogônio comportou-se como uma estirpe própria do centrosema. Este tipo de inoculação cruzada é denominada de especificidade unilateral, já tendo sido observada por Bowen (1959a) e Döbereiner e Coser (1970).

Com base na comprovação deste tipo especial de inoculação cruzada observada em centrosema, parece provável que a estirpe CM-7 seja uma estirpe própria desta leguminosa, e que incidentalmente, por haver sido isolada do calopogônio foi considerada como originária dessa espécie.

QUADRO 3. Resultados da inoculação cruzada do experimento I (médias de 4 repetições).

Espécie de planta	Estirpes	Nódulos/vaso		Pêso médio (mg)	Pêso seco total(mg)	Parte aérea + raiz	
		Nº normais*	Nº pretos			Pêso sêco g/va _{so}	N total mg/vaso
Soja perene	Do-37	2	20	2,7	50	1,4	1,9 27
	K-28	13	0	0,6	8	0,4	1,3 5
	CB-756	37	0	1,5	56	2,2	1,8 39
	Do-4b	10	0	2,4	24	1,1	1,6 18
	C-101	27	0	0,5	15	0,8	1,2 9
	C-100	18	0	3,3	60	1,6	2,0 32
	CM-7	6	25	0,9	27	1,3	1,7 22
	CM-2	11	0	1,9	20	0,7	1,7 12
Labe labe	Do-37	10	20	7,3	220	3,7	1,3 48
	K-28	40	9	2,3	115	2,1	1,3 27
	CB-756	0	47	9,7	450	6,3	2,1 132
	Do-4b	25	13	5,5	210	4,2	1,6 67
	C-101	0	25	2,0	50	1,5	0,9 14
	C-100	35	4	16,2	650	4,4	2,3 102
	CM-7	0	25	11,7	293	3,7	1,8 67
	CM-2	24	0	7,5	180	3,1	2,0 62

* Inclue-se nos nódulos normais os nódulos ainda em formação (jovens)

QUADRO 3a. Resultados da inoculação cruzada do experimento I (médias de 4 repetições).

Espécie de planta	Estirpes	Nódulos/vaso		Pêso médio (mg)	Parte aérea + raiz	
		Nº normais*	Nº pretos		Pêso seco g/vaso	N total mg/vaso
Centrosema	Do-37	0	0	0	0,7	1,3
	K-28	0	0	0	0,7	1,2
	CB-756	0	0	0	0,7	1,2
	Do-4b	0	0	0	0,6	1,3
	C-101	0	79	50	1,5	1,3
	C-100	32	0	170	1,6	2,4
	CM-7	0	48	100	1,4	2,5
	CM-2	0	0	0	0,7	1,1
Kudzu	Do-37	9	27	240	4,5	2,3
	K-28	86	0	70	1,9	1,8
	CB-756	6	0	30	2,4	1,3
	Do-4b	27	0	160	3,5	1,9
	C-101	27	0	30	1,8	1,2
	C-100	44	0	330	4,2	2,3
	CM-7	21	0	120	2,5	1,9
	CM-2	0	0	0	2,1	1,0

* Inclue-se nos nódulos normais os nódulos em formação (jovens).

Observa-se que, de uma maneira geral, nenhuma estirpe comportou-se como altamente eficaz para todas as espécies, entretanto CM-7, Do-37 e C-100 foram as mais promissoras, enquanto K-28, C-101 e CM-2 ficaram entre as menos eficazes.

No estudo dos quadros 5 a 9 verificam-se diferenças significativas na inoculação cruzada entre as espécies com referência ao número e peso de nódulos, peso seco e nitrogênio total das plantas, mas não quanto ao teor de nitrogênio.

Com relação ao peso seco e nitrogênio total das plantas (quadros 7 e 9) observa-se que labe labe suplantou as demais leguminosas, seguida pelo kudzu, soja perene e centrosema.

O segundo objetivo deste experimento foi de observar a formação de nódulos pretos nas diversas espécies, quando inoculadas com as estirpes pretas.

Através do exame dos quadros 4 e 4a verifica-se que a formação de nódulos pretos pelas leguminosas empregadas no trabalho mostraram variação de acordo com a espécie. Centrosema não formou nódulos com esta característica quando inoculada com a estirpe preta C-101, e sim com CM-7 estirpe preta isolada de calopogônio e que normalmente não deveria nodular esta leguminosa. O fato da estirpe C-101 não haver produzido nódulos pretos, como esperado, nos leva a considerar, como bastante provável, a hipótese de contaminação na fase do preparo do inoculante.

Kudzu apresentou-se como a leguminosa mais específi-

ca, neste sentido, formando nódulos pretos unicamente com a estirpe preta Do-37. Labe labe foi bastante regular e promiscua, formando nódulos pretos com todas as estirpes pretas usadas.

É interessante observar que a soja perene apresentou nódulos pretos inoculada com as estirpes Do-37 e CM-7, todavia nos demais experimentos realizados posteriormente, estes resultados não foram confirmados devido ao pequeno tamanho dos nódulos produzidos não permitirem uma fácil identificação.

QUADRO 4. Número de nódulos/vaso (valores transformados em $\sqrt{X + 1}$)

Fonte de variação	G.L.	F
Repetição	3	3,62*
Leguminosas	3	6,78**
Estirpes	7	6,33**
Leguminosas X Estirpe	21	3,65**
Erro	93	

C.V. = 42,95%

As diferenças entre as médias das leguminosas, estirpes e leguminosas X estirpes apresentaram os seguintes resultados pelo teste de Student:

LEGUMINOSAS	médias	ESTIRPES	médias
Labe labe	5,55	C-101	6,10
Kudzu	5,00	C-100	5,70
Soja perene	4,20	CM-7	4,97
Centrosema	3,19	K-28	4,88
dms a 1% = 1,29		Do-37	4,33
		CB-756	3,94
		Do-4b	3,60
		CM-2	2,45
		dms a 1% = 1,85	

LEGUMINOSAS X ESTIRPES

	Do-37	K-28	CB-756	Do-4b	C-101	C-100	CM-7	CM-2
Soja perene	4,86	3,20	5,60	3,02	5,73	4,49	4,41	3,02
Labe labe	5,46	6,29	6,81	5,59	4,60	6,09	4,80	4,77
Centrosema	1,00	1,00	1,00	1,00	8,78	5,71	6,03	1,00
Kudzu	6,01	9,04	2,36	4,80	5,29	6,49	4,63	1,00

dms a 1% = 3,70.

QUADRO 5. Peso seco dos nódulos (mg/vaso). (Valores transformados em $\sqrt{X + 1}$)

Fonte de variação	G.L.	F
Repetição	3	2,11
Leguminosas	3	73,32**
Estirpes	7	20,17**
Leguminosas X estirpes	21	10,07**
Resíduo	93	
C.V. = 36,99%		

As diferenças entre as médias das leguminosas, estirpes, e estirpes X leguminosas apresentaram os seguintes resultados pelo teste t de Student:

LEGUMINOSAS	médias	ESTIRPES	médias
Labe labe	15,28	C-100	16,14
Kudzu	9,77	CM-7	10,34
Soja	5,76	Do-37	9,80
Centrosema	4,40	CB-756	9,34
dms a 1% =	2,09	Do-4b	8,24
		K-28	5,79
		C-101	5,78
		CM-2	4,89
		dms a 1% =	2,98

LEGUMINOSAS X ESTIRPES

[illegible]

QUADRO 6. Peso seco das plantas (g/vaso)

Fontes de variação	G.L.	F
Repetição	3	2,23
Leguminosas	3	67,40**
Estirpes	7	8,70**
Leguminosas X estirpes	21	2,85**
Erro	93	
C.V. = 29,53%		

As diferenças entre as médias, pelo teste t de Student apresentaram diferença significctiva para as leguminosas, estirpes e leguminosas X estirpes, ao nível de 1%.

LEGUMINOSAS	médias	ESTIRPES	médias
Labe labe	3,62	C-100	2,91
Kudzu	2,85	CB-756	2,90
Soja perene	1,18	Do-37	2,60
Centrosema	0,88	Do-4b	2,37
dms a 1% = 0,61.		CM-7	2,20
		CM-2	1,65
		K-28	1,28
		C-101	1,17
		dms a 1% = 0,88	

LEGUMINOSAS X ESTIRPES

	Do-37	K-28	CB-756	Do-40	C-101	C-100	CM-7	CM-2
Soja perene	1,40	0,45	2,17	1,12	0,77	1,60	1,28	0,72
Labe labe	3,75	2,10	6,28	4,25	1,55	4,38	3,68	3,08
Centrosema	0,75	0,67	0,75	0,62	1,54	1,55	1,35	0,72
Kudzu	4,48	1,90	2,40	3,50	1,82	4,15	2,50	2,15

dms a 1% = 1,76

QUADRO 7. Teor de nitrogênio. (Valores transformados em \sqrt{X})

Fonte de variação	G.L.	F
Repetição	3	1,33
Leguminosas	3	2,03
Estirpes	7	12,90**
Leguminosas X estirpes	21	4,15**
Erro	93	
C.V. = 10,62%		

As diferenças entre as médias das estirpes e leguminosas X estirpes pelo teste t de Student apresentaram-se significativas ao nível de 1%.

ESTIRPES	médias
C-100	1,51
CM-7	1,34
Do-37	1,33
Do-4b	1,27
CB-756	1,26
CM-2	1,20
K-28	1,19
C-101	1,05

dms a 1% = 0,13

LEGUMINOSAS X ESTIRPES

	Do-37	K-28	CB-756	Do-4b	C-101	C-100	CM-7	CM-2
Soja perene	1,37	1,18	1,36	1,25	1,09	1,43	1,32	1,30
Labe Labe	1,13	1,11	1,45	1,25	0,97	1,53	1,33	1,40
Centrosema	1,14	1,12	1,08	1,18	1,07	1,54	1,57	1,09
Kudzu	1,51	1,36	1,14	1,39	1,09	1,54	1,36	1,05

dms a 1% = 0,18

QUADRO 8. Nitrogênio total (mg/vaso) (Valores transformados em \sqrt{X})

Fontes de variação	G.L.	F
Repetição	3	1,86
Leguminosas	3	69,42**
Estirpes	7	16,29**
Leguminosas X estirpes	21	4,21**
Resíduo	93	
C.V. = 25.00%		

As diferenças entre as médias das leguminosas, estirpes e leguminosas X estirpes apresentaram os resultados pelo teste t de Student:

LEGUMINOSAS	médias	ESTIRPES	médias
Labe labe	7,65	C-100	7,61
Kudzu	7,03	CM-7	6,58
Soja perene	4,24	CB-756	6,48
Centrosema	4,00	Do-37	6,39
dms a 1% = 0,93		Do-4b	6,18
		CM-2	4,66
		K-28	4,14
		C-101	3,80
		dms a 1% = 1,33	

LEGUMINOSAS X ESTIRPES

	Do-37	K-28	CB-756	Do-4b	C-101	C-100	CM-7	Cm-2
Soja perene	5,09	2,47	5,89	4,18	2,81	5,63	4,60	3,31
Labe labe	6,95	5,12	11,45	8,89	3,78	9,39	8,15	7,49
Centrosema	3,18	2,90	3,00	2,90	4,00	6,10	6,92	3,00
Kudzu	10,34	6,10	5,59	8,71	4,63	9,33	6,68	4,86

dms a 1% = 2,35

Os resultados das análises estatísticas constantes dos quadros 4 a 8 demonstram que embora nem sempre a mesma estirpe seja a mais eficaz para todas as espécies, verifica-se que para cada leguminosa destaca-se uma estirpe preta entre as mais promissoras, mesmo quando não são estirpos homólogas, exceção feita a centrosema que apresentou elevada especificidade hospedeira. Esta afirmação está em pleno acordo com Guzman e Döbereiner (1969) e Döbereiner e Coser (1970), que consideram desnecessário fazer seleção de estirpes para as leguminosas tropicais a partir de estirpes homólogas, como sugerido por Norris (1967).

É conveniente ressaltar que a simples ocorrência de substâncias que dão ao nódulo a coloração preta não significa maior capacidade destas estirpes em fixar nitrogênio, sendo exemplo extremo deste fato, o aparecimento de nódulos pretos, mas ineficientes em *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. e em *Phaseolus vulgaris* L. (Stamford et al., 1968).

Experimento II

O segundo experimento em vasos de Leonard foi realizado com a mesma finalidade do primeiro experimento, incluindo a leguminosa calopogônio e substituindo a estirpe C-101 por C-102 também específica e formadora de nódulos pretos em centrosema.

Os resultados gerais deste experimento constam dos quadros 9 e 9a, estando as respectivas análises estatísticas incluídas nos quadros 10 a 14.

A observação destes quadros revela variações quantitativas nos valores dos dois experimentos, como seria de se esperar, entretanto; nota-se que, com raras exceções são evidenciadas as mesmas conclusões.

Labe labe e soja perene foram as espécies que apresentaram menor variação quanto a nodulação, continuando a formar nódulos com todas as estirpes, comprovando serem muito promíscuas mesmo apresentando variação na eficácia. As estirpes CB-756 e C-100 continuaram como muito promissoras, enquanto K-28 e CM-2 apresentaram-se como as menos eficazes, para estas espécies.

QUADRO 9. Resultados da inoculação cruzada do experimento II (médias de 3 repetições)

Espécie de planta	Estirpe	Nº normais*	Nódulos/vaso	Peso médio (mg)	Peso seco g/vaso	Parte aérea + raiz Nº	N total mg/vaso
Soja perene	Do-37	91	0	0,6	0,6	3,0	18
	K-28	43	0	0,5	0,6	2,2	13
	CB-756	56	0	0,7	0,7	2,6	18
	Do-4b	19	0	0,3	0,3	1,8	5
	C-102	61	0	0,5	0,6	2,8	17
	C-100	34	0	0,6	0,4	2,5	10
	CM-7	73	0	0,3	0,6	2,4	14
	CM-2	28	0	0,7	0,5	2,3	11
Labe labe	Do-37	0	60	17,0	4,2	2,9	121
	K-28	16	0	16,0	3,5	1,5	53
	CB-756	0	49	6,8	4,5	2,7	121
	Do-4b	54	0	6,5	3,2	2,8	57
	C-102	0	69	10,0	3,4	2,5	85
	C-100	44	0	7,7	3,7	2,5	92
	CM-7	0	70	4,8	5,0	2,9	145
	CM-2	15	0	7,8	2,7	1,2	32
Centrosema	Do-37	27	17	1,0	0,7	2,4	17
	K-28	0	0	0	0,5	1,6	8
	CB-756	0	0	0	0,6	1,9	11
	Do-4b	0	0	0	0,7	1,6	11
	C-102	9	66	1,1	0,8	3,1	25
	C-100	90	0	1,0	1,0	2,9	29
	CM-7	7	41	1,0	0,8	2,1	17
	CM-2	0	0	0	0,6	1,6	10

* Inclue-se nos nódulos normais os nódulos em formação.

QUADRO 9a. Resultados da inoculação cruzada do experimento II (médias de 3 repetições)

Espécie de planta	Estirpes	Nódulos/vaso			Pêso médio (mg)	Parte aérea + raiz		
		Nº normais*	Nº pretos	Pêso seco total(mg)		Pêso Sêco g/vaso	N%	N total mg/vaso
Kudzu	Do-37	0	16	63	4,0	0,3	2,1	6
	K-28	23	0	10	0,4	0,4	1,8	7
	CB-756	7	0	77	11,0	0,4	1,9	7
	Do-4b	15	0	42	2,8	0,3	2,0	6
	C-102	0	11	99	0,9	0,3	2,8	8
	C-100	21	0	46	2,0	0,3	1,4	4
	CM-7	19	0	69	3,6	0,3	2,4	7
	CM-2	0	0	0	0	0,2	1,1	2
Calopogônio	Do-37	0	147	23	0,1	0,7	2,4	17
	K-28	55	0	8	0,1	0,4	1,6	6
	CB-756	0	110	17	0,3	0,7	3,0	24
	Do-4b	103	0	27	0,2	0,9	2,4	22
	C-102	0	156	18	0,1	0,9	3,2	29
	C-100	93	0	20	0,2	0,8	2,1	16
	CM-7	0	116	22	0,1	0,9	2,7	24
	CM-2	0	0	0	0	0,5	1,4	7

* Inclue-se nos nódulos normais os nódulos em formação.

QUADRO 10. Número de nódulos/vaso. (Valores transformados em $\sqrt{X + 1}$)

Fontes de variação	G.L.	F
Repetição		2,69
Leguminosas	4	46,94**
Estirpes	7	20,31**
Leguminosas X estirpes	21	4,53**
Resíduo	78	
C.V. = 33,18%		

As diferenças entre as médias das leguminosas e estirpes a 1% leguminosas X estirpes a 5%, pelo teste t de Student apresentaram os seguintes resultados:

LEGUMINOSAS	médias	ESTIRPES	médias
Calopogônio	9935	C-102	8,25
Labe labe	6,99	Do-37	8,08
Soja perene	6,83	CM-7	7,80
Centrosema	4,47	C-100	7,22
Kudzu	3,60	Do-4b	5,53
dms a 1% = 1,25		CB-756	5,45
		K-28	4,69
		CM-2	2,95
		dms a 1% = 1,60	

LEGUMINOSAS X ESTIRPES

	Do-37	k-28	CB-756	Do-4b	C-102	C-100	CM-7	CM-2
Soja perene	9,58	6,33	7,47	4,37	7,67	5,79	8,26	5,09
Labe labe	7,59	4,11	7,00	8,04	8,31	6,58	8,35	5,95
Centrosema	6,69	1,00	1,00	1,00	8,89	9,20	6,89	1,00
KudZu	4,48	4,68	1,35	4,05	3,85	4,73	4,65	1,00
Calopogônio	12,08	7,34	10,45	10,18	12,53	9,70	10,83	1,72

dms a 5% = 3,59

QUADRO 11. Peso seco dos nódulos. (Valores transformados em $\sqrt{X + 1}$)

Fontes de variação	G.L.	F
Repetição		0,01
Leguminosas	4	105,61**
Estirpes	7	9,91**
Leguminosas X estirpes	28	2,13**
Erro	78	
C.V. = 36,43%		

As diferenças entre as médias das leguminosas, estirpes e leguminosas X estirpes pelo teste de Student ao nível de 1% apresentaram os seguintes resultados:

LEGUMINOSAS	médias	ESTIRPES	médias
Labe labe	17,98	CM-7	9,73
Calopogônio	6,61	Do-37	9,56
Soja perene	5,38	C-100	9,48
Centrosema	4,57	C-102	9,22
Kudzu	3,84	CB-756	7,76
dms a 1% = 2,15		Do-4b	6,92
		K-28	5,48
		CM-2	4,07
		dms a 1% = 2,75	

LEGUMINOSAS X ESTIRPES

	Do-37	k-28	CB-756	Do-4b	C-102	C-100	CM-7	CM-2
Soja perene	7,48	5,50	6,53	2,88	6,02	4,77	5,27	4,60
Labe labe	20,54	16,06	18,38	18,87	17,18	20,99	23,26	8,59
Centrosema	6,85	1,00	1,00	1,00	8,44	10,22	7,09	1,00
Kudzu	8,00	3,21	8,83	6,59	10,02	6,79	8,37	1,00
Calopogônio	4,95	1,66	4,10	25,25	4,43	4,66	4,67	1,00

dms a 1% = 6,18

QUADRO 12. Peso seco das plantas. (Valores em g/vaso).

Fonte de variação	G.L.	F
Repetição	2	0,85
Leguminosas	4	306,92**
Estirpes	7	3,03**
Leguminosas X estirpes	28	2,13**
Erro	78	
C .V. = 23,18%		

As diferenças entre as médias das leguminosas, estirpes e leguminosas X estirpes a 1% pelo teste t de Student apresentaram os seguintes resultados:

LEGUMINOSAS	médias	ESTIRPES	médias
Labe labe	3,79	CM-7	1,52
Centrosema	0,73	CE-756	1,46
Calopogônio	0,70	Do-37	1,30
Soja perene	0,53	C-102	1,24
kudzu	0,33	C-100	1,19
dms a 1% = 0,28		Do-4b	1,11
		K-28	1,06
		CM-2	0,93
		dms a 1% = 0,40	

LEGUMINOSAS X ESTIRPES

	Do-37	k-28	CB-756	Do-4b	C-102	C-100	CM-7	CM-2
Soja perene	0,60	0,56	0,72	0,30	0,58	0,38	0,55	0,47
Labe labe	4,16	3,50	4,50	3,24	3,43	3,70	5,03	2,76
Centrosema	0,73	0,53	0,60	0,73	0,76	1,00	0,83	0,66
Kudzu	0,26	0,35	0,35	0,37	0,28	0,29	0,25	0,22
Calopogônio	0,70	0,36	0,76	0,90	0,90	0,83	0,93	0,50

dms a 1% = 0,89

QUADRO 13. Teor de nitrogênio (Valores transformados em \sqrt{X})

Fonte de variação	G. L.	F
Repetição	2	4,96
Leguminosas	4	1,88
Estirpes	7	13,31**
Leguminosas X estirpes	28	3,95**
Erro	78	
C.V. = 10,00%		

As diferenças entre as médias das estirpes e das leguminosas X estirpes, pelo teste t de Student, no nível de 1% apresentaram os seguintes resultados:

ESTIRPES	médias
C-102	1,69
Do-37	1,58
CM-7	1,58
CB-756	1,54
C-100	1,50
Do-4b	1,39
K-28	1,32
CM-2	1,24

dms a 1% = 0,15

LEGUMINOSAS X ESTIRPES

	Do-37	k-28	CB-756	Do-4b	C-102	C-100	CM-7	CM-2
Soja perene	1,72	1,49	1,60	1,37	1,66	1,59	1,55	1,54
Labe labe	1,69	1,23	1,63	1,36	1,58	1,58	1,70	1,10
Centrosema	1,54	1,25	1,37	1,28	1,75	1,70	1,45	1,30
Kudzu	1,44	1,36	1,38	1,43	1,66	1,17	1,55	1,08
Calopogônio	1,54	1,27	1,71	1,53	1,79	1,46	1,64	1,20

dms a 1% = 0,65

QUADRO 14. Nitrogênio total (mg/vaso) (Valores transformados em \sqrt{X})

Fonte de variação	G.L.	F
Repetição	2	4,45*
Leguminosas	4	190,55**
Estirpes	7	9,78**
Leguminosas X estirpes	28	3,57**
Erro	78	
C.V. = 20,40%		

As diferenças entre as médias das leguminosas, estirpes e estirpes X leguminosas, pelo teste t de Student, ao nível de 1% apresentaram os seguintes resultados:

LEGUMINOSAS	médias	ESTIRPES	médias
Labe labe	9,21	CM-7	5,49
Calopogônio	4,12	C-102	5,40
Centrosema	4,03	Do-37	5,23
Soja perene	3,60	CB-756	5,15
Kudzu	2,31	C-100	4,77
dms a 1% = 0,67		Do-4b	4,11
		K-28	3,80
		CM-2	3,30
		dms a 1% = 0,85	

LEGUMINOSAS X ESTIRPES

	Do-37	K-28	CB-756	Do-4b	C-102	C-100	CM-7	CM-2
Soja perene	4,35	3,82	4,23	2,33	3,91	3,11	3,70	3,35
Labe labe	10,91	7,25	10,83	7,79	9,38	9,62	12,08	5,85
Centrosema	4,17	2,88	3,37	3,45	5,63	5,29	4,15	3,31
Kudzu	2,36	2,61	2,58	2,37	2,76	1,86	2,61	1,40
CaloPogônio	4,35	2,43	4,74	4,61	5,33	4,00	4,92	2,61

dms a 1% = 1,90

Kudzu ainda apresentou determinada especificidade, sem formar nódulos com a estirpe CM-2. Centrosema mais uma vez mostrou-se como a mais específica, no entanto, neste experimento apresentou formação de alguns nódulos quando inoculada pela estirpe Do-37, isolada de labe labe e que no experimento anterior não produziu nódulos em centrosema. Parece provável que as estirpes pretas são bastante promissoras e, além disto, deve-se considerar que segundo Bowen e Kennedy (1961), centrosema apresenta especificidade variável de acordo com as diversas variedades. No presente trabalho as sementes usadas não foram selecionadas e apresentavam características visuais diferentes.

Com referência formação e desenvolvimento de nódulos eu calopogônio, os resultados apresentados estão plenamente de acordo com os obtidos por Guzman e Döbereiner (1969), tendo esta espécie mostrado maior capacidade de formar nódulos com todas as estirpes. O Por outro lado o peso total de nódulos produzidos, nas condições experimentais usadas, foram muito baixos, embora o teor de nitrogênio apresentado tenha sido razoável com relação ao das demais leguminosas.

Soja perene, labe labe e calopogônio parecem constituir um grupo com características semelhantes de nodulação, formando nódulos com todas as estirpes, enquanto Kudzu e mais especialmente centrosema apresentam-se resistentes à nodulação, mostrando certa especificidade.

A estirpe C-102 introduzida neste experimento desta-

cou-se das demais, evidenciando a afirmação de que as estirpes de centrosema, em geral, são mais eficazes na nodulação das leguminosas tropicais (Döbereiner, 1970).

Verifica-se nos quadros 10 a 14 que as espécies usadas também apresentaram-se estatisticamente diferentes com relação ao número e peso de nódulos e peso seco e nitrogênio total das plantas, mas não quanto ao teor de nitrogênio.

Labe labe foi a espécie que mostrou maior vigor vegetativo, seguida de centrosema e calopogônio. Kudzu, neste experimento foi a espécie que apresentou menor desenvolvimento, possivelmente por influência das baixas temperaturas ocorridas na fase inicial do experimento.

Com referência ao estudo dos nódulos pretos os resultados foram inteiramente de acordo com os obtidos no experimento anterior, sendo que calopogônio, a espécie introduzida, apresentou-se como uma das mais promíscuas, formando nódulos pretos com todas as estirpes pretas.

A estirpe preta C-102 formou nódulos com esta característica em todas as espécies usadas, entretanto em soja perece os nódulos formados foram muito pequenos, são permitindo sua fácil identificação.

Experimento III

Este experimento foi realizado com a finalidade de constatar a nodulação de labe labe, que no primeiro experimento apresentou a ocorrência de nódulos normais e pretos, em tratamentos de inoculação com estirpes pretas.

Os resultados deste experimento constam apenas do número e peso de nódulos e peso seco das plantas, estando apresentados no quadro 15, com as respectivas análises estatísticas apresentadas no quadro 16.

As conclusões deste experimento evidenciam que, nas condições experimentais usadas, esta leguminosa possui a característica de formar nódulos extremamente grandes (Döbereiner e Coser, 1970) e que de uma maneira geral nodula muito bem com a maioria das estirpes de *Rhizobium* do grupo "Cowpea" (Inforzato e Mascarenhas, 1967).

Observa-se pelo, exame do quadro 15, que as estirpes pretas só formaram nódulos com esta característica, e também que foram bastante eficazes na nodulação, confirmando os resultados obtidos nos experimentos anteriores.

QUADRO 15. Resultados da inoculação de labe labe com estirpes normais e pretas (Exp. III - médias de 4 repetições).

Estirpe	Peso seco da planta(g) / vaso	N° nódulos/vaso		Peso nódulos (mg)/vaso	
		normais	pretos	normais	pretos
Do-37	6,5	0	38	0	698
K-28	1,4	22	0	66	0
CB-756	7,5	0	39	0	843
Do-4b	3,6	23	0	417	0
C-101	7,4	0	48	0	906
C-100	6,7	47	0	800	0
CM-7	6,4	0	39	0	663
CM-2	4,5	25	0	380	0

As diferenças entre as médias dos estirpes, com relação ao peso seco das plantas, pelo teste t de Student, apresentaram diferença significativa com dms a 1% = 2,5.

QUADRO 16. Análise da variância do experimento III (valores F)

Fonte de variação	G.L.	F		
		Peso planta (g)	N° nódulos	Peso nódulos (mg)
Repetição	2	1,91	1,10	0,13
Tratamento	7	9,90**	1,54	0,35
Resíduo	14			
C.V.		20%	41%	26%

Experimento IV

O experimento IV foi realizado para verificar a formação de nódulos pretos em centrosema, quando inoculada pela estirpe preta C-101, isolada de nódulos pretos e que no primeiro experimento não formou nódulos deste tipo.

Os resultados deste experimento estão resumidos no quadro 17, encontrando-se no quadro 18 as análises estatísticas para as determinações realizadas.

No quadro 17 verifica-se que as 3 sub-estirpes isoladas de nódulos pretos confirmaram a capacidade de formar nódulos pretos, entretanto, demonstrando grande variação na formação e desenvolvimento dos nódulos.

Estes resultados evidenciam a possibilidade de esta estirpe haver sofrido contaminação no primeiro experimento em vasos de Leonard, durante a fase de preparo do inoculante.

3.3.2. Apreciação dos resultados

A análise dos dados obtidos nos experimentos em vasos de Leonard permite considerar que as leguminosas forrageiras tropicais apresentam determinada inconsistência quando classificadas fazendo parte de um único grupo.

Verificou-se que das 5 leguminosas estudadas houve variação gradativa na especificidade, aparecendo centrosema com especificidade unilateral, kudzu foi razoavelmente específica, enquanto as demais apresentaram-se como bastante promíscuas.

A especificidade unilateral apresentada por centro-

QUADRO 17. Resultados da inoculação de centrosema com estirpes homólogas, pretas e normais (Experimento IV) - médias de 4 repetições.

Estirpe	Peso seco da planta (g) / vaso	Nº nódulos/vaso		Peso nódulos (mg) / vaso	
		normais	pretos	normais	pretos
C-100a	3,1	83	0	575	0
C-100b	2,1	65	0	280	0
C-100c	2,1	68	0	352	0
C-101a	2,3	0	97	0	430
C-101b	1,0	0	67	0	167
C-101C	2,4	0	75	0	287

As diferenças entre as médias das estirpes, com relação ao peso seco das plantas, pelo teste t de Student apresentaram diferença significativa com dms a 5% = 1,6.

QUADRO 18. Análises da variância do experimento IV (valores F)

Fonte de variação	G.L.	F		
		Peso plantas (g)	Nº nódulos totais	Peso nódulos (mg)
Tratamento	5	3,24	0,70	2,08
Resíduo	18			
C.V.		22%	38%	40%

sema, confirmada em trabalhos anteriores (Bowen, 1959a; Döbereiner e Coser, 1970), foi também observada em alfafa do nordeste (Döbereiner, 1970; Souto et al., 1970), indicando isto que estas leguminosas são de difícil nodulação, e só se deixam infectar por estirpes altamente eficazes, como são provavelmente CM-7, Do-37 e algumas estirpes de centrosema e alfafa do nordeste (variedade IRI-1022), explicando a eficácia maior destas estirpes, em todas as espécies.

Ficou também evidenciado no presente trabalho que a nodulação das leguminosas forrageiras tropicais é influenciada em maior escala pela estirpe do que propriamente pela origem destas estirpes, embora se constata variação na eficácia, também observada por Guzman e Döbereiner (1970).

Com vistas ao segundo objetivo destes experimentos verifica-se que, em condições esterilizadas, quando uma estirpe preta forma nódulos com esta característica, em determinado hospedeiro, não produz nódulos normais. Tal fato permite concluir que é evidente a utilização destas estirpes na identificação de *Rhizobium* inoculado, sendo entretanto esta característica inerente às leguminosas forrageiras tropicais, algumas leguminosas como feijão e sabiá (Stamford et al., 1968) além de outras leguminosas arbóreas da família Mimosoidae (Campêlo e campêlo, 1970).

O presente método poderá se constituir num instrumento de destaque para a resolução de problemas básicos que envolvem inoculação cruzada entre as leguminosas tropicais,

problemas estes que necessitam serem estudadas e definitivamente elucidados a fim de promover condições para o estabelecimento de uma simbiose eficiente e a obtenção de inoculantes eficazes.

3.4. CONCLUSÕES

Em decorrência dos resultados obtidos nos experimentos realizados podemos considerar as observações e conclusões seguintes:

3.4.1. Inoculação cruzada e nódulos pretos

(1) A inoculação cruzada das cinco leguminosas estudadas evidenciaram distintos graus de especificidade: centrosema como já observado apresentou alta especificidade hospedeira, kudzu mostrou determinada especificidade enquanto soja perene, labe labe e calopogônio foram as mais promíscuas.

(2) Parece provável que centrosema apresenta certa resistência à nodulação, todavia pode formar nódulos com estirpes isoladas de outras espécies quando estas são mais eficazes, como foi o caso das estirpes CM-7 e Do-37.

(3) Nenhuma estirpe comportou-se como altamente eficaz para todas as espécies, entretanto, de uma maneira geral CM-7, C-100 e C-102 apresentaram-se como as mais promissoras, enquanto K-28 e CM-2 foram as menos eficazes.

(4) Os valores mais elevados para peso de nódulos, peso seco das plantas e nitrogênio total foram apresentados

por labe labe que superou as demais leguminosas empregadas, sem contudo mostrar diferença significativa para o teor de nitrogênio.

(5) Calopogônio foi a espécie que apresentou maior promiscuidade na formação de nódulos, entretanto esta espécie foi a que mostrou menor peso por unidade de nódulos.

(6) Foi observado que embora nem sempre a mesma estirpe seja a mais eficaz para todas as espécies, para cada leguminosa destacou-se entre as mais promissoras uma estirpe formadora de nódulos pretos.

(7) Na nodulação característica das estirpes pretas foi evidenciada que estas estirpes não produziram nódulos normais, permitindo concluir que o uso destas estirpes, na identificação de *Rhizobium*, é efetivo e apresenta boa precisão, em condições esterilizadas.

(8) As estirpes CM-7 e C-102 foram as que se apresentaram mais promissoras para uso no método dos nódulos pretos na identificação de *Rhizobium*.

4. NÓDULOS PRETOS E COMPETIÇÃO COM ESTIRPES NATIVAS

4.1. INTRODUÇÃO

O estudo de inoculação nas leguminosas tropicais tem apresentado problemas aos pesquisadores, principalmente pela dificuldade em se identificar na nodulação, a participação da estirpe inoculada.

Devido a seleção natural em favor da sobrevivência no solo, na ausência do hospedeiro, as estirpes nativas não possuem elevada eficácia, todavia, apresentam grande capacidade de competição com as estirpes do inoculante, interferindo no estabelecimento de uma simbiose eficiente (Nicol e Thornton, 1941; Marshall, 1956; Vincent, 1968).

Trabalhos realizados por Cloonan (1966) e Cloonan e Vincent (1967), utilizando solos basálticos da Austrália, dão conta de que com inoculação normal não são obtidos bons resultados com algumas leguminosas forrageiras tropicais como *Dolichos lablab* L. e *Vigna sinensis* L. (Endl.), sendo necessário realizar-se estudos para verificar a introdução de adesivos outros meios que permitam melhores condições iniciais para que as estirpes do inoculante participem mais decisivamente na simbiose.

Os métodos usados atualmente para a identificação

de estirpes de *Rhizobium* são específicos como o da clorose induzida (Means et al., 1961), ou muito laboriosos e especializados como o sorológico (Koontz e Faber, 1961; Menns et al., 1964; Bohlool e Schmidt, 1967).

O emprego das estirpes pretas na identificação dos nódulos produzidos pelas bactérias do inoculante já foi realizada em trabalhos prévios com algumas leguminosas tropicais, por Cloonan (1966), Franco e Döbereiner (1970) e Döbereiner e Cosser (1970), sem contudo haver sido devidamente comprovada a eficiência e precisão do método.

O presente trabalho pretende verificar a viabilidade do método dos nódulos pretos na identificação das estirpes de *Rhizobium* empregadas no inoculante e também avaliar o grau de competição destas estirpes em diferentes tipos de solos e épocas de plantio.

4.2. MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1. Experimento em vasos com solo

Experimento V

O solo foi coletado na área do Departamento de Fito-tecnia, na profundidade de 0 a 15cm, seco ao ar, passado em peneira de 5mm, homogeneizado em misturador rotativo com capacidade para 50kg e depois colocados 2,5kg por vaso de polietileno.

Pela adição de 2g de carbonato de cálcio, por vaso, foi verificado, por amostragens, em cada vaso, que o pH inicial de 4,3 foi corrigido para o valor médio 6,0.

As características químicas do solo usado (média de 6 repetições) para 100g de solo seco ao ar, são as seguintes: P-2,00 ppm (extração com HCl 0,05N + H₂SO₄ 0,025N); Ca⁺⁺ - 1,25mE Mg⁺⁺ - 0,41mEg Al⁺⁺⁺ - 0,20mE; N - 0,11%; C - 0,87%; C/N - 7,90 e pH (H₂O) - 4,3.

Foi feita análise física apenas para determinação do equivalente de umidade, apresentando o valor médio de 10,8%.

Delineamento experimental

Foi usado o delineamento em blocos ao acaso, com 4 repetições e as seguintes fontes de variação: 5 leguminosas e 3 tratamentos (estirpe normal, estirpe preta e testemunha).

Para cada espécie foram usadas as estirpes carres-pondentes ao esquema abaixo, com base nos resultados obtidos nos experimentos em vasos de Leonard.

Tratamento (estirpes)	Leguminosas				
	Soja perene	labe labe	centrosema	kudzu	calo- pogô- nio
Normais	CB-756	Do-4b	C -100	K-28	CM-2
Pretas	Do-37	Do-37	c-102	Do-37	CM-7

Adubação e inoculação

Foi feita uma adubação básica para o solo usado, sendo aplicado, como suprimento de fósforo e potássio, 12,5 ml de uma solução contendo 35g/litro de fosfato monobásico (KH₂PO₄), e para o magnésio e elementos menores usou-se 2ml

da solução abaixo, por vaso:

MgSO ₄ .7H ₂ O	150,0g
CuSO ₄ .5H ₂ O	15,8g
Fe(SO ₄) ₂ .7H ₂ O	20,0g
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,9g
H ₃ BO ₃	1,0g
Na MoO ₄ .2H ₂ O	7,0g
Ácido cítrico.....	20,0g
H ₂ O	1000ml

Foi adicionada palha de arroz (2%), com a finalidade de de imobilizar o nitrogênio mineral (Pate e Dart, 1961; Broadbent e Tyler, 1962; Broadbent e Nakashima, 1965).

A inoculação nos dois primeiros blocos foi feita adicionando-se 2ml da cultura de *Rhizobium*, misturado com 2g de turfa, esterilizada e neutralizada, às sementes.

Os outros dois blocos foram inoculados adicionando, a cada vaso já semeado, 10ml da cultura líquida, preparada como descrita nos experimentos em vasos de Leonard.

Plantio e tratos culturais

O plantio foi realizado em 2 de maio de 1968, colocando-se, por vaso, 5 sementes de labe labe e 10 a 12 sementes das demais leguminosas, que foram previamente escarificadas com ácido sulfúrico concentrado.

Foi feito um desbaste 15 dias após a germinação, deixando-se 3 plantas de labe labo e 5 plantas das demais es-

pécies, por vaso.

Masefield (1961 1968) observou considerável efeito da umidade sobre a nodulação, devendo o teor de umidade no solo ser controlado com o máximo rigor. Inicialmente foi feita a irrigação baseada na determinação do equivalente de umidade, e posteriormente, quando o peso das plantas já influenciava na pesagem dos vasos, foi controlada a umidade adicionando-se água, lentamente, até saírem as primeiras gotas pelo orifício de drenagem.

Quando as plantas apresentaram-se bastante desenvolvidas foi colocado suporte de bambu para evitar o engavinhamento.

Colheita

Labe labe foi colhido em 6 de junho, soja perene e calopogônio em 8 de junho e kudzu e centrosema em 9 de junho de 1968.

Foram feitas determinações do número de nódulos pretos e normais e de nódulos ainda em formação. Posteriormente foram realizadas as determinações de peso seco de nódulos e peso seco e teor de nitrogênio das plantas. O nitrogênio foi analisado, pelo método de Kjeldhal (semi-micro), como descrito no experimento I.

4.2.2. Experimentos microparcels

Experimentos VI e VII

O primeiro experimento microparcels foi lançado em

um solo da série silvicultura, e o segundo no mesmo tipo de solo do experimento em vasos (série Itaguaí), ambos pertencentes ao grande grupo podzólico vermelho amarelo.

As análises químicas dos solos (média de 6 amostras) coletadas na profundidade de 0 a 15cm, apresentaram os seguintes resultados:

Experimento VI (série silvicultura): P - 1,00 ppm (extração com HCl 0,05N e H₂SO₄ 0,025N); K - 0,05mE; Ca⁺⁺ - 0,72mE; Mg⁺⁺ - 0,70mE; Al⁺⁺⁺ - 0,30mE; N - 0,09%, C - 0,82%; C/N - 9,10 e o pH(H₂O) - 4,20.

Experimento VII (série Itaguaí): P - 2,00ppm (extração com HCl 0,05N e H₂SO₄ 0,025N); K - 0,14mE; Ca⁺⁺ - 1,25mE; Mg⁺⁺ - 0,41mE; Al⁺⁺⁺ - 0,20mE; N - 0,11%; C - 0,87%; C/N - 7,90 e pH(H₂O) - 4,30.

Delineamento experimental

Foi usado o delineamento em blocos partidos, com 4 repetições, empregando 3 leguminosas e 3 tratamentos (inoculante com estirpes pretas, estirpes normais e sem inoculação).

No experimento VI foram empregadas as leguminosas labe labe, centrosema e calopogônio, inoculadas respectivamente com as estirpes pretas: CB-756, C-101, CM-7; e normais o Do-4b, C-100 e CM-2.

No experimento VII foram empregadas as leguminosas labe labe, centrosema e kudzu, inoculadas, respectivamente, com as estirpes "pretas": CB-756, C-102 e Do-37; e as nor-

mais: Do-4b, C-100 e K-28.

Nos experimentos microparcels foi obedecido o espaçamento de 20cm entre covas e 0,40cm entre linhas, com 12 covas por fileira, cada uma das fileiras representava uma unidade experimental, sendo que nas parcelas foram colocadas os inoculantes, e nas sub-parcelas as leguminosas, visando reduzir a contaminação entre inoculantes.

Adubação e inoculação

Em ambos experimentos foi realizada adubação fosfatada e calagem, na dose correspondente à aplicação de 500kg de superfosfato simples e 2 toneladas de calcário dolomítico, por hectare, aplicados, por ocasião do plantio, nos sulcos.

A inoculação foi feita misturando 2g de turfa, neutralizada e esterilizada, com 2ml da cultura de *Rhizobium*, recobrando as sementes totalmente. As sementes de centrosema, calopogônio e kudzu foram previamente escarificadas com ácido sulfúrico.

Plantio e tratos culturais

Logo após a inoculação foi efetuado o plantio, em leirões, colocando-se, por cova, 5 sementes de labe labe e 10 a 12 das demais leguminosas. O primeiro experimento em microparcels foi plantado em 24 de maio, e o segundo em 15 de dezembro de 1967.

Nos dois experimentos foi realizado desbaste, deixando-se 3 plantas de labe labe e 5 plantas das demais leguminosas, por cova.

Colheita

O experimento VI foi colhido no dia 25 de julho de 1967, e o experimento VII no dia 10 de março de 1968. Foram colhidas 10 covas por fileira, sendo eliminadas duas covas das extremidades.

As plantas foram colhidas, procurando-se retirar todo o sistema radicular, recolhendo-se os nódulos por acaso desprendidos. Em sacos de papel foram conduzidas ao laboratório para realizar as determinações de cor e número de nódulos, e do peso seco das plantas e dos nódulos, conforme descrito no experimento 1.

4.2.3. Experimento parcelas usuais

Experimento VIII

Foi realizado apenas um experimento de campo com parcelas tamanho usual, utilizando o mesmo tipo de solo do primeiro experimento microparcels (série Silvicultura).

Delineamento experimental

Foi utilizado o delineamento em blocos ao acaso, com 4 repetições, tendo centrosema como planta teste, inoculada com: estirpe preta, C-101; estirpe normal, C-100 e o tratamento sem inoculante (testemunha).

Usou-se o espaçamento de 30cm entre covas e 50cm entre linhas, semeadas 12 covas por fileira, sendo cada parcela representada por 4 fileiras.

Adubação e inoculação

Foi realizada adubação, calagem e inoculação da mesma forma descrita nos experimentos microparcelas.

Plantio e tratos culturais

O plantio foi realizado em 24 de maio de 1967, concomitantemente com o experimento em microparcelas, sendo colocadas 10 a 12 sementes por cova.

Foi feito unicamente um desbaste, deixando-se 5 plantas por cova, tendo as plantas se desenvolvido muito bem, vencendo a competição com as ervas daninhas.

Colheita

O experimento foi colhido no dia 28 de setembro de 1967, como descrito no experimento VI. Foram feitas as mesmas determinações realizadas nos experimentos em microparcelas.

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para estudar a competição entre as estirpes de *Rhizobium* do inoculante e as pré-existentes no solo, foram realizados experimentos com solo, em vasos e diretamente no campo, usando estirpes que produzem nódulos pretos para a identificação das estirpes do inoculante.

4.3.1. Experimento em vasos com solo

Experimento V

Foi realizado um experimento em vasos com solo, com a finalidade de estudar o grau de competição das estirpes ino-

culadas, com as nativas do solo.

Os resultados gerais deste experimento constam no quadro 19, sendo apresentadas as respectivas análises estatísticas nos quadros 20 a 24.

Os resultados apresentados no quadro 19 mostram a grande capacidade de competição das estirpes nativas, já demonstrada por Jenkins et al. (1954), Means et al. (1961) e outros pesquisadores. Cloonan (1966) e Cloonan e Vincent (1967), estudaram em experimentos de casa de vegetação e no campo, a resposta de labe labe à inoculação com a estirpe CB-756, recomendada na Austrália, para esta leguminosa e outras forrageiras tropicais promíscuas, verificando ser muito difícil o estabelecimento desta leguminosa e, mesmo sob condições favoráveis, não obtiveram nodulação proveniente do inoculante.

Observa-se o efeito das estirpes dos inoculantes em comparação com as preexistentes no solo, com relação a número e peso de nódulos. As estirpes nativas de maneira geral produziram maior número de nódulos, entretanto, dando peso de nódulos inferior aos tratamentos com inoculante, o que já foi constatado por Döbereiner e Coser (1970), sendo este efeito atribuído à maior eficácia das estirpes inoculadas, que tendem a formar nódulos maiores e mais rapidamente (Simpson e Gibson, 1970).

Mesmo nos casos em que as plantas dos tratamentos com estirpes pretas produziram baixa percentagem de nódulos com esta característica, apresentaram nitrogênio total e peso

QUADRO 19. Resultados gerais do experimento V (vasos com solo - médias de 4 repetições)

Espécie de planta	Tratamento	Nº normais (+)	Nódulos Nº pretos	Nº total	Peso seco total (mg)	Peso seco (g)	Nº	N total (mg)
Soja perene	testemunha	77	0	77	179	1,7	2,0	36
	preto (Do-371)	59	0	59	166	2,1	2,5	52
	normal (CB-756)	56	0	56	175	2,0	2,3	46
Iabe labe	testemunha	71	0	71	430	4,8	1,6	77
	preto (Do-37)	56	5	61	581	4,9	1,8	88
	normal (Do-4b)	60	0	60	501	4,9	2,2	108
Centrosema	testemunha	53	0	53	275	1,4	2,3	32
	preto (C-102)	38	13	51	384	1,4	2,4	34
	normal (C-100)	36	0	36	247	1,4	1,8	25
Kudzu	testemunha	22	0	22	260	0,7	2,5	18
	preto (Do-370)	26	3	29	373	1,0	2,3	23
	normal (K-28)	35	0	35	281	1,0	2,2	22
Calopogônio	testemunha	233	0	233	198	3,8	2,9	52
	preto (CM-7)	84	95	179	319	2,2	2,9	61
	normal (CM-2)	181	0	181	201	1,7	2,9	49

(+) Nódulos normais inclui também os nódulos ainda em formação nódulos jovens)

QUADRO 20. Números totais de nódulos/vaso

Fonte de variação	G.L.	F
Repetição	3	2,16
Leguminosas	4	117,12**
Inoculantes	2	3,30*
Leg. X Inoc.	8	1,36
Resíduo	42	
C.V. = 31,01%		

As diferenças entre as médias das leguminosas e inoculantes, pelo teste t de Student, ao nível de 1% e 5%, respectivamente, apresentaram os seguintes resultados:

leguminosas	médias	Inoculantes	médias
Calopogônio	197	Testemunha	528
Soja perene	64	preto	368
Labe labe	64	normal	343
Centrosema	47		
Kudzu	18	dms a 5% = 23	
	dms a 1% = 36		

QUADRO 2.1. Peso seco dos nódulos totais (mg/vaso)

Fonte de variação	G.L.	F
Repetição	3	1,96
Leguminosas	4	86,39**
Inoculantes	2	14,24**
Leg. X inoc.	8	1,80
Resíduo	42	
C.V. = 20,65%		

As diferenças entre as médias das leguminosas, inoculantes, pelo teste t de Student, ao nível de 1%, apresentaram os seguintes resultados:

Leguminosas	médias	Inoculantes	médias
Labe labe	504	Preta	321
Centrosema	302	normal	235
Calopogônio	239	testemunha	224
Kudzu	192	dms a 1% = 87	
Soja perene	173		
dms a 1% = 79			

QUADRO 22. Peso seco das plantas (g/vaso)

Fonte de variação	G.L.	F
Repetição	3	1,41
Leguminosas	4	169,52**
Inoculantes	2	1,11
Leg. X Inoc.	8	0,41
Resíduo	42	
C.V. = 18,55%		

As diferenças entre as médias das leguminosas pelo teste t de Student, ao nível de 1%, apresentaram os seguintes resultados:

Leguminosas	médias
Labe labe	4,95
Soja perene	1,95
Calopogônio	1,89
Centrosema	1,37
Kudzu	0,93

dms a 1% = 0,72

QUADRO 23. Teor de nitrogênio (Valores transformados em \sqrt{X})

Fonte de variação	G.L.	F
Repetição	3	1,93
Leguminosas	4	24,89**
Inoculantes	2	0,97
Leg. X Inoc.	8	3,85**
Resíduo	42	
C.V. = 5,75%		

As diferenças entre as médias das leguminosas e leguminosas X inoculantes pelo teste t de Student, ao nível de 1%, apresentaram os seguintes resultados:

Leguminosas	médias	Leguminosas X inoculantes	médias
Calopogônio	2,93	Calopogônio preta	2,95
Kudzu	2,31	Calopogônio testemunha	2,95
Sojaperene	2,29	Calopogônio normal	2,90
Centrosema	2,17	Sojaperene preta	2,49
Labe labe	1,89	Kudzu testemunha	2,46
		Centrosema preta	2,37
		Centrosema testemunha	2,32
		Sojaperene normal	2,29
		Kudzu preta	2,25
		Labe labo normal	2,25
		Kudzu normal	2,22
		Sojaperene testemunha	2,07
		Labe labe preta	1,85
		Centrosema normal	1,83
		Labe labe testemunha	1,57

dms a 1% = 0,50

QUADRO 24. Nitrogênio total das plantas (Valores transformados em \sqrt{X})

Fonte de variação	G.L.	F
Repetição	3	1,46
Leguminosas	4	68,79**
Inoculantes	2	3,43*
Leg. X Inoc.	8	1,90
Resíduo	42	
C.V. = 12,00%		

As diferenças entre as médias das leguminosas e inoculantes pelo teste t de Student, ao nível de 1% e 5%, respectivamente, apresentaram os seguintes resultados:

Leguminosas	médias	Inoculantes	médias
Labo labe	9,55	preto	7,00
Calopogônio	7,42	normal	6,77
Soja perene	6,62	testemunha	6,34
Centrosema	5,36		
Kudzu	4,58		

dms a 5% = 0,56

dms a 1% = 0,89

de nódulos superior ao tratamento sem inoculação, em todas as espécies. Döbereiner (1970) observando que as estirpes do inoculants produzem nódulos mais rapidamente e apresentam percentagem de número de nódulos menor que a do seu peso, considerou que as estirpes do inoculante mesmo produzindo poucos nódulos compensassem pelo maior tamanho dos nódulos. Por outro lado Ireland e Vincent (1968) consideraram que o peso dos nódulos apresentado pelo inoculante pode ser mais elevado devido ao baixo peso dos nódulos ainda em formação (nódulos novos), e que constituem a maioria dos nódulos dos tratamentos testemunha.

Calopogônio e centrosema foram as espécies que apresentaram melhor resposta a inoculação, nas condições experimentais usadas, formando respectivamente 50% e 25% dos nódulos pelas estirpes pretas. Trabalhando com centrosema, siratro e duas variedades de soja perene, Döbereiner (1969) e Franco e Döbereiner (1969) observaram que centrosema apresentou boa resposta à inoculação, tendo formado 68% dos nódulos pela estirpe proveniente do inoculante.

Kudzu e labe tiveram apenas cerca de 10% dos nódulos formados pelas estirpes do inoculante preto, enquanto soja perene formou nódulos muito pequenos e que não permitiam sua identificação.

Pelo exame dos quadros 20 a 24 verifica-se que houve diferença significativa entre as espécies, com relação a todas as determinações realizadas, tanto para nódulos como pa-

ra plantas.

Calopogônio apresentou-se como 3 espécie de mais fácil nodulação e com maior teor de nitrogênio nas plantas, provavelmente por haver formado maior percentagem de nódulos com as estirpes do inoculante. Labe labe superou todas as espécies empregadas, com relação ao peso seco e nitrogênio total das plantas, entretanto foi a leguminosa que apresentou menor percentagem de nitrogênio. Centrosema apesar de haver formado 25% dos nódulos pela estirpe do inoculante preto, não apresentou aumento do peso seco das plantas nem da percentagem de nitrogênio, com a inoculação.

Kudzu, soja perene e centrosoma apresentaram teor de nitrogênio relativamente equivalentes, sendo que a primeira foi a espécie que mostrou menor desenvolvimento das plantas.

Os resultados apresentados parecem indicar que para o sucesso da inoculação, em solos com características idênticas ao estudado, necessário se faz pesquisar o efeito dos fatores que interferem na sobrevivência e permanência de *Rhizobium* no solo, e incentivar estudos para melhorar o processo de inoculação, visando criar condições para a multiplicação da bactéria, principalmente na fase de início da simbiose.

4.3.2. Experimentos de campo

Os experimentos em microparcelas e parcelas usuais foram realizados com a finalidade de comprovar, em condições de campo, a utilização e eficiência do método dos nódulos pre-

tos na identificação das estirpes do inoculante quando em competição com as existentes no solo.

4.3.2.1. Experimentos microparcelas

Estes experimentos foram realizados em dois tipos de solos da área da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, com características diferentes e utilizando-se duas épocas de plantio.

Experimento VI

Os resultados obtidos neste experimento estão resumidos no quadro 25 e as respectivas análises da variância constam do quadro 26.

Analisando os dados do quadro 25 observa-se a grande variabilidade entre as espécies, o que está de conformidade com os resultados dos experimentos em casa de vegetação.

Neste experimento calopogônio não apresentou nódulos, como também labe labe e centrosema não promoveram boa nodulação, parecendo provável que a ocorrência de tal fato deveu-se à presença de nitrogênio mineral, que principalmente na forma de nitrato prejudica a nodulação (Broadbent e Nakashima e 1965; Weber, 1966). Resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho foram verificados por Carvalho et al. (1970) trabalhando com duas variedades de soja perene, em solos de cerrado com aplicação de nitrogênio mineral. Por outro lado, Franco e Döbereiner (1969), constataram que nem a formação de nódulos nem o desenvolvimento das leguminosas soja perene, centrosema, siratro e alfafa do nordeste, quando

QUADRO 25. Resultados do experimento VI (microparcelas) (dados por 10 plantas, médias de 4 repetições).

Leguminosas	Inoculante	Peso parte aérea+raiz (g)	Nº de nódulos normais pretos		Peso nódulos totais (mg)
Labe labe	normal (Do-37)	37	36	0	42
	preto (GB-756)	33	48	10	36
	testemunha	42	41	0	35
Centrosema	normal (C-100)	6	10	0	22
	preto (C-101)	7	9	0	73
	testemunha	6	5	0	16
Calopogônio	normal (CM-2)	6	0	0	0
	preto (CM-7)	8	0	0	0
	testemunha	9	0	0	0

QUADRO 26. Análise da variância do experimento VI (microparcelas) (Valores F)

Fonte de variação	G.L.	Peso da planta	F Nº nódulos to- tais (+)	Peso nódulos totais (+)
Repetição	3	1,61	0,90	2,60
Inoculante	2	0,40	1,91	8,29*
Resíduo (a)	6			
Leguminosa	2	689,74**	150,75**	77,12**
Leg. X Inoc.	4	0,29	0,57	6,53**
Resíduo (b)	18			
C.V. (a)		15,8%	8,6%	7,3%
C.V. (b)		43,3%	25,6%	26,7%

(+) Valores transformados em $\sqrt{X+1}$

** Significativo ao nível de 1%

inoculadas, foram afetados pela adição de nitrogênio.

Observa-se também que *centrosema* não produziu nódulos pretos e *labe labe* apresentou apenas 20% dos nódulos diagnosticados como provenientes das estirpes pretas, o que indica a grande concorrência das estirpes nativas na nodulação destas espécies, neste tipo de solo. Marshall (1956) argumentou que a promiscuidade da maioria das leguminosas tropicais pode ser considerada como uma vantagem devido a ocorrência comum de estirpes ineficazes mas com relativa capacidade competitiva, inclusive já estando, estas, adaptadas às condições do meio.

Resultados obtidos por Cloonan (1966) e Cloonan e Vincent (1967) trabalhando com *labe labe* inoculado com a estirpe CB-756 recomendada para esta espécie, na Austrália, salientaram as dificuldades de se obter inoculantes competitivos para as leguminosas tropicais.

A análise da variância deste experimento (quadro 26) mostra diferença significativa, entre espécies, para todas as determinações realizadas. Observa-se também maior peso de nódulos normais nos tratamentos inoculados com estirpes "pretas", fato também observado com *centrosema*, por Franco et al. (1970). Esta ocorrência nos leva a considerar que, sob condições de campo, o reconhecimento dos nódulos pretos parece incompleto, necessitando de estudos mais detalhados neste sentido.

Experimento VII

Os resultados deste experimento estão resumidos no quadro 27 e as respectivas análises estatísticas estão apresentadas no quadro 28.

No estudo do quadro 27 constata-se a variabilidade entre espécies também verificada no experimento VI, todavia, observa-se diferença também na nodulação, tendo labe labe e centrosema produzido maior número de nódulos.

Com referência à competição com as estirpes nativas verifica-se que para labe labe e centrosema apenas cerca de 10% dos nódulos formados foram produzidos pelas estirpes, "pretas", enquanto kudzu formou 20% de nódulos com esta característica.

Através do exame das análises estatísticas (quadro 28) observa-se que houve diferença significativa entre as espécies para todas as determinações realizadas, e nos tratamentos com inoculação e interação espécie X tratamento, para as determinações de número e peso de nódulos. Foi notante a diferença observada entre espécies, principalmente no caso de labe labe, que devido ao seu grande vigor vegetativo suplantou as demais leguminosas chegando mesmo a prejudicar o desenvolvimento destas.

Comparando os dados dos dois experimentos microparcels observa-se grande diferença na nodulação, provavelmente por influência do tipo de solo, resultados concordantes com os obtidos por Vincent (1962), Johnson e Means (1963) e

QUADRO 27. Resultados do experimento VII (microparcelas) - dados por 10 plantas, médias de 4 repetições.

Leguminosa	Inoculante	Peso parte aérea+raiz (g)	Nº nódulos normais pretos	Peso nódulos totais (mg)
Labe labe	normal (Do-4b)	168	86	0
	preto (CB-756)	160	47	4
	testemunha	160	53	0
Centrosema	normal (C-100)	16	57	0
	preto (C-101)	22	76	12
	testemunha	17	76	0
Kudzu normal	(K-28)	9	37	0
	preto (Do-37)	10	44	10
	testemunha	6	22	0

QUADRO 28. Análise da variância do experimento VII (microparcelas) (Valores F)

Fonte de variação	G.L.	Peso parte aérea+raiz (g)	Nº nódulos totais (+)	Peso nódulos totais (mg) (+)
Repetição	3	1,99	1,22	0,86
Inoculante	2	0,03	8,42**	23,52**
Resíduo (a)	6			
Leguminosa	2	204,53*	12,82**	99,42**
Leg. X Inoc.	4	0,14	9,92**	3,65*
Resíduo (b)	18			
C.V. (a)		8,9%	8,4%	3,3%
C.V. (b)		32,5%	25,3%	16,1%

(+) Valores transformados em $\sqrt{X + 1}$

** Significativo ao nível de 1%

* Significativo ao nível de 5%

Damirgi et al. (1967) que evidenciaram a ocorrência de determinadas estirpes condicionadas a tipos de solos. Outros pesquisadores como McLeod (1962), Caldwell (1969) e Simpson e Gibson (1970), verificaram que a resposta à inoculação varia com a espécie de desenvolvimento das leguminosas soja perene, centrosema, siratro e alfafa do nordeste, quando inoculadas, foram afetados pela adição de nitrogênio.

Observa-se também que centrosema não produziu nódulos pretos e labe labe apresentou apenas 20% dos nódulos diagnosticados como provenientes das estirpes pretas, o que indica a grande concorrência das estirpes nativas na nodulação destas espécies, neste tipo de solo. Marshall (1956) argumentou que a promiscuidade da maioria das leguminosas tropicais pode ser considerada como uma desvantagem devido a ocorrência comum de estirpes ineficazes mas com relativa capacidade competitiva, inclusive já estando, estas, adaptadas às condições do meio.

Resultados obtidos por Cloonan (1966) e Cloonan e Vincent (1967) trabalhando com labe labe inoculado com a estirpe CB-756 recomendada para esta espécie, na Austrália, salientaram as dificuldades de se obter inoculantes competitivos para as leguminosas tropicais.

A análise da variância deste experimento (quadro 26) mostra diferença significativa, entre espécies, para todas as determinações realizadas. Observa-se também maior peso de nódulos normais nos tratamentos inoculados com estirpes "pretas" fato também observado com centrosema, por Franco et al. (1970).

Esta ocorrência nos leva a considerar que, sob condições de campo, o reconhecimento dos nódulos pretos parece incompleto, necessitando de estudos mais detalhados neste sentido.

Neste experimento observou-se que os aspectos nodulação e competição entre estirpes guardaram certa relação com os obtidos no experimento em vasos com o mesmo tipo de solo, mesmo realizados em épocas diferentes, tendo as estirpes, "protas" mostrado maior eficácia, e as estirpes nativas apresentado grande grau de competição com as estirpes do inoculante.

Verifica-se que, de uma maneira geral, os tratamentos com as estirpes, "pretas" produziram maior peso de nódulos do que as testemunhas, não tendo esta influência repercutido no peso seco das plantas.

4.3.2.2. Experimento em parcelas usuais

Experimento VIII

O experimento de campo em parcelas usuais foi realizado com centrosema como planta teste, utilizando o mesmo tipo de solo, tratamentos com inoculação e época de plantio do primeiro experimento em microparcelas, com a finalidade de comparar os dois esquemas experimentais, principalmente com referência à nodulação.

Os resultados obtidos estão resumidos no quadro 29, e as respectivas análises estatísticas apresentadas no quadro 30.

QUADRO 29. Resultados do experimento VIII (dados por 10 plantas - médias de 4 repetições)

Inoculante	Peso seco da planta	Número de nódulos normais pretos		Peso de nódulos totais (mg)
Normal (C-100)	46	10	0	71
Preto (C-101)	35	12	0	51
Testemunha	31	16	0	69

QUADRO 30. Análise da variância do experimento VIII - parcelas usuais. (Valores F).

Fonte de variação	G.L.	F		
		Peso planta	Nº nódulos (+)	Peso nódulos (+)
Repetição	3	1,28	1,60	1,97
Inoculante	2	1,16	0,47	1,31
Resíduo	6			
C.V.		27%	37%	31%

(+) Valores transformados em \sqrt{X}

4.4. CONCLUSÕES

(1) Nos experimentos com solo, em casa de vegetação e no campo, em nenhum dos casos a testemunha apresentou nódulos pretos, indicando que é excassa a ocorrência destas estirpes no solo, não se constituindo, portanto, um problema para a identificação dos nódulos formados pelo inoculante.

(2) Nos resultados obtidos constata-se que as estirpes pretas mesmo quando formam menor número de nódulos apresentam maior percentagem em peso, e todas as espécies mostraram maior peso de nódulos e nitrogênio total das plantas quando inoculadas com suas estirpes pretas.

(3) Nos solos usados centrosema mesmo sendo mais específica formou no máximo 25% de nódulos pretos, enquanto calopogônio chegou a ter 50% dos nódulos produzidos pelo inoculante.

(4) A capacidade de competição relativa das estirpes pretas foi diferente nos dois tipos de solo usados. Na série Silvicultura apenas labe labe apresentou 20% dos nódulos totais como produzidos pela estirpe preta, enquanto centrosema não formou nódulos deste tipo e calopogônio não nodulou, parecendo que algum fator prejudicou a nodulação neste experimento. Por outro lado o solo da série Itaguaí apresentou boa nodulação natural, mas os nódulos formados pelas estirpes do inoculante foram respectivamente 10% para labe labe, 14% para centrosema e 25% para kudzu.

(5) Os resultados obtidos nos experimentos em microparcelas e em parcelas usuais, usando o mesmo tipo de solo foram concordantes, tendo ambos apresentado nodulação deficiente com ausência de nódulos pretos em centrosema.

(6) Os experimentos em vasos com solo e em microparcelas em que se usou o mesmo tipo de solo, mesmo realizados em épocas diferentes foram concludentes quanto a nodulação.

(7) Ficou evidenciado que em ensaios com vasos o método dos nódulos pretos poderá se constituir um instrumento de destaque na solução de problemas que envolvem competição entre estirpes, entretanto existem dúvidas quanto ao emprego do método em estudos diretamente nas condições de campo.

5. SUMÁRIO

Foram realizados quatro experimentos em casa de vegetação em vasos de Leonard, com cinco leguminosas forrageiras (*Glycine wightii* Cv, *Dolichos lab lab* L., *Centrosema pubescens* Benth., *Pueraria javanica* Benth. e *Calopogonio mucunoides* Desv.), inoculadas com estirpes, formando nódulos pretos e normais com a finalidade de observar a inoculação cruzada em todas as combinações possíveis e também a possibilidade do emprego das estirpes "pretas" na identificação de estirpes de *Rhizobium*.

Em seguida foram realizados um experimento em vasos com solo e 3 diretamente no campo, sendo dois em microparcelas, usando dois tipos de solos diferentes e um utilizando parcelas de tamanho usual. Estes experimentos tiveram a finalidade de verificar a competição das estirpes do inoculante com as nativas do solo, através do emprego das estirpes que produzem nódulos pretos.

A inoculação cruzada apresentou resposta diferente de acordo com a espécie, tendo *C. pubescens* mostrado alto grau de especificidade hospedeira, seguida de *P. javanica* que também apresentou certa especificidade, enquanto as demais foram

mais promíscuas, formando nódulos com todas as estirpes usadas.

As estirpes também apresentaram diferença, sendo as originárias de *C. pubescens*, em geral, mais eficazes e menos específicas, nodulando todos os hospedeiros satisfatoriamente. As estirpes pretas CM-7, Do-37 e C-102 evidenciaram-se como altamente eficazes na fixação do nitrogênio.

D. lab lab e *C. mucunoides* formaram nódulos pretos com todas as estirpes pretas usadas, *C. pubescens* e *P. javanica* apresentaram nódulos pretos com C-102 e CM-7, e *G. winhtii* produziu nódulos com esta característica com Do-37 e CM-7, apenas no primeiro experimento.

Foi discutida a possibilidade do emprego das estirpes que formam nódulos pretos na identificação de *Rhizobium* inoculado quando em competição com estirpes nativas.

Parece provável que a resposta à inoculação está mais diretamente influenciada pelo tipo de solo do que pelas diferentes épocas do plantio.

6. BIBLIOGRAFIA

ABEL, G.H., ERDMAN, L.W. Response of Loe soybean to different strains of *Rhizobium japonicum*. Agron. J., 56: 423-424, 1964.

ALLEN, O.N., ALLEN, E.K. Root nodule bacteria of some tropical leguminous plants: I cross inoculation studies with *Vigna sinensis*. Soil Sci., 42:61, 1936.

ALLEN, O.N., ALLEN, E.K. Root nodule bacteria of some leguminous plants: II cross inoculation tests within the cowpea group. Soil Sci., 47:63-76, 1939.

ALLEN, O.N., ALLEN, E.K. A survey of nodulation among leguminous plants. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 12:203-208, 1947.

ALLEN, O.N., BALDWIN, I.L. Rhizobia legume relationships. Soil Sci., 18:415-427, 1954.

BAIRD, K.J. Clover root nodule bacteria in the new england region of new south wales. Aust. J. Agric. Res., 56:15-26, 1955.

- BOGDAN, A.V. *Glycine javanica* under experimental cultivation in kenia. Trop. Agric., 43(2):99-105, 1965.
- BOHLOOL, B.B., SCHMIDT, E.L. Immunofluorescent staining for study of *Rhizobium*. Univ. Minnesots. 1967.
- BOHLOOL, B.B., GRAY, T.R.G., SCHMIDT, E.L. Immunofluorescent observations on *Rhizobium japonicum* in soil and nodules. Bact.Proc. n° 4. 1968.
- BOHLOOL, B.B., SCHMIDT, E.L. Nonspecific staining: its control in immunofluorescent examination of soil. Science, 162:1012-1014, 1968.
- BOWEN, G.D. Field studies on nodulation and growth of *Centrosema pubescens* Benth. Queensl. J. Agric. Sci., 16: 253-266, 1959a.
- BOWEN, G.D. Specificity and nitrogen fixation in the *Rhizobium* symbiosis of *centrosema pubescens* Benth. Queensl. J. Agric. Sci., 16:267-282, 1959b.
- BOWEN, G.D., KENNEDY, M.M. Heritable variation in nodulation of *Centrosema pubescens* Benth. Queensl. J. Agric. Sci., 18: 161-170, 1961.

- BROADMENT, F.E., NAKASHIMA, T. Plant recovery of immobilized nitrogen in greenhouse experiments. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 29(1):55-60, 1965.
- BROADMENT, F.E., TYLER, K.B. Laboratory and greenhouse investigations of nitrogen immobilization. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 26(5):459-462, 1962.
- BRUCE, R.L. Effect of centrosema pubescens Benth. on soil fertility in the humid tropics. Queens. J. Agric. Sci., 22:221-225, 1965.
- BURTON, J.C. Host specificity among certain plants in the cowpea cross inoculation group. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 16:356-358, 1952.
- BUSHNELL, C.A., SARLES, W.B. Studies on the root nodule bacteria of wild leguminous plants in wisconsin. Soil Sci., 44:409-423, 1937.
- BUSHNELL, C.A., SARLES, W.B. Investigation upon the antigenic relationships among the root nodule bacteria of the soybean cowpea and lupine cross inoculation groups. J. Bacteriol., 38:401-410, 1939.
- CADWELL, B.E. Initial competition of root nodule bacteria on soybean in a field environment. Agron. J., 61:813-815, 1969.

- CALDWELL, B.E., GRANT, V. Nodulation interaction between soybean genotypes and serogroups of *Rhizobium japonicum*. Crop Science, 8:680-682, 1968.
- CAIDWELL, B.E., HARTWIG, E.E. Serological distribution of soybean root nodule bacteria. Agron. J., 62(5):621-622, 1970.
- CALDWELL, E.B., WEBER, D.P. Distribution of *Rhizobium japonicum* serogroups in soybean nodule as affected by planting dates. Agron. J., 62:12-14, 1970.
- CAMPÊLO, A.B., CAMPÊLO, C.R. Eficiência da inoculação cruzada entre espécie da sub-família mimosoideae. Bol. Tec. Inst. Pesq. Exp. Agrop. Centro Sul, N° 93, 1970.
- CARVALHO, M.M., FRANÇA, A.F.C. & MOZZER, O.L. Ensaio exploratório de fertilização de seis leguminosas tropicais em um latosol vermelho escuro, fase cerrado. V Reun. Lat. Am. Rhizobium. Julho 1970.
- CATANI, R.A., GARGANTINI, H., GALLO, J.R. A fixação do nitrogênio do ar pelas bactérias que vivem associadas com as leguminosas crotalaria e mucuna. Bragantia, 14(1):1-8, 1954.
- CATANI, R.A., MONTOJO, J.C., GARGANTINI, H. Fixação do nitrogênio do ar pelas bactérias que vivem em simbiose com as raízes de centrosema. Bragantia, 22 (58):731-739, 1963.

- CLARCK, F.E. Midseason leaf discoloration in soybean. Soybean Digest, 17:8-9, 1957a.
- CLARCK, F.E. Nodulation responses of two near inorganic lines of the soybean. Can. J. Microbiol., 3:113-123, 1957b.
- CLOONAN, M.J. Black nodules on dolichos. Aust. J. Sci., 26(4): 121, 1963.
- CLOONAN, M.J. The root nodule bacteria as factors in the establishment of tropical legumes. Jour. Aust. Inst. Agric. sci., 32:284, 1966.
- CLOONAN, M.J., VINCENT, J.M. The nodulation of annual summer legumes sown on the far coast of new south wales, Aust. Jour. Expl. Agric. Anim. Husb., 7(25):181-189, 1967.
- DAMIKGI, S.M., FREDERICK, L.R., ANDERSON, I.C. Serogroups of *Rhizobium japonicum* in soybean nodules as affected by soil types. Agron. Jour., 59(1):10-12, 1967.
- DATE, R.A. Root nodule bacterin and legume relationships: studies on serological classification, competitive effects and survival and location in pre-inoculated seed. Ph.D. Thesis Univ. Maryland College Park, Maryland. 1962.
- DATE, R.A., DECKER, A.M. Minimal antigenic constitution of twenty eight strains of *Rhizobium japonicum*. Can. Jour. Microbiol., 12:1-8, 1965.

ERDMAN, L.W., JOHNSON, H.W., CLARCK, F.E. Varieta responses of soybean to a bacterial induced chlorosis. Agron. Jour., 49(5):267-271, 1957.

ERDMAN, L.W., JOHNSON, H.W., CLARCK, F.E. A bacterial induced chlorosis in the lee soybean. Plant Disease Report, 40(7): 646, 1956.

FERRARI, E., SOUTO, S.M., DÖBEREINER, J. Efeito da temperatura do solo na nodulação e desenvolvimento da soja perene (*G. javanica*). Pesq. Agrop. Bras., 2:461-466, 1967.

FRANCO, A., DÖBEREINER, J. Eficácia da nodulação natural de cinco leguminosas forrageiras tropicais. XI Cong. Bras. Cienc. Solo, Curitiba, 1969.

FRANCO, A.A., MARANHÃO, J.I.M., DÖBEREINER, J. Influência do revestimento das sementes no estabelecimento da nodulação de *centrosema pubescens* Benth. em solo ácido com toxides de manganês. V. Reun. Lat. Americana de Rhizobium. Km 47, 1970.

FRED, E.B., WAKSMAN, S. Laboratory manual of general microbiology. McGraw Hill Book Company Inc., New York and London. 1928.

FRED, E.B., BALDWIN, I.L., McCOY, E. Root nodule bacteria and leguminous plants. Univ. Wisconsin, Stud. Sci., 5:343p, 1932.

- FREITAS, L.M.M. Adubação de leguminosas tropicais. V Reunião Latino Americana de Rhizobium. (Rio de Janeiro-Brasil). 1970.
- GAUI, F. Inoculação cruzada com bactérias dos nódulos de leguminosas tropicais. Rev. Agric. (Piracicaba), 33:139-150, 1958.
- GARGANTINI, H., CATANI, R.A. Fixação do nitrogênio do ar atmosférico pelas bactérias que vivem associadas às raízes da soja, Bragantia, 17(14):195-204, 1958.
- GARGANTINI, H., WUTKE, A.C.P. Fixação do nitrogênio do ar atmosférico pelas bactérias que vivem associadas às raízes do feijão de porco e de feijão baiano. Bragantia, 19(40): 639-652. 1960.
- GRAHAM, P.H. Antigenic affinities of the root nodule bacteria of legumes. Leewenhoeck Jour. Microbiol., 29:281-291, 1963.
- GUZMAN, I., DÖBEREINER, J. Effectiveness and efficiency in the symbiosis of four cross-inoculated tropical legumes. Rev. Lat. Amer. Microbiol. Parasitol., 11:137-140, 1969.
- HABISH, H.A., KHAIRI, S.M. Nodulation on legumes in the sudan. Cross inoculation groups and the associated *Rhizobium* strains. Expl. Agric., 4-227-234, 1968.
- HARTWIG, E.E. Reinoculation of soybeans. Mississippi Far. Res., 27:(4)1-3, 1964.

- HAUKE, Pacewiczowa. Szczepinki dia galega officinalis. Acta Microbiol. Polonica., 1:36-38, 1952. (Citado por Nutman, 1956).
- HELY, F.W., BONNIER, C., MANIL, P. Effect of grafting on nodulation of *Trifolium ambiguum*. Nature (lond), 171:884, 1953.
- INFORZATO, R., MACARENHAS, H.A.A. Sistema radicular de dolichas lab lab em um solo massapê-salmourão. Bragantia. 26(16):213-218, 1967.
- IRELAND, J.A., VINCENT, J.M. A quantitative study of competition for nodule formation, 9th. Int. Cong. Soil Trans., 2(9):85-93, 1968.
- JENKINS, H.V., VINCENT, J.M., WATERS, L.M. The root nodule bacteria as factors in clover establishment in the red basaltic soils of the lismore district, new south wales. III Field inoculation triais. Aust. Jour. Agric. Res., 5(1): 77-89, 1954.
- JENSEN, H.L. Mutual host plant relationships in two groups of legumes root nodule bacteria. Archiv. fur Microbiol., 59: 174-179, 1967.
- JOHNSON, H.W., ALLEN, O.N. Nodulation studies with special reference to strains isolated from sesbania species. Leewenhoeck, 18:12-22, 1952.

- JOHNSON, H.W., CLARCK, F.E. Role of the root nodule in the bacterial induced chlorosis of soybeans. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 22:527-528, 1959.
- JOHNSON, H.W., MEANS, U.M. Interaction between genotypes of soybean and genotypes of nodulating bacteria. Agron. Jour., 52(11):651-654, 1960.
- JOHNSON, H.W., MEANS, U.M. Sorological groups of *Rhizobium japonicum* recovered from nodules of soybeans (*G. max*) in field soils. Agron. Jour., 55:269-271, 1963.
- JOHNSON, H.W., MEANS, U.M. Selection of competitive strains of soybean nodulating bacteria. Agron. Jour., 56:60-62, 1964.
- JOHNSON, H.W., MEANS, U.M. Selection of competitive strains of soybean nodulating bacteria. Agron. Jour., 56:60-62, 1964.
- JOHNSON, H.W., MEANS, U.M., CLARCK, F.E. Factors affecting the expression of bacterial induced chlorosis of soybeans. Agron. Jour., 50(10):571-574, 1958.
- JOHNSON, H.W., MEANS, U.M., CLARCK, F.E. Responses of seedlings to extracts of soybeans nodules bearing selected strains of *Rhizobium japonicum*. Nature (Lond.), 183:308-309, 1959.

- JOHNSON, H.W., MEANS, U.M. Competition for nodule sites between strains of *Rhizobium japonicum* applied as inoculum and strains in the soil, Agron. Jour., 57(2):179-184, 1965.
- JONES, M.B., QUAGLIATO, J. Respostas de algumas leguminosas tropicais e alfafa a vários níveis de enxofre. Pesq. Agrope. Brasileira. 1970.
- KLECZKOWSKA, J., NUTMAN, P.S., BOND, G. Note on the ability of certain strains of rhizobia from peas and clover to infect each other's host plants. Jour. Bacteriol., 48:673-675, 1944.
- KLECZKOWSKA, J., THORNTON, H.G. A serological study of root nodule bacteria from pea and clover inoculation groups. Jour. Bacteriol., 48: 661-672, 1944.
- KLEINSCHMIDT, F.H. The influence of nitrogen and water on pasture of green grass, lucerne and glycine at lawes, new south wales. Queensl. Jour. Expl. Agric. Anim. Husb., 7(28): 441-446, 1967.
- KOONTZ, F.P., FABER, J.E. Somatic antigens of *Rhizobium japonicum*. Soil Sci., 51:288-232, 1961.
- LEITE, O.C. Composição química das forrageiras brasileiras. Bol. do Inst. Qui. Agri., nº 57, 1959.

- LEONARD, L.T. Method of testing legume bacteria cultures and results of tests of commercial inoculants. Circ. 703 U.S. Dep. Agri., 1944.
- McLEOD, R.W. Natural nodulation of tropical legumes in new south wales. Agric. Gaz. South wales, 73(8)419-421, 1962.
- MARSHALL, K.C. Competition between strains of *Rhizobium trifolii* in peat and broth culture. Jour. Aust. tist. Agric. Sci., 22:137-140, 1956.
- MASEFIELD, G.E. Effect of irrigation of some leguminous crops. Emp. Jour. Exp. Agric., 29:51-59, 1961.
- MASEFIELD, G.E. Seasonal effects on the root nodulation of legumes. Expl. Agric., 4:335-338, 1968.
- MEANS, U.M., JOHNSON, H.W., DATE, R.A. Quick serological method of classification of strains of *Rhizobium japonicum* in nodules. Jour. Bacteriol., 87(3):547-553, 1964.
- MEANS, U.M., ERDMAN, L.W. Longevity and efficiency of rhizobial culture. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 37(3):305-308, 1963.
- MEANS, U.M., JOHNSON, H.W., ERDMAN, L.W. Competition between bacterial strains effecting nodulation in soybeans. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 25:105-108, 1961.

- MENDES, W. et al. Contribuição ao mapeamento em séries dos solos do município de Itaguaí. Bol. Inst. Ecol. Exp. Agri., n° 12, 1954.
- MILFORD, R. Nutritive values and chemical composition of seven tropical legumes and lucerne grown in sub tropical south eastern queensland. Aust. Jour. Exp. Agric. Anim. Husb., 7(29):540-545, 1967.
- MING TIEN, L. Problem of the formation of root nodules and their effectiveness in beans (*Phaseolus aureus*) infected with root nodule bacteria in different cross inoculation groups. Acta Microbiol. Sinica., 9(2):193-196, 1963.
- MOORE, A.W. The influence of a legume on soil fertility under a grazed tropical pasture. Emp. Jour. Agri., 30:239-348, 1962.
- MOORE, A.W. Symbiotic nitrogen fixation in a grazed tropical grass legume pasture. Nature, 185(4713):638, 1960.
- NEME, N.A. Soja perene. Rur. Rev. Soc. Rur. Bras., 493:12, 1962.
- NICOL, H., THORNTON, R.G. Competition between related strains of nodule bacteria and its influence of the legume host. Proc. Roy. Soc. B., 130:52-59, 1941.
- NORRIS, O.D. Legumes and the *Rhizobium* symbiosis, Emp. Jour. Expl. Agric., 24(96):247-270, 1956.

- NORRIS, O.D. Line in relation to the nodulation of tropical legumes. In Hellsworth, E.G. (ed.). Nutrition of the legumes. London, p. 164-182, 1958.
- NORRIS, O.D. Some concepts and methods in sub tropical Pasture Research. Commonwealth Bureaux of Pastures and Filds Crops, Bull., 47, 1964.
- NORRIS, O.D. The intelligent use of inoculants and lime pelleting for tropical legumes. Trop.Grasslands, 1(2): 107-121, 1967.
- NUTMAN, P.S. The influence of the legume in root nodule symbiosis. Biol. Rev., 31:109-151, 1956.
- OKE, O.L. Nitrogen fixing capacity of mucuna utilis. Expl. Agric., 2:15-16, 1966.
- OKE, O.L. Nitrogen fixing capacity of some nigerian legumes. Expl. Agric., 3:315-321, 1967a.
- OKE, O.L. Nitrogen fixing capacity of calopogonium and pueraria. Trop. Sci., 9(2):90-93, 1967b.
- OKE, O.L. Nitrogen fixing capacity of guar bean. Trop. Sci., 9(3):144-147, 1967c.
- PARKER, D.T., ALLEN, O.N. The nodulation status of *Trifolium ambiguum*. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 16:350-353, 1952.

- PARKER, D.T., ALLEN, O.N., AHLGREEN, H.L. Legume bacteria only the right kind do the job. *Crops Soils*, 1(7):10-11, 1949.
- PATE, J.C., DART, P.J. Nodulation studies in legumes. *Plant and Soil*, 15:329-346, 1961.
- PROCTOR, M. Cross inoculation group relationships of *gallega officinalis*. *New Zeal. Jour. Bot.*, 1(4):419-425, 1963.
- PURCHASE, B.F., NUTMAN, P.S. Studies on the physiology of nodule formation. VI. The influence of bacterial number in the rhizosphere on nodule initiation. *Ann. Bot. Lond. N.S.*, 21:439-454, 1957.
- PURCHASE, B.F., VINCENT, J.M. A detailed study of the field distribution of strains of clover nodule bacteria. *Proc. Linn. Soc. New South Wales*, 74:227-236, 1949.
- PURCHASE, B.F., VINCENT, J.M., WARD, L.M. Serological studies of the root nodule bacteria. *Proc. Linn. Soc. New South Wales*, 76:1-6, 1951.
- RAJAGOPALAN, N. Some aspects of root nodulation in tropical legumes. *Current Science*, 5(7): 1-6, 1964.
- RAMOS, D.P. Levantamento detalhado de solos da área da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro com base em fotografia aérea e prospecções do terreno. Tese (Univ. Fed. Rur. Rio de Jan.), 1970.

- READ, M.P. The establishment of serologically identifiable strains of *Rhizobium trifolii* in field soil in competition with the native microflora. Jour. Gen. Microbiol., 9:1-14, 1953.
- REID, J.J. The infective ability of rhizobia of the soybean cowpea and lupin cross inoculation groups. Ph.D. Thesis. Univ. Wisconsin, 1936.
- RIVEROS, R.G. Comportamiento del pasto pangola (*Digitaria decumbens*) on mescla con leguminosas. Acta Agron., 10(1): 101-109, 1960.
- ROBINSON, A.C. Competition between effective and ineffective strains of *Rhizobium trifolii* in the nodulation of *Trifolium subterraneum*. Aust. Jour. Agric. Res., 20:837-842, 1969.
- SALETTE, J.E. Quelques aspects actuelles de l'agronomie des plants fourragères tropicales. Jour. Agric. Trop. Bot. Appl., 14(5):159-179, 1967.
- SCHAAFFHANSEN, R.V. Economical methods for using the legume dolichos lab lab for soil improvement food and feed. Turrialba, 13(3):171-172, 1963.
- SCHAAFFHANSEN, R.V. Perennial soybean (*Glycine javanica*). Turrialba, 15(2):144, 1965.

- SCHMIDT, E.L., BANKOLE, R.O., BOHLOOL, E.B. Fluorescent antibody approach to study of rhizobia in soil. Jour. Bacteriol., 95: 1987-1992, 1968.
- SEARS, G.H., CONELL, W.R. Cross inoculation with cowpea and soybean nodule bacteria. Soil Sci., 24:413-419, 1927.
- SEARS, O.H., CLARCK, F.M. New reciprocal interchangeability of the wood's clover and garden bean nodule bacteria. Jour. Bacteriol., 17:20, 1929.
- SIMPSON, J.R., GIBSON, A.H. A comparison of the effectiveness of two strains of *Rhizobium trifolii* with trifolium subterraneum in agar and three soils. Soil Biol. Biochem., 2:295-305, 1970.
- SINGH, R.D., CHATTRJEE, B.N. Growth analysis of perennial grasses in tropical india. II herbage growth in mixed grass-legume swards. Expl. Agric., 4:127-134, 1968.
- SKRDLETA, V. Somatic sero-groups of *Rhizobium japonicum*. Plant and Soil, 23(1):43-48, 1965.
- SKRDLETA, V. Competition for nodule sites between two inoculum strains of *Rhizobium japonicum* as effected by delayed inoculation. Soil Biol, Biochem., 2:167-171, 1970.

- SOUTO, S.M., DÖBEREINER, J. Fixação do nitrogênio e estabelecimento de cluas variedades de soja perene (*G.javanica* L.), com três níveis de fósforo e de cálcio, em solos com toxidês de manganês. IV Reunião Latino Americana sobre inoculantes para leguminosas, Porto Alegre, 1968a.
- SOUTO, S.M., DÖBEREINER, J. Toxidês de manganês em leguminosas forrageiras tropicais. IV Reunião Latino Americana sobre inoculantes para leguminosas, Porto Alegre. 1968b.
- SOUTO, S.M. DÖBEREINER, J. Problems in the establishment of perennial soybean (*Glycine javanica*) in a tropical region. XI Intern. Grassland Cong. Adelaide. Australia. 1970.
- SOUTO, S.M., COSER, A.C., DÖBEREINER, J. Especificidade de uma variedade nativa de *stylozanthus gracilis* H.B.K. na simbiose com *Rhizobium* sp. V Reunião Latino Americana de *Rhizobium*. Km 47. 1970.
- STAMFORD, P.N., CAMPÊLO, A.B., DÖBEREINER, J. Nódulos pretos eficientes e ineficientes e sua inoculação cruzada em várias leguminosas. IV Reunião Latino Americana Inoculantes Leguminosas. Porto Alegre, R.S. 1968.
- THORNTON, H.G., KLECZKOWSKI, J. Use of antisera to identify nodules produced by the inoculation of legumes in the field. *Nature (Lond.)*, 166:1118-1119, 1950.

- VINCENT, J.M. Serological studies of the root nodule bacteria.
I strains of *Rhizobium meliloti*. Proc. Linn. Soc. New South
Wales. 66:145-154, 1941.
- VINCENT, J.M. Serological studies of the root nodule bacteria.
II strains of *Rhizobium trifolii*. Proc. Linn. New South
wales, 67:82-86, 1942.
- VINCENT, J.M. Australian studies of the root nodule bacteria.
A review Proc. Linn. New South Wales., LXXXVII, Part 1,
1962.
- VITJCENT, J.M. A manual for the practical study of root
nodule bacteria. Inst. Biol. Prog. Ed. Blackwell Scientific
publications. Oxford. N° 15. 1970.
- VINCENT, J.M., WATERS, L.M. The influence of the rost on
competition amongst clover root nodule bacteria. Jour. Gen.
Microbiol., 9:357-370, 1953.
- VINCENT, J.M., WATERS, L.M. The root nodule bacteria as
factors in clover establishment in the red basaltic soils
of the lismore district new south wales. II Survival and
sucess of inocula in laboratory trials. Aust. Jour. Agric.
Res., 5:61-76, 1954.
- WALKER, R.H., BROWN, P.E. The nomenclature of the cowpea
group of root nodule bacteria. Soil Sci., 39:221-225, 1955.

WATERS, L. M. modulation tests with mixed inoculates, Jour. Aust. Inst. Agric. Sci., 22:141-142, 1956.

WATSON, G.A. Nitrogen fixation by centrosema. Jour. Rubber Research Institute Malaya, 15:168-174, 1957.

WEBER, C,R. Nodulating and nonnodulating soybaan isolinos. II, Response to applied nitrogen and nodified soil conditions. Agron. J., 58:45-49, 1966.

WILLIAMS, W.A, The role of the leguminosae in pasture and improvement in the neotropics, Trop. Agric., 44(2):103-115, 1967.

WILSON, J.K. Over hundred reasons for abandoning the cross inoculation groups of the legumes. Soil Sci., 58:61-67, 1944.

WILSON, J. K. Leguminous plants and their associated leguines. Cornell University Ithaca. New York. 1939.

WRIGHT, W. The nodule bacteria of soybean: I bacteriology of strains. Soil Sci., 20:95-129, 1925.