

Competição de estirpes de Rhizobium sp. resistentes
à estreptomicina com as nativas do solo na nodulação e
desenvolvimento de Stylosanthes guyanensis; Aubl. Swartz e
avaliação da fixação de N₂ pela redução de C₂H₂

TESE

apresentada à
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
para o grau de Magister Scientiae

Orientadores:

Johanna Döbereiner

Adam Drozdowicz

Walter Augusto Gross Braun

SEBASTIÃO MANHÃES SOUTO
Fevereiro de 1976

À minha família

e

aos professores

J. Döbereiner

A. A. Franco

minha homenagem

AGRADECIMENTOS

Externamos nossos agradecimentos a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho, principalmente as seguintes pessoas:

- Pesquisadores Dra. JOHANNA DÖBEREINER e Dr. AVÍLIO ANTÔNIO FRANCO, pelas orientações.

- Prof. OSWALDO DUARTE GONÇALVES, pela revisão do manuscrito.

- Auxiliar Administrativo PORSINA TEIXEIRA, pela confecção da tese.

- Funcionários do Setor de Solos da UEPAE/Itaguaí.

- Funcionários do Setor de Agrostologia da UEPAE/Itaguaí.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Natural do Estado do Rio de Janeiro, Engenheiro Agrônomo diplomado pela Escola Nacional de Agronomia em outubro de 1964.

No período de 1965-1967 realizou trabalho de pesquisa em agrostologia no convênio USAID x IRI.

No período de 1967-1969 desenvolveu pesquisas em agrostologia e em microbiologia do solo, como bolsista do CNPq, sob orientação da Dra. DOBEREINER.

De 1970-1971, fez pesquisas em agrostologia, como bolsista pesquisador do CNPq.

Atualmente é pesquisador da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Metodologia para avaliação da atividade da N ₂ -ase, pela redução do C ₂ H ₂	3
2.1.1. Deficiência de umidade	3
2.1.2. Excesso de umidade	5
2.1.3. Tipos de amostras	7
2.2. Identificação das estirpes	7
2.3. Resistência das estirpes de <u>Rhizobium</u> sp. à estreptomicina	9
2.4. Competição entre estirpes de <u>Rhizobium</u> sp.	12
2.5. Problemas relacionados com a simbiose do <u>S. guyanensis</u> Aubl. Swartz	15

3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1. Metodologia para avaliação da atividade da N ₂ -ase, pela redução do C ₂ H ₂	18
3.1.1. Influência da lavagem de raízes com nódulos na atividade da N ₂ -ase	18
3.1.2. Efeito da lavagem de raízes com nódulos e da planta inteira u atividade da N ₂ -ase	20
3.1.3. Diferenças entre plantas inteiras e raízes sem a parte na atividade da N ₂ -ase de duas cultivares de <u>S. guyanensis</u>	22
3.1.4. Efeito da lavagem da planta inteira e da raiz com nódulos na atividade da N ₂ -ase comparado com o sistema intacto	23
3.2. Seleção e testes com estirpes mutantes de <u>Rhizobium</u> para resistência à estreptomicina	24
3.2.1. Resistência das estirpes de <u>Rhizobium</u> à estreptomicina	24
3.2.2. Verificação da uniformidade das mutantes BR-11r e BR-23r quanto a resistência à estreptomicina	26
3.2.3. Efeito de estirpes resistentes à estreptomicina, na nodulação e eficiência de fixação de N ₂ , em <u>S. guyanensis</u>	27
3.2.4. Verificação da ocorrência da resistência natural à estreptomicina, da população autóctone de <u>Rhizobium</u> do solo	29
3.3. Competição de estirpes de <u>Rhizobium</u> sp. inoculadas com as nativas do solo, na modulação de <u>S. guyanensis</u>	30

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1. Metodologia da atividade da N ₂ -ase, pela redução do C ₂ H ₂	33
4.1.1. Efeito da lavagem de raízes na atividade da N ₂ -ase	33
4.1.2. Efeito da lavagem da planta inteira e raízes sem a parte aérea na atividade da N ₂ -ase dos nódulos	34
4.1.3. Diferenças entre planta inteira e raízes sem a parte aérea na atividade da N ₂ -ase de duas cultivares de <u>S. guyanensis</u>	36
4.1.4. Atividade da N ₂ -ase dos nódulos do sistema intacto em relação à da raiz e da planta inteira, sob efeito da lavagem	36
4.2. Resistência das estirpes de <u>Rhizobium</u> sp. à estreptomicina	38
4.2.1. Crescimento de estirpes resistentes em meio de cultura, sem e com estreptomicina	38
4.2.2. Efeito das estirpes resistentes à estreptomicina na nodulação, no desenvolvimento e na eficiência da fixação de N ₂ , em <u>S. guyanensis</u>	39
4.2.3. Resistência natural à estreptomicina da população autóctone de <u>Rhizobium</u> do solo	41
4.3. Competição de estirpes de <u>Rhizobium</u> sp. inoculados com as nativas do solo, na nodulação de S. guyanensis	42
4.3.1. Nodulação	42
4.3.1.1. Número e peso seco total dos nódulos	42

4.3.1.2. Percentagem de nódulos devidos às estirpes inoculadas	44
4.3.1.3. Número de nódulos devidos às estirpes inoculadas	48
4.3.2. Desenvolvimento da planta e eficiência da simbiose	49
5. CONCLUSÕES	52
6. RESUMO	53
7. ABSTRACT	55
8. BIBLIOGRAFIAS CITADAS	57

ÍNDICE DE QUADROS

QUADRO		Página
N°		
1.	INFLUÊNCIA DA LAVAGEM DE RAÍZES COM NÓDULOS DE <u>S. guyanensis</u> cv. Schofield E <u>Lotononis bainesii</u> cv. CPI 16.833 NA ATIVIDADE DA H ₂ -ase	76
2.	INFLUÊNCIA DA LAVAGEM DE RAÍZES COM NÓDULOS DE PLANTA INTEIRA DE <u>S. guyanensis</u> cv. IRI.1022 NA ATIVIDADE DA N ₂ -ase	78
3.	DIFERENÇAS ENTRE PLANTAS INTEIRAS E RAÍZES SEM PARTE AÉREA, NA ATIVIDADE DA N ₂ -ase DOS NÓDULOS DE DUAS CULTIVARES DE <u>S. guyanensis</u>	80
4.	ATIVIDADE DA N ₂ -ase DE NÓDULOS EM SISTEMA INTACTO, EM RELAÇÃO À DA RAÍZ E PLANTA INTEIRA SOB EFEITO DA UMIDADE	81
5.	CRESCIMENTO DE ESTIRPES RESISTENTES NUM MEIO DE CULTURA 79, SEM E COM ESTREPTOMICINA	83
6.	EFEITO DE ESTIRPES MUTANTES RESISTENTES À ESTREPTOMICINA, NODULAÇÃO E FIXAÇÃO DE N ₂ , EM DUAS CULTIVARES DE <u>S. guyanensis</u>	84

7.	EFEITO DE ESTIRPES MUTANTES RESISTENTES À ESTREPTOMICINA NO DESENVOLVIMENTO DE DUAS CULTIVARES DE <u>S. guyanensis</u>	85
8	COMPETIÇÃO ENTRE DUAS ESTIRPES DE <u>Rhizobium</u> sp. E A POPULAÇÃO NATIVA DO SOLO, NA NODULAÇÃO DE DUAS CULTIVARES DE <u>S. guyanensis</u>	86
9.	INTERAÇÃO IDADE x CULTIVAR, NO NÚMERO E PESO SECO DE NÓDULOS DE DUAS CULTIVARES DE <u>S. guyanensis</u>	87
10.	DESDOBRAMENTO DO EFEITO DA INTERAÇÃO CULTIVAR x ESTIRPE PARA CADA IDADE, DA PERCENTAGEM E DO NÚMERO DE NÓDULOS DEVIDO ÀS ESTIRPES DE <u>Rhizobium</u> sp.	88
11.	EFEITO DE ESTIRPES DE <u>Rhizobium</u> sp. EM DIFERENTES IDADES, NO DESENVOLVIMENTO E ATIVIDADE DA H ₂ -ase DE DUAS CULTIVARES DE <u>S. guyanensis</u>	91
12.	EFEITO DA INTERAÇÃO IDADE x CULTIVAR, NA MATÉRIA SECA, N TOTAL E ATIVIDADE DA N ₂ -ase DE DUAS CULTIVARES DE <u>S. guyanensis</u>	92

INDICE DE FIGURAS

	Página
1. INFLUÊNCIA DA UMIDADE NA ATIVIDADE DA N ₂ -ase DE NÓDULOS COM RAÍZ DE <u>S. guyanensis</u> cv. Schofield E <u>Lotononis bainesii</u> cv. CPI 16.833	77
2. INFLUÊNCIA DA UMIDADE NA ATIVIDADE DA N ₂ -ase DE NÓDULOS COM RAIS E COM PLANTA INTEIRA EM <u>S. guyanensis</u> cv. IRI.1022	79
3. ATIVIDADE DA N ₂ -ase DE NÓDULOS DO SISTEMA INTACTO EM RELAÇÃO À DA RAIZ E PLANTA INTEIRA, SOB EFEITO DA UMIDADE	82
4. REGRESSÃO DA % DE NÓDULOS DEVIDOS ÀS ESTIRPES SOBRE AS IDADES EM DUAS CULTIVARES DE <u>S. guyanensis</u> INOCULADAS COM ESTIRPES DE <u>Rhizobium</u> sp.	89
5. REGRESSÃO DO NÚMERO DE NÓDULOS DEVIDO ÀS ESTIRPES SOBRE AS IDADES EM DUAS CULTIVARES DE <u>S. guyanensis</u> INOCULADAS COM ESTIRPES DE <u>Rhizobium</u> sp.	90

1. INTRODUÇÃO

A importância da alfafa do Nordeste (Stylosanthes guyanensis) como forrageira, já realçada em muitos trabalhos de pesquisa, foi confirmada por observações feitas em nossa região, localizada no Município de Itaguaí. Nos solos sob vegetação do cerrado do Brasil-Central, a alfafa do Nordeste parece ser a leguminosa mais promissora devido a sua grande tolerância a solos de baixa fertilidade (Buller et al., 1970).

Em nossa região, sob condições de campo, as espécies de leguminosas que apresentaram problemas de estabelecimento foram principalmente Stylosanthes guyanensis, Pueraria javanica e Glycine wightii, enquanto as demais espécies estudadas, Centrosema pubescens e Macroptilium atropurpureum não apresentaram problemas na fase inicial de crescimento (Souto & Lucas, 1972). Entre os vários fatores que determinaram o crescimento lento na fase inicial de uma cultivar de S. guyanensis IRI.1022, foi salientado o problema da "especificidade" desta hospedeira em relação à estirpe de Rhizobium (Souto e al., 1972). Em trabalho recente, foi observado ainda que uma estirpe de

Rhizobium inefetiva, sob condições controladas em meio agarizado, foi mais competitiva do que as efetivas, na nodulação de Stylosanthes guyanensis (Franco, 1974).

Devido à importância deste fato para o estabelecimento da leguminosa, objetivou-se, com a presente tese, estudar a competição das estirpes de Rhizobium inoculadas, uma inefetiva e outra efetiva, com as estirpes nativas do solo, em duas cultivares de S. guyanensis. Entretanto, para atingir este objetivo, foi necessário desenvolver pesquisas para ajustar a metodologia da redução de C_2H_2 às finalidades do trabalho, bem como verificar o comportamento das mutantes resistentes à estreptomicina, usadas na identificação dos nódulos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Metodologia para avaliação da atividade da N₂-ase, pela redução de C₂H₂.

2.1.1. Deficiência de umidade

São muitos os fatores que afetam a atividade da N₂-ase dos diferentes sistemas. A influência da umidade do solo na periferia dos nódulos foi amplamente discutida por Sprent (1971, 1972, 1972a). Em nódulos de soja anual, a queda da umidade para 80% do teor de água necessário à plena turgidez causou declínio proporcional na atividade da N₂-ase. Abaixo deste teor de umidade a estrutura do nódulo sofreu danos irreversíveis, com a perda da atividade da citocroma-oxidase e da atividade da N₂-ase.

No campo, a máxima fixação de N₂ por Vicia faba (Sprent, 1972) e Lupinus arboreus (Sprent & Silvester, 1976) foi obtida com a umidade do solo na capacidade de campo. Acima e abaixo deste nível, a atividade da N₂-ase foi reduzida. Ocorreu progressiva perda da atividade da N₂-ase no solo seco. Com o trevo branco, a recuperação dos nódulos

após ressecamento parcial dependeu da intensidade e do tempo do ressecamento, e foi sugerido ainda por Sprent & Silvester (1973), que o tecido meristemático dos nódulos de trevo tolerou melhor tais ressecamentos do que do nódulo do tipo esférico.

Sprent (1969) achou que nódulos destacados de Glycine max foram capazes de suprir redutores e esqueletos de carbono necessários à manutenção da atividade da N_2 -ase por 8 horas. Entretanto, em nódulos destacados, os efeitos diretos do ressecamento na atividade dos nódulos poderiam ter sido agravados pela interrupção do fornecimento de produtos fotossintéticos.

Kuo e Boersma (1971) constataram interação altamente significativa entre a água e a temperatura do solo, sendo que ambos afetaram fixação de N_2 em Glycine max. Nas temperaturas baixas (10 a 15°C), o ressecamento devido à deficiência de umidade teve efeito mais pronunciado do que a 24 ou 32°C. Segundo os mesmos autores, tal efeito poderia ser relacionado com a baixa absorção de água pelas raízes das plantas nas temperaturas mais baixas.

Recentes dados de Sprent (1973) mostraram que, em *Phaseolus vulgaris* com 44 dias de idade, a redução de 75% no número de nódulos, de 30% no peso seco de nódulos e de 90% na atividade da N_2 -ase, foram relacionados com o ponto de murchamento. Isto indicou que a deficiência de umidade, através de efeitos na nodulação e mais diretamente na atividade da N_2 -ase, comumente limita a fixação de N_2 . Sloger et al. (1973) também observaram, num campo onde

plantas sofreram deficiência de umidade, que a atividade da N_2 -ase diminuiu quando a turgidez relativa das folhas decresceu abaixo de 80%.

2.1.2. Excesso de umidade

Efeitos devidos ao excesso de umidade, ou inundação, são geralmente consequências da deficiência de oxigênio.

O desenvolvimento de nódulos em Glycine max (Bond 1950), Trifolium subterraneum (Loveday 1963), Phaseolus vulgaris (Sprent 1973), Centrosema pubescens, P. atropurpureus e S. guyanensis (De Polli et al. 1973) foi marcadamente reduzido sob condições de baixa pressão parcial de oxigênio no solo. Observando plantas inundadas, Loveday (1963) achou nodulação deficiente em Trifolium subterraneum, crescendo em solos com taxa de difusão de oxigênio de $8 \times 10^{-8} \text{g/cm}^2/\text{min}$. Em solos com taxas de $20 \times 10^{-8} \text{g/cm}^2/\text{min}$., a nodulação foi satisfatória.

A inundação ou lavagem da raiz nodulada pode diminuir fortemente a atividade da N_2 -ase dos nódulos (Hardy et al. 1968, Sprent 1969, Schwinghamer et al. 1970, Wague & Burris 1972) e no caso de inundação, quando prolongada, provocou queda dos nódulos. A principal área para troca de gases é a superfície do nódulo (Sprent 1972). Os nódulos de Glycine max contém muitos espaços intercelulares (Bergersen & Goodchild 1973) que se interconectam desde o interior até

a superfície dos nódulos e que parecem adequados para promover a difusão do oxigênio e manter a pressão parcial da zona com bacteróides, similar àquela da atmosfera do solo. Obstrução destes espaços no córtex dos nódulos interfere na difusão do oxigênio dentro do nódulo. Bergersen et al. (1973) salientaram que o papel do oxigênio na fixação de N_2 e na produção de ATP nos bacteróides, enquanto que o papel da leghemoglobina no nódulo, confirmando de maneira conclusiva, em trabalhos recentes, por Bergersen e Turner (1975), é satisfazer a exigência de oxigênio do sistema de fixação de N_2 , sob baixa concentração de O_2 livre.

O decréscimo do potencial de sucção de água do solo de 2 para 0,35atm resultou em declínio de 55% da atividade de N_2 -ase dos nódulos do sistema intacto de soja (Fishbeck et al. 1973). Kuo e Boersma (1971) mostraram que a redução do potencial de sucção de água teve marcado efeito na fixação de N_2 , uma vez que a difusão de O_2 , é aproximadamente 10.000 vezes mais rápida através do ar do que na água.

Condições aeróbias para redução do acetileno são exigidas pelos nódulos de leguminosas, e o nível ótimo situa-se entre p_{O_2} de 0,2-0,5 atmosferas (Hardy et al. 1973). Recentes estudos (Gibson 1975) indicaram que o aumento na fixação de N_2 pelo *Trifolium subterraneum* e por *Glycine max* se inicia efetivamente à pressão parcial de oxigênio entre 0,05 e 0,08atm, enquanto que para *Trifolium repens* é de cerca de 0,10 atm.

2.1.3. Tipo de amostras

Na avaliação da atividade de N_2 -ase dos nódulos de uma leguminosa o objetivo é obter informações tão próximas quanto possível ao sistema intacto.

Os nódulos destacados de soja anual têm menor atividade da N_2 -ase do que os não destacados (Hardy et al. 1968, Oghoghorie & Pate 1971, Fishbeck et al. 1973), e nódulos em planta inteira da mesma espécie têm maior atividade da N_2 -ase do que em raízes destacadas (Hardy et al. 1973, Hardy & Havelk 1973). Entretanto, Dart et al. (1972) observaram que usualmente a remoção da parte aérea da planta não afeta de maneira mensurável a avaliação da atividade da N_2 -ase, se esta determinação for feita em rápido intervalo de tempo. Assim, segundo Hardy et al. (1973), o sistema radicular com os nódulos poderia ser usado para avaliação da atividade da nitrogenase.

A atividade da N_2 -ase nos nódulos de plantas de soja anual, em vasos intactos e em períodos de incubação de 1/2 hora, foi estatisticamente igual à de raízes noduladas (Fishbeck et al. 1973), porém, menor que a de plantas inteiras retiradas do solo.

2.2. Identificação das estirpes

Estirpes isoladas de nódulos podem ser identificadas através de testes sorológicos e de imunofluorescência (Vincent & Waters 1953, 1954, Jellkins

et al. 1954), Dudman & Brockwell 1968, Trinick 1969, Jones & Russel 1972), ou por marcadores convenientes tais como a capacidade de induzir clorose na hospedeira (Means et al. 1961, Johnson & Means 1964), a resistência a antibióticos (Obaton 1971), a produção de nódulos pretos (Cloonan 1963, Cloonan & Vincent 1967, Döbereiner 1964, 1970), e morfologia das colônias (Brockwell et al. 1971), a especificidade a fagos (Staniewski 1970), ou a inefetividade na fixação de N₂.

A resistência a antibióticos é ideal para uso em experimentos em condições controladas (Marques Pinto et al. 1974) e pode também ser empregada no campo, como demonstrado por Obaton, (1971). A resistência à estreptomicina mostra-se útil marcador genético, pois este antibiótico atua na síntese de proteína inibindo completamente ou não afetando o crescimento do organismo. A mutação para esta resistência tem grande estabilidade; apresenta relativa variabilidade para resistência cruzada, e, na maioria das vezes, não foi encontrada qualquer depreciação da simbiose (Brockwell et al. 1971).

Vincent & Waters (1953), Means et al. (1961) e Robinson (1959) usaram nódulo "mais proeminente" na identificação da estirpe no nódulo, porém, Dudman & Brockwell (1968) mostraram que a representação das estirpes entre os nódulos de uma planta não foi a mesma quando somente o nódulo proeminente em várias plantas foi considerado. Por outro lado, foi observado em Trifolium glomeratum, T. repens, T. subterraneum, Medicago minima

(Hughes Vincent 1942, Vincent 1954, Dudman & Brockwell 1968) e em Glycine max (Bushnell & Sarles 1939, Skrdleta 1969), que cada nódulo é geralmente formado por uma única estirpe de Rhizobium mesmo que nódulos adjacentes na mesma planta possam ser formados por diferentes estirpes quando expostos a uma mistura do estirpes. Contudo, com Medicago sativa (Krasilnikov & Melkumova 1963) e Glycine max (Skrdleta 1969, 1970), cerca de 10 dos nódulos continham Rhizobium de mais de um sorotipo. Maior incidência de nódulos produzidos por mais de uma estirpe ocorreu principalmente em condições controladas, quando uma alta concentração de ambas as estirpes estava presente na superfície da raiz (Marques Pinto et al. 1974).

2.3. Resistência das estirpes de Rhizobium sp. à estreptomicina.

O comportamento de Rhizobium em relação à planta hospedeira pode ser alterado por modificação genética de um ou do outro. Numerosas observações têm sido registradas em relação à variação natural, com baixa frequência, na habilidade de nodular (infectividade) ou na habilidade de fixação de nitrogênio (efetividade) de estirpes de Rhizobium, sob condições adversas ou de ambientes seletivos, como em culturas conservadas por longo tempo, conservação em baixa temperatura, dessecação no solo, e por várias passagens por um hospedeiro (Allen & Allen 1940).

Entretanto, significativo aumento da frequência da variação genética pode ser conseguido, artificialmente, por transferência de material genético através da transformação (Krasilnikov 1945, 1953, Balassa 1960, 1963, Ljunggren, 1961, 1969, Mareckhova 1970), da conjugação (Higashi 1967) e da transdução (Kleczkowska 1957), ou por mutação através do uso de raios X ou luz ultravioleta (Jordan 1952, Schwinghamer 1962). Algumas mutantes resistentes a antibióticos, de R. leguminosarum e R. trifolium mostraram perda da efetividade na hospedeira homóloga, sendo que a frequência e o grau de inefetividade variaram com o antibiótico usado (Schwinghamer 1967). Rodi (1973) achou que R. japonicum e R. trifolium foram transformados em formas resistentes à estreptomicina com frequência muito baixa. Schwinghamer (1964, 1957) observou perda de efetividade em estirpes de R. leguminosarum, R. trifolium e R. melilotus, resistentes à canamicina e polimixina, mas nenhuma alteração da efetividade nas estirpes resistentes à estreptomicina, aspiramicina, clorofenicol ou tetraciclina.

É muito difícil associar mudanças nas características da bactéria com perda da efetividade da simbiose. Entretanto, as alterações na parede celular foram sugeridas como possíveis causas do decréscimo da efetividade de mutantes resistentes a antibióticos, notadamente à D-cicloserina, a qual é conhecida como inibidora da síntese da parede celular (Schwinghamer 1967).

Weisblum & Davies (1968) observaram que a

estreptomicina não pôde ser removida com uma eventual lavagem das células, indicando isso uma vantagem para este antibiótico, pois há absorção pelo organismo e não simples aderência externa. Por outro lado, Schwinghamer (1967) e Weisblum e Davies (1968) demonstraram que a estreptomicina pertence ao grupo de antibióticos cujo mecanismo de ação é principalmente inibidor da síntese proteica.

Schwinghamer (1962), trabalhando com duas estirpes resistentes para cada leguminosa, demonstrou que a mutação para resistência à estreptomicina foi acompanhada de perda de efetividade em Pisum sativum, Vicia sp. e Lathyrus odoratus enquanto que não houve alteração na efetividade das estirpes Trifolium pratense. Levin & Montgomery (1973) mostraram que na soja anual não houve perda da efetividade com a mutação para resistência à estreptomicina.

Franco (1974) observou apenas perda parcial da eficiência, ou de nenhuma perda em Stylosanthes guyanensis cv. IRI.1022. Achou uma mutante resistente à estreptomicina menos eficiente e outra tão eficiente quanto à sua original. Alves (1975), utilizando estirpe CB-1809 de Rhizobium japonicum na inoculação de soja anual, em experimento de casa de vegetação, verificou que as mutantes resistentes à estreptomicina perderam a capacidade de nodular, enquanto a estirpe original continuou altamente eficiente. Entretanto, nos casos em que irão foi avaliada a nodulação, é difícil comprovar que o material obtido é Rhizobium.

Os efeitos da mutação para resistência à estreptomicina nas várias propriedades de diversas espécies

de Rhizobium têm sido descritos contraditoriamente. Trocas na morfologia das colônias, de lisas para enrugadas, (Zelazna-Kowalska 1971), a perda da habilidade para a infecção nas raízes de leguminosas (Alves 1975), e a perda da efetividade na simbiose tem sido observadas. Entretanto, Gollobin & Levin (1973) realizaram estudo com 92 mutantes e mostraram resultados distintos dos acima citados.

Abdel-Wahab et al. (1973) observaram que mutantes de R. trifolii resistentes a 50 µg/ml de estreptomicina foram mais eficientes na fixação de nitrogênio do que as estirpes originais. Com exceção deste trabalho, entretanto, nenhum acréscimo na efetividade de fixação de N₂ foi obtido pelo uso de mutantes resistentes a antibióticos. O máximo até então conseguido foi a igualdade na efetividade entre as estirpes resistentes e suas originais. Por outro lado, a maior parte das pesquisas relacionadas à genética do Rhizobium foram feitas com estirpes de leguminosas de clima temperado.

2.4. Competição entre estirpes de Rhizobium sp.

A competição entre estirpes de Rhizobium na nodulação da leguminosa é fenômeno complexo. O sucesso de uma estirpe é determinado pela compatibilidade genética com o hospedeiro e com as condições ecológicas locais.

O número de nódulos formado por uma estirpe, muitas vezes, não pode ser relacionado diretamente com a densidade desta no inoculante (Johnson & Means 1964, Holland 1970).

Este fato é explicado pela multiplicação do Rhizobium em torno da raiz (Tuzimura & Watanabe 1962) e pela diferença na capacidade de nodular que ocorre entre as estirpes (Means et al. 1961, Ham 1967, Caldwell 1969, Skrdleta & Karimova 1969, Junsen van Rensburg & Strijdon 1969, Skrdleta 1970, Marques Pinto et al. 1974, Franco 1974). Interferem ainda fatores do meio ambiente que tenham ação seletiva a favor de uma estirpe, tais como fagos (Kleczkowska 1950), dessecação do solo (Allen & Allen 1940) e antagonismo de outros microorganismos (Hely et al. 1957, Holland Parker 1966, Chatel et al. 1968). Também foi constatado por Vincent & Waters (1953) que a proporção de nódulos produzidos por estirpes do Rhizobium trifolii não estava necessariamente relacionada à sua representação na superfície da raiz. Algumas estirpes inefetivas de R. trifolii são altamente competitivas para a formação de nódulos em Trifolium pratense (Nicol & Thornton 1941), mas Robinson (1969, 1969a) observou que a estirpe efetiva foi sempre mais competitiva na formação de nódulos do que a estirpe inefetiva. Em trabalhos mais recentes, Marques Pinto et al. (1974) observaram diferença na competitividade para formação de nódulos entre estirpes efetivas, mostrando assim que aquela diferença não pode ser relacionada, em todos os casos, com efetividade da simbiose. Means et al. (1961), trabalhando com uma estirpe de soja indutora de clorose, observaram que 85% dos nódulos provinham dela, embora representasse apenas 1,1% da mistura inicial no inoculante. Por outro lado, em vários solos a população nativa de Rhizobium dominou a

formação de nódulos em soja e apenas 5% dos nódulos formados foram devidos à estirpe do inoculante (Damirgi et al. 1967, Ham et al. 1971).

Entretanto, com leguminosas tropicais, muito pouca tem sido estudado em relação à competição do Rhizobium. Cloonan & Vincent (1967) acharam que Lablab purpureus e Vigna sinensis estabeleceram-se melhor em solo basáltico vermelho com o aumento da densidade de Rhizobium no inoculante. Franco et al. (1970), usando revestimento das sementes de Centrosema pubescens com carbonato de cálcio, em solo ácido com toxidez de manganês, observaram diferenças entre estirpes inoculadas na competição com as menos efetivas do solo. Lopes et al. (1970) acharam que as estirpes de Rhizobium nativas do solo, em alguns solos em São Paulo, não foram efetivas em Glycine wightii, porém, nenhuma diferença foi encontrada com o Siratro. Whiteman (1972), estudando o estabelecimento de Siratro no campo, achou que o maior nível de inoculação, 100 vezes maior do que a normal (1,5g de inoculante/150g de sementes) não afetou o número de nódulos por planta quando comparado com o controle não inoculado. Date (1972, 1975) achou que a proporção de nódulos devidos à estirpe inoculada variou com o local, ano e hospedeira, porém foi geralmente mais alto com Desmodium intortum do que com Macroptilium atropurpureum, e Glycine wightii. No Desmodium intortum, a proporção de nódulos produzidos pelo Rhizobium inoculado, no período de três anos decresceu progressivamente em um local, ficou estacionário em outro e aumentou num terceiro.

2.5. Problemas relacionados com a simbiose do S. guyanensis
Aubl. Swartz

Galli (1958) e Norris (1965) classificaram a espécie S. guyanensis no grupo de leguminosas de inoculação cruzada promíscua. Em ensaios em vasos na Nigéria, Adegbola e Onayiaka (1966) acharam que o crescimento e a nodulação de plantas de S. guyanensis inoculadas com as estirpes CB-44 e 3 G-4 B 10 foram apreciavelmente melhores do que nas plantas não inoculadas ou naquelas inoculadas com estirpes de Rhizobium do próprio local.

Norris (1967) recomendou um inoculante específico para a variedade de S. guyanensis que chamou de "Oxley-fine-Stem-Stylo". Thomas (1973) encontrou bom estabelecimento da var. "Oxley-fine-Stem" quando foi inoculada com a estirpe CB-1522. t'Mannetje (1969), em estudo da relação de estirpes de Rhizobium para diferentes espécies e variedades do gênero Stylosanthes, recomendou a estirpe CB-52 para a variedade Schofield e CB-550 para a variedade "Oxley-fine-Stem" Döbereiner (1970) classificou Centrosema pubescens e algumas cultivares de S. guyanensis como de "especificidade intermediária".

Date & Norris (1972, 1975) testaram 306 introduções de Stylosanthes spp. com a estirpe CB-756 e acharam que 96 linhagens produziram menos do que a metade do controle fertilizado com nitrato. Destas 96 linhagens, 65 foram testadas com 22 estirpes de Rhizobium de diferentes origens, sendo que 17 linhagens pertencentes a 4 espécies de

Stylosanthes não formaram associação efetiva com nenhuma das estirpes estudadas. Entre elas, 9 linhagens foram de Stylosanthes guyanensis.

Savory & Thomas (1971), em Malawi, África, acharam que as plantas da var. Schofield de S. guyanensis nodularam e estabeleceram-se com sucesso só após a inoculação com estirpes comerciais introduzidas. Souto et al. (1972) encontraram pronunciada especificidade pura a cultivar IRI.1022 de S. guyanensis. Esta cultivar não nodulou com várias estirpes do grupo "cowpea", tidas como as melhores para as leguminosas tropicais da região. A nodulação com a população de Rhizobium do solo foi mais efetiva do que com algumas estirpes homólogas testadas. Também na Nigéria (Adegbola 1964), em Uganda (Horrell & Court 1965) e na Malásia (Chandapillai 1972), nódulos efetivos foram achados em plantas não inoculadas de Stylosanthes guyanensis, indicando que as regiões tropicais ocorrem naturalmente estirpes de Rhizobium capazes de nodular eficientemente S. guyanensis. Devido à importância prática. do S. guyanensis para as condições tropicais e às dificuldades de nodulação e estabelecimento de algumas cultivares que apresentam potencial como forrageiras, Franco (1974) estudou em condições controladas, em meio agarizado, a capacidade de colonização das raízes e de produção de nódulos na cultivar IRI.1022 de Stylosanthes guyanensis, usando vários pares de estirpes com diferentes efetividades; os resultados mostraram maior competitividade na nodulação, de uma estirpe inefetiva, e evidenciaram, assim, o risco do uso de

mistura de estirpes na preparação de inoculantes, o que poderia resultar em falha de uma nodulação efetiva mesmo que estivesse presente nesta mistura uma estirpe específica e efetiva. Entretanto, devido à implicação que isto poderia acarretar no estabelecimento de cultivares de S. guyanensis, faz-se necessária a comprovação da que, nas condições mais complexas do solo, estes resultados seriam confirmados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Metodologia. para avaliação da atividade da N_2 -ase pela redução do C_2H_2 .

3.1.1. Influência da lavagem de raízes com nódulos na atividade da N_2 -ase.

Est.: ensaio foi feito com plantas colhidas no campo usando-se Stylosanthes guyanensis cv. Schofield e Latononis bainesii cv. CPI 16833. As plantas de ambas as espécies se apresentaram com bom desenvolvimento e boa nodulação. A cultivar Schofield, comercial na Austrália, e cuja origem foi a América do Sul, foi introduzida na Austrália em 1930 e recebeu o número de introdução CPI 5630 (Stonard 1968). Esta cultivar foi introduzida da Austrália para o IPEACS (atualmente EMBRAPA-RJ.) em 1970 (Souto e Monteiro 1972). É tida como "promíscua" com relação à nodulação com estirpe de *Rhizobium* (t'Mannetje 1969). Sua descrição botânica sucinta é encontrada no trabalho de t'Mannetje (1969).

Lotononis bainesii cv. CPI 16833 foi introduzida do Sul da África para a Austrália em 1952 (Bryan 1961), e deste país para o atualmente extinto IPEACS em 1962 (Souto & Monteiro 1972). Norris (1958) considerou a espécie L. bainesii como "altamente específica" em relação à sua simbiose com a estirpe de Rhizobium. Descrição botânica detalhada desta cultivar é encontrada no trabalho de Bryan (1961).

A finalidade do ensaio foi verificar o efeito da lavagem na atividade da N_2 -ase dos nódulos em raízes destacadas das duas cultivares mencionadas. Para isso, fez-se a determinação das atividades da N_2 -ase em duas fases de incubações consecutivas.

1ª fase de incubação:

A - Raízes com nódulos lavados;

B - Raízes com nódulos não lavados;

2ª fase de incubação:

a - raízes com nódulos do tratamento A foram relavadas;

b - raízes com nódulos do tratamento B foram lavadas;

c - raízes com nódulos do tratamento B não foram lavadas.

Foram usadas 8 repetições para cada tratamento.

Foram coletadas no campo plantas bem noduladas e selecionadas raízes com nodulação abundante, as quais foram

colocadas em vidros de 120ml, sendo 4 raízes inteiras por vidro (uma repetição); cada vidro foi fechado com tampa de borracha, substituindo imediatamente 12% do ar pelo acetileno. Após 1 hora de incubação à temperatura ambiente, foi determinada a quantidade de C_2H_4 produzido. O etileno produzido foi avaliado injetando-se 0,5ml da mistura do gás produzido na incubação num cromatógrafo de gás Perkin Elmer (F-11), com coluna Poropak N de 2m x 5mm (de diâmetro), à temperatura de 100°C tendo o nitrogênio como gás de arraste, num fluxo de 25ml/min e ionização de chama de hidrogênio.

Após retirada da amostra para leitura da 1ª fase, os vidros foram abertos, e as raízes com nódulos relavadas ou não, conforme o tratamento, e novamente colocadas para incubar como anteriormente.

Nas duas fases de incubação houve testemunhas com substituição de 12% do ar por C_2H_2 de um vidro vazio, para corrigir a impureza de C_2H_4 presente no acetileno usado.

3.1.2. Efeito da lavagem de raízes com nódulos e da planta inteira na atividade da N_2 -ase

Este ensaio foi feito com plantas colhidas no campo, usando Stylosanthes guyanensis cv. IRI.1022. Esta cultivar é nativa no Brasil, e sua primeira coleta foi feita em 1962 pelo Instituto de Pesquisas I.R.I., nas proximidades de Matão, Estado de São Paulo (Hymowitz 1971). Esta cultivar

foi introduzida no então IPEACS em 1964 (Souto & Monteiro 1972). É considerada como "especifica" em relação à estirpe de Rhizobium (Souto et al. 1972). Sua descrição botânica sumarizada é encontrada em Hymowitz (1971).

A finalidade deste ensaio foi pesquisar o efeito da lavagem na atividade de N_2 -ase dos nódulos de raízes destacadas da planta e de nódulos em plantas inteiras retiradas do solo, e para isso esquematizaram-se duas determinações consecutivas da atividade da N_2 -ase conforme o esquema abaixo:

1ª fase de incubação:

- A - Raízes com nódulos lavadas;
- B - Plantas inteiras lavadas;
- C - Raízes com nódulos não lavadas;
- D - Plantas inteiras não lavadas;

2ª fase de incubação:

- A - raízes do tratamento A foram relavadas
- b - plantas inteiras do tratamento B foram relavadas;
- c - raízes do tratamento C foram lavadas;
- d - raízes do tratamento C não foram lavadas;
- e - plantas inteiras do tratamento D foram lavadas;
- f - plantas inteiras do tratamento D não foram lavadas,

Foram usadas 6 repetições para cada tratamento.

O tratamento "relavada" na 2ª fase de incubação

foi feito colocando papel de filtro umedecido dentro do vidro durante a incubação com C_2H_2 , com o intuito de promover um ambiente suficientemente úmido e assim evitar a dessecação dos nódulos durante a incubação.

A coleta e a determinação de N_2 -ase foram feitas como no item 3.1.1.

3.1.3. Diferenças entre placas inteiras e raízes sem parte aérea, na atividade da N_2 -ase dos nódulos de duas cultivares de S. guyanensis

Este ensaio foi feito com as plantas colhidas no campo e selecionadas segundo a uniformidade da nodulação, em duas cultivares de Stylosanthes guyanensis, IRI.1022, e Schofield. A finalidade deste ensaio foi verificar as diferenças das atividades da N_2 -ase dos nódulos de raízes destacadas e de plantas inteiras das duas cultivares mencionadas.

Este ensaio compreendeu somente uma fase de incubação. Foram usadas 8 repetições para cada tratamento, obedecendo ao seguinte esquema:

- A - Raízes com nódulos - cv. IRI.1022;
- B - Raiz com nódulos - cv. Schofield;
- C - Planta inteira - cv. IRI.1022;
- D - Planta inteira - cv. Schofield;

A coleta e avaliação da atividade de N_2 -ase foram feitas como no item 3.1.1.

3.1.4. Efeito da lavagem da planta inteira e da raiz com nódulos na atividade da N_2 -ase, comparado com o sistema intacto.

Este ensaio foi feito em potes, em casa de vegetação, usando a cultivar IRI.1022. A finalidade do ensaio foi pesquisar o efeito da lavagem na atividade da N_2 -ase de nódulos de raízes destacadas e dos nódulos de plantas inteira retiradas do solo, comparadas com a atividade da N_2 -ase dos nódulos do sistema intacto (planta + solo).

Este ensaio compreendeu duas fases de incubação. Foram usadas repetições para cada tratamento, obedecendo-se ao seguinte esquema:

1ª fase de incubação:

Nesta fase foi adotado como tratamento único o sistema intacto;

2ª fase de incubação:

- a - raízes com nódulos lavadas;
- b - raízes com nódulos não lavadas;
- c - plantas inteiras lavadas;
- d - inteiras não lavadas.

Foi usado solo podzólico vermelho-amarelo acondicionado em latas com capacidade para 600g. Após o desbaste deixaram-se duas plantas/lata.

Na 1ª fase de incubação as latas com as plantas

foram colocadas dentro de um vidro com capacidade para 3.600ml, substituindo-se em seguida 12 % de ar por C₂H₂; após 1 hora de incubação foi medido o C₂H₄ produzido.

Após a leitura da 1ª fase, as plantas foram retiradas da lata e postas para incubar segundo o esquema delineado.

A coleta e determinação da atividade de N₂-ase foram feitas como no item 3.1.1.

3.2. Seleção e testes com estirpes mutantes do *Rhizobium* resistentes à estreptomicina

3.2.1. Resistência das estirpes de *Rhizobium* sp. à estreptomicina

A finalidade deste ensaio foi obter estirpes mutantes de *Rhizobium* resistentes à estreptomicina para usá-las na identificação dos nódulos do experimento de competição de estirpes inoculadas com as nativas do solo (item 3.3).

A estirpe de *Rhizobium* sp. BR-11 foi originalmente isolada de *Calopogonium mucunoides* e está catalogada na coleção da EMBRAPA-RJ com a notação CM-7. Apresenta, 4 dias após a repicagem, colônias visíveis em meio de cultura ágar-79 (Fred & Walksman 1928) a 30°C. O diâmetro das colônias, medido no 10º dia, varia de 1 a 3mm. São colônias redondas, brilhantes e convexas. Esta estirpe produz nódulos inefetivos nas cultivares de *Stylosanthes guyanensis* usadas.

A estirpe de *Rhizobium* BR-23 foi isolada de S. guyanensis e corresponde a CB-82 da coleção da C.S.I.R.O.-Austrália. As colônias são visíveis em meio de cultura ágar-79 a 30°C, 5 dias após a repicagem. Elas medem, no 10º dia, aproximadamente 2mm de diâmetro. São colônias uniformes, redondas, aspecto leitoso e espessas. Esta estirpe produz nódulos efetivos nas cultivares. de Stylosanthes guyanensis usadas.

O meio de cultura utilizado nestes ensaios foi o 79-ágar com. manitol, ajustado o seu pH para 7 (Fred 1928).

Foi preparada uma solução "stock" de 10^3 µg de sulfato de estreptomicina farmacêutica/ml, a qual foi esterilizada, usando-se filtro Seitz. Esta solução concentrada foi colocada em vidros previamente esterilizados e conservada à temperatura de 4°C. Após esterilização, o meio de cultura 79 foi resfriado e mantido a 50°C. Foi então adicionada uma quantidade da solução "stock" de estreptomicina suficiente para se obterem 150 µg de sulfato da estreptomicina/ml de meio de cultura. Após agitar bem o meio de cultura com a estreptomicina, foi feita a distribuição em placas de Petri.

As culturas das estirpes de *Rhizobium* BR-11 e BR-23 para inoculação cresceram em "ágar inclinado" (10ml meio 79 em frascos de 25ml) e foram colhidas e suspensas em solução salina (Jensen, 1942).

A suspensão com Rhizobium foi aplicada sob a forma de película em toda a placa Petri "sem", e posteriormente na "com" estreptomicina; essa aplicação foi feita por meio

de um bastão com uma extremidade envolvida por algodão previamente esterilizado a seco e embebido na suspensão. Procurou-se fazer uma distribuição densa e uniforme por toda a superfície da placa. As placas foram incubadas a 30°C por 10 dias. Após este período de incubação, obteve-se crescimento denso nas placas sem estreptomicina e colônias isoladas nas placas "com" estreptomicina. Fez-se a multiplicação de uma mutante de cada estirpe, das duas estirpes usadas, em meio com estreptomicina dando-lhes as notações BR-11r e BR-25r, respectivamente.

3.2.2. Verificação da uniformidade das mutantes BR-11r e BR-23r quanto à resistência à estreptomicina

Culturas crescendo em meio 79 sólido foram colhidas cora solução salina, preparando-se diluições de 10^0 a 10^9 . Em seguida foi pipetado 1ml de cada uma das diluições 10^7 , 10^8 e 10^9 em placas de Petri, preparadas com meio de cultura mantido a 50°C com e sem estreptomicina e agitando-se de modo a obter uma distribuição uniforme das colônias nas placas. Para cada diluição foram feitas 3 placas com e 3 sem estreptomicina; após incubação a 30°C por 10 dias foi feita a contagem das colônias.

3.2.3. Efeito de estirpes resistentes à estreptomicina na nodulação e eficiência da fixação de N₂, em S. guyanensis

A finalidade do ensaio foi verificar o comportamento das estirpes mutantes resistentes à estreptomicina na nodulação, na eficiência de fixação de N₂ e no desenvolvimento da planta, em relação às estirpes originais.

Foram usadas as duas cultivares de S. guyanensis, IRI.1022 e Schofield. A vasos "Leonard" com vermiculita esterilizada foram adicionados 400ml/vaso da seguinte solução nutritiva:

H ₂ O	400,000ml;
KCl	59,600mg;
K ₂ HPO ₄ '	20,000mg;
KH ₂ PO ₄	120,000mg;
MgSO ₄ .7H ₂ O	197,200mg;
FeSO ₄ .7H ₂ O a 5% em sol. com ácido cítrico a 5%	0,400ml;
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,036mg;
ZnSO ₄ .7H ₂ O,	0,088mg;
MnSO ₄ .2H ₂ O,	0,080mg;
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,004mg;
H ₃ BO ₃	0,572mg.

Esta solução foi fervida por 60 minutos e na hora do uso foram adicionados 137,600mg de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Foi feito um fatorial 2 x 4, com 4 repetições, sorteado em blocos ao acaso com os seguintes tratamentos:

Cultivares	Estirpes
IRI.1022	BR 11;
IRI.1022	BR 11r;
IRI.1022	BR 23;
IRI.1022	BR 23r;
Schofield	BR11;
Schofield	BR11r;
Schofield	BR23;
Schofield	BR23r.

As sementes das leguminosas foram escarificadas com ácido sulfúrico concentrado por 5 minutos, lavadas 6 a 8 vezes com água, tratadas com etanol por 1 minuto, seguido por HgCl_2 (1:500) por 3 minutos e então lavadas 5 vezes com água esterilizada. As sementes foram distribuídas uniformemente em placas de Petri com ágar (0,75%) em água e postas para germinar na estufa a 30°C. No dia seguinte, 6 plântulas uniformemente selecionadas foram transplantadas para cada vaso. Imediatamente após o plantio inocularam-se as estirpes de *Rhizobium*, adicionando-se 2×10^8 células de *Rhizobium*/plântula. Três dias após o plantio foi feito o desbaste para 2 plantas/vaso.

A coleta deste ensaio foi feita. 60 dias após o plantio.

A atividade da N_2 -ase nos nódulos foi medida separando-se a parte aérea do sistema radicular, que foi colocado imediatamente em vidros com capacidade de 380ml. Estes foram fechados, evacuando 12% do ar do interior de cada vidro e injetando igual volume de C_2H_2 . Após incubação por 1 hora, a produção de C_2H_2 foi medida no cromatógrafo. Além da atividade da N_2 -ase determinou-se o número e peso seco dos nódulos. Após retirados os nódulos, as raízes com a parte aérea foram secadas a $60^\circ C$ sendo o nitrogênio determinado pelo método semimicro de Kjeldahl.

3.2.4. Verificação da ocorrência da resistência natural a estreptomicina da população autóctone de *Rhizobium* do solo.

Foram plantadas sementes escarificadas e esterilizadas de duas cultivares de *Stylosanthes guyanensis*, IRI.1022 e Schofield, em vasos com solo e sem inoculação, com a finalidade de verificar a ocorrência da resistência natural da população nativa de *Rhizobium* do solo.

Aos 40 dias foram coletadas plantas, para identificação dos nódulos formados, em placas com meio 79 + manitol, sem e com estreptomicina (150 μ g/ml de meio).

Pedaços de raízes noduladas foram fixadas com fita adesiva numa lâmina do vidro tratada com etanol por 30

segundos, seguido de HgCl₂ 1:1000 por 1 minuto e posteriormente lavadas 2 vezes com água esterilizada. A lâmina de vidro com as raízes foi então colocada em placa de Petri com papel de filtro previamente esterilizado, para enxugar a água retida em torno dos nódulos e da raiz. Em seguida, cada nódulo foi perfurado com alfinete esterilizado, inoculando-se uma placa com e outra sem estreptomicina. Os riscos foram feitos de tal forma que se acomodaram 16 em cada placa. Tentou-se isolamento de Rhizobium de 200 nódulos, sendo 100 para cada cultivar. As placas foram incubadas a 30°C por 10 dias e observadas periodicamente até o 15º dia.

3.3. Competição de estirpes de Rhizobium sp. inoculadas com as nativas do solo, na nodulação de Stylosanthes guyanensis

Este experimento foi feito em uma casa de vegetação, em vasos com solo podzólico vermelho-amarelo série Itaguaí, com duas cultivares de S. guyanensis, IRI.1022 e Schofield. Foram usadas as mutantes das estirpes de Rhizobium, inefetivas BR-11r e efetiva BR-23r, ambas resistentes à estreptomicina.

O experimento foi feito em blocos ao acaso com 4 repetições, duas cultivares, duas estirpes de Rhizobium sp. inoculadas e um tratamento sem inoculação e ainda com colheitas em seis idades, que foram combinadas de acordo

com o fatorial 2 x 5 x 6 obtendo-se assim 36 diferentes tratamentos.

O solo usado foi colhido nas proximidades do Setor de Nutrição Animal e Agrostologia da EMBRAPA-RJ e sua análise química segundo os métodos desenvolvidos por Vettori (1969) revelou a seguinte composição: N, 0,06%; P, 3ppm; K, 52ppm; $Ca^{++} + Na^{++}$, 1,80mE/100cc; Al^{+++} , 0,60mE/100cc; pH, 5,0. Todos os vasos foram preenchidos com 1,8kg de solo. Determinou-se a curva de neutralização do solo e fez-se calagem de 500mg de calcário dolomítico (CaO , 29,22%; MgO , 16,37%) por kg de solo, para elevar o pH de 5 para 5,6.

Fez-se adubação básica misturando uniformemente os nutrientes com o solo, e compreendendo por kg de solo: 47,8mg de P; 60,0mg de K; 150mg de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,5mg de $Na_2MoO_4 \cdot 7H_2O$; 15,8mg de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 1,0mg de H_3BO_3 ; 2,0mg de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 8,90mg de $ZnSO_4 \cdot 2H_2O$.

As sementes das cultivares usadas foram escarificadas, e desinfestadas, pré-germinadas e plantadas como no item 3.2.3. e deixaram-se após o desbaste 4 plantas por vaso.

A inoculação com as estirpes BR-11r e BR-23r foi feita imediatamente após o plantio, usando 2×10^9 células de Rhizobium/plântula.

Por ocasião do plantio (10/07/74) também foi feita contagem do número mais provável de células do Rhizobium nativo, usando o método da diluição com plantas (Vincent 1970).

Em cada colheita as plantas foram retiradas dos vasos, com todo o cuidado possível, separando a parte aérea das raízes, e estas imediatamente foram colocadas dentro de um vidro com capacidade de 380ml, substituindo-se 12% do ar por C₂H₂. Determinou-se a atividade da N₂-ase pelo método de redução de acetileno como descrito no item 3.1.1. Em seguida todas as raízes com nódulos foram retiradas dos vidros e foi feita a identificação dos mesmos, como descrito no item 3.2.4. O total de nódulos identificados foi de 30 para cada vaso.

Determinou-se, a partir dos 20 e 40 dias de idade, o número e o peso seco dos nódulos, respectivamente. O material planta foi secado em estufa à 60°C, e posteriormente pesado, determinando-se o nitrogênio pelo método semimicro de Kjeldahl.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Metodologia da atividade da N₂-ase, pela redução do C₂H₂.

4.1.1. Efeito da lavagem de raízes na atividade da N₂-ase.

Os resultados deste experimento são apresentados no Quadro 1 e na Fig. 1.

Os efeitos da lavagem, na atividade de N₂-ase de nódulos, podem ser vistos na Fig. 1, na qual se considerou 100 a atividade da N₂-ase apresentada na 1^a fase de incubação. Quando as raízes de ambas as espécies, S. guyanensis cv. Schofield e Lotononis bainesii cv. CPI.16833, foram lavadas na 1^a e 2^a fases de incubação, houve decréscimo da atividade da N₂-ase.

Os nódulos da cultivar Schofield não lavados na 1^a fase tiveram atividade de N₂-ase decrescida quando lavados na 2^a fase de incubação, mostrando outra vez o efeito negativo; porém, diferença menos acentuada foi observada entre a 1^a e a 2^a fases de incubação, quando não foram

lavados. Resultados diferentes foram encontrados para o Lotononis bainesii, cujos nódulos de raízes não lavados na 1ª fase, quando não lavados na 2ª fase de incubação, tiveram sua atividade da N₂-ase diminuída, não apresentando nenhuma diferença em relação ao lavado na 2ª fase de incubação.

Estes resultados indicam efeito negativo da lavagem na atividade da N₂-ase, em ambas as leguminosas. Segundo Sprent (1972), a superfície do nódulo é a principal área para troca gasosa, e Bergensen & Goodchild (1973) mostraram que o transporte de O₂ se dá através dos espaços intercelulares disponíveis e também dos intracelulares, tendo como veículo a leghemoglobina. Estes resultados confirmam as observações de Hardy et al. (1968), Sprent (1969), e Schinghamer et al. (1970), segundo os quais a atividade da N₂-ase é diminuída quando uma película de água permanece na superfície dos nódulos após a lavagem.

4.1.2. Efeito da lavagem da planta inteira e raízes sem a parte aérea na atividade da N₂-ase dos nódulos.

O efeito da lavagem das raízes e da planta inteira da cultivar IRI.1022 na atividade da N₂-ase é visto no Quadro e Fig. 2.

Foi atribuído o valor 100 para a atividade da N₂-ase na 1ª fase de incubação (Fig. 2). Quando as raízes e plantas inteiras da cultivar IRI.1022 foram lavadas na 1ª fase e em seguida foram mantidas em ambiente úmido com papel

de filtro umedecido na 2ª fase de incubação, os nódulos de ambas as fases tiveram sua atividade da N₂-ase aumentada. Isto mostra que a manutenção da umidade do ar obtida com papel de filtro umedecido não teve efeito negativo da lavagem dos nódulos na atividade da N₂-ase.

Foi observado decréscimo na atividade da N₂-ase entre nódulos de raízes não lavadas na 1ª fase e lavadas na 2ª fase de incubação, confirmando os resultados anteriores quanto ao efeito negativo d lavagem. Porém, quando se compara atividade da N₂-ase dos nódulos em raízes com a dos nódulos em plantas inteiras não lavadas na 1ª e na 2ª fases de incubação, nota-se aumento da atividade da N₂-ase dos nódulos em ambos os tipos de amostras, e mais, que atividade da N₂-ase de nódulos de raízes destacadas foi aproximadamente duas vezes maior do que a dos de plantas inteiras. Segundo Hardy et al. (1973), nódulos em plantas inteiras têm maior atividade de N₂-ase do que os das raízes destacadas. Entretanto, os resultados obtidos (Fig. 2) mostram que atividade dos nódulos de raízes da cultivar IRI.1022 foi maior do que a das de plantas inteiras. Interessante notar que a cultivar Schofield, no ensaio anterior, mostrou diferenças estatísticas pouco acentuadas quanto à atividade de N₂-ase dos nódulos, quando suas raízes não foram lavadas na 1ª e 2ª fases de incubação.

4.1.3. Diferenças entre plantas inteiras e raízes sem a parte aérea na atividade da N₂-ase de duas cultivares de S. guyanensis.

Os resultados deste ensaio estão apresentados no Quadro 3, e mostram diferenças da atividade de N₂-ase dos nódulos, entre cultivares. Assim, na cultivar Schofield, nódulos de plantas inteiras mostraram maior atividade da N₂-ase do que o sistema radicular, enquanto que a cultivar IRI.1022 não apresentou diferenças.

Esta diferença entre cultivares sugere que a fixação de N₂ da cultivar Schofield é mais diretamente dependente dos produtos fotossintéticos do que a da cultivar IRI.1022. Sprent (1969) achou que nódulos destacados de Glycine max são capazes de suprir seu próprio redutor e esqueleto de carbono por 8 horas; esta mesma autora (1972), no caso da planta inteira, mostrou que os efeitos diretos do ressecamento na atividade dos nódulos devem ser agravados pela redução da fotossíntese da planta.

4.1.4. Atividade da N₂-ase dos nódulos do sistema intacto, em: relação à da raiz e da planta inteira, sob efeito da lavagem.

No Quadro 4 e Fig. 3, podem ser comparados os efeitos da lavagem na atividade da N₂-ase em nódulos do sistema solo-planta intacto com os das plantas inteiras e

raízes destacadas retiradas do solo.

Foram observadas diferenças mais acentuadas entre o sistema intacto (1ª fase de incubação) e nódulos de raízes destacadas e plantas inteiras lavadas na 2ª fase de incubação. Menores diferenças foram encontradas entre o sistema solo-planta intacto e plantas inteiras não lavadas, e entre sistema intacto e raízes destacadas, mas não lavadas. Fishbeck et al. (1975) acharam em Glycine max que a atividade da N₂-ase de nódulos do sistema intacto foi significativamente maior do que a da planta inteira destacada do solo.

A similaridade da atividade da N₂-ase dos nódulos em raiz destacada e planta inteira, ambas não lavadas na 2ª fase de incubação, para a cultivar IRI.1022, confirma outra vez que a atividade da N₂-ase nos nódulos, no período do ensaio (1 hora), não foi afetada pela presença da parte aérea desta cultivar.

Os resultados deste ensaio mostram a viabilidade de usar nódulos em raiz sem lavagem e sem a parte aérea da planta para avaliação da atividade da N₂-ase, pois também foi o que apresentou menor coeficiente de variação entre as suas repetições (40%, contra 65% da planta inteira não lavada).

4.2. Resistência das estirpes de Rhizobium sp. à estreptomicina.

A obtenção de estirpes resistentes à estreptomicina teve em mira o uso delas na identificação de nódulos do experimento de competição de estirpes de Rhizobium sp. (item 4.3), separando os nódulos provenientes das estirpes inoculadas (resistentes) daquelas devidos às estirpes de solo (não resistentes).

4.2.1. Crescimento de estirpes resistentes em meio de cultura, com e sem estreptomicina.

A estabilidade da resistência das mutantes selecionadas à concentração de 150 µg de estreptomicina/ml de meio de cultura pode ser vista no Quadro 5. Não foi observada diferença no número de colônias de ambas as estirpes nos meios com e sem antibiótico. Como as culturas foram repicadas anteriormente para meio sem estreptomicina e aí cresceram, os resultados indicam estabilidade na característica da resistência à estreptomicina.

4.2.2. Efeito das estirpes resistentes à estreptomicina na nodulação, no desenvolvimento e na eficiência de fixação de N_2 , em S. guyanensis.

Este experimento foi efetuado para observar se a mutação para resistência à estreptomicina modificava o comportamento em relação à nodulação e à eficiência da simbiose com o S. guyanensis.

Foi observada diferença ($P < 0,01$) entre cultivares no peso seco e na atividade da N_2 -ase, e também foi achada diferença significativa ($P < 0,01$) entre estirpes para a interação no número e peso seco de nódulos e na atividade da N_2 -ase (Quadro 6).

A cultivar Schofield produziu mais tecido nodular e teve maior atividade da N_2 -ase do que a cultivar IRI.1022. Interessante notar que, no presente experimento, a mutação para a resistência à estreptomicina não diminuiu a capacidade de nodulação e fixação de N_2 , pelo contrário, a incentivou, na cultivar IRI.1022.

A interação cultivar x estirpe observada na nodulação e na atividade da N_2 -ase mostra que não houve diferenças significativas entre as estirpes efetivas (original e resistente) na cultivar Schofield, bem como entre as estirpes inefetivas (Quadro 6). Entretanto, na cultivar IRI.1022, os efeitos da estirpe inefetiva só se manifestaram no número de nódulos, com diferenças significativas ($P < 0,01$) a favor da estirpe inefetiva original. Nenhuma atividade da N_2 -ase foi detectada nos

nódulos destas estirpes inefetivas, em ambas as cultivares, apesar do grande número de nódulos apresentados, todos eram inefetivos, confirmando a sua total inefetividade em relação à fixação de N_2 . A diferença significativa entre a estirpe original BR-11 e a mutante resistente da estirpe inefetiva BR-11r no número de nódulos da cultivar IRI.1022 em favor da estirpe sensível, apesar de o experimento ter sido feito em vermiculita representa evidência adicional mais específica da possibilidade da inclusão de organismos produtores de estreptomicina com estirpes efetivas resistentes, compor inoculante para a cultivar IRI.1022.

A estirpe efetiva resistente à estreptomicina produziu maior número de nódulos, peso seco de nódulos e atividade de N_2 -ase do que a estirpe efetiva original para a cultivar IRI.1022 (Quadro 6). Com exceção do trabalho de Abdel-Wahab et al. (1973) com R. trifolii, nenhum aumento da nodulação ou efetividade foi registrado que possa ser atribuído à resistência à estreptomicina (Schwinghamer 1962, 1964, 1967, 1971; Levin & Montgomery 1973). Franco (1974), trabalhando com culturas provenientes das mesmas estirpes deste experimento, também não encontrou diferenças na nodulação e na efetividade, entre as estirpes originais e as resistentes à estreptomicina (50 μ g estreptomicina/ml meio). Este mesmo autor, porém, com outra estirpe, a BR-1ae, resistente à estreptomicina, achou que esta estirpe foi menos eficiente do que a original BR-1ca, quando inoculada em Stylosanthes guyanensis cv. IRI.1022.

Nenhuma diferença foi encontrada no desenvolvimento da planta entre estirpe original e mutante resistente para ambas as estirpes, inefetiva e efetiva, na cultivar Schofield. Porém, a cultivar IRI.1022 inoculada com estirpe efetiva resistente produziu mais 300% de matéria seca e N total do que a estirpe efetiva original, mostrando os reflexos das diferenças encontradas no aumento da fixação de N₂ proporcionado pela mutante efetiva resistente à estreptomicina (Quadro 7).

4.2.3. Resistência natural à estreptomicina na população autóctone de *Rhizobium* do solo.

Entre os isolamentos de 200 nódulos, sendo 100 da cultivar IRI.1022 e 100 da cultivar Schofield, ambas colhidas no campo, nenhuma estirpe de Rhizobium resistente à estreptomicina (150 µg/ml) foi encontrada, indicando tal fato que a população nativa de Rhizobium do solo, específica para estas leguminosas, é sensível à estreptomicina.

4.3. Competição de estirpes de Rhizobium sp. inoculadas e as nativas do solo, na nodulação de S. guyanensis.

4.3.1. Nodulação

Os resultados referentes à nodulação e sua análise são encontrados no Quadro 8.

4.3.1.1. Número e peso seco total dos nódulos.

Inicialmente será feita uma avaliação da nodulação total, incluindo os nódulos produzidos pelas estirpes inoculadas e pela população autóctone do solo.

Foram registradas diferenças significativas entre idades e cultivares; a interação idade x cultivar, para o número e o peso seco total de nódulos, também foi significativa.

O início da nodulação só foi observado após 10 dias de idade. Houve aumento progressivo do número e peso dos nódulos com a idade da planta, porém, as diferenças só foram significativas a partir dos 40 dias de idade. Foi também nesta coleta que, pela primeira vez, foi observada alguma atividade da N_2 -ase.

A cultivar Schofield produziu mais 3 e 21% de número e peso de nódulos, respectivamente, mostrando maior capacidade genética daquela para nodulação. Estes resultados confirmam os do experimento anterior.

Nenhum efeito das estirpes e suas possíveis

interações foi encontrado neste experimento para o número de nódulos, e isto poderia ser explicado: (1) pelo tempo do atraso para nodulação em S. guyanensis, ou (2) pela competição da população nativa, suficiente para colonizar as raízes e anular qualquer efeito da inoculação quanto ao número e peso de nódulos. Franco (1974) observou que a população máxima foi atingida com 8 dias após a inoculação, na superfície da raiz da cultivar IRI.1022, e o número de nódulos pode se ser aumentado pelo aumento da concentração de bactérias como mostrado em trevo por Purchase & Nutman (1957).

A interação idade x cultivar (Quadro 9) mostra que, apesar das diferenças significativas registradas para a cultivar Schofield no número de nódulos aos 20 dias e no peso seco de nódulos aos 50 dias, foi observada recuperação na nodulação da cultivar IRI.1022 que, aos 70 dias, rendeu significativamente maior número de nódulos. Houve ainda uma tendência, embora não significativa, de esta cultivar produzir maior peso de nódulos/dia do que a cultivar Schofield. Parece que o problema do mau estabelecimento relacionado com a cultivar IRI.1022 (Souto & Lucas 1972) é mais acentuado na fase inicial de crescimento da planta, e estreitamente ligado ao problema de nodulação; isto será verdade, se for admitido que não foi o tamanho do vaso que limitou o aumento de nodulação da cultivar Schofield até a última coleta aos 70 dias de idade.

4.3.1.2. Percentagem de nódulos devidos às estirpes inoculadas.

Foram discutidos, até o momento, os aspectos relativos à nodulação das plantas inoculadas, contudo, sem a preocupação com a contribuição individual, na nodulação, das estirpes inoculadas (BR-11r-inefetiva, BR-23r-efetiva), quando em competição com as estirpes do solo. As estirpes usadas no inoculante eram resistentes à estreptomomicina e, desta maneira, tornou-se possível distinguir os nódulos produzidos pelas estirpes inoculadas dos produzidos pela população autóctone.

Foram observadas diferenças altamente significativas entre idades, cultivares e estirpes; todas as interações foram também altamente significativas. A interpretação estatística dos efeitos simples mostrou que, com a idade, houve decréscimo na de nódulos devidos as estirpes inoculadas. A cultivar Schofield nodulou em média 54% mais com as estirpes inoculadas do que a cultivar IRI.1022. A resistência da cultivar IRI.1022 à nodulação, mesmo com estirpes homólogas, já havia sido observada por Souto et al. (1972). T'Mannetje (1969), em estudo de seleção de estirpes para as espécies e variedades do gênero Stylosanthes, considerou a variedade Schofield (S. guyanensis CPI 5630) como de natureza promíscua, tal não acontecendo com a variedade denominada "Oxley" (S. guyanensis CPI 11493), tida como de alta especificidade em relação ao Rhizobium. Entre as estirpes inoculadas, a

estirpe afetiva BR-23r nodulou 31% a mais do que a estirpe inefetiva BR-11r. Franco (1974), em meio de cultura agarizado, achou que a estirpe inefetiva dominou a efetiva na nodulação de S. guyanensis cv. IRI.1022. Robinson (1969), em condições controladas (meio agarizado), numa mistura em diferentes proporções de estirpes de R. trifolium, efetivas e inefetivas, inoculadas em Trifolium subterraneum, achou que em todos os casos as estirpes efetivas formaram mais nódulos do que as inefetivas, mesmo quando o número de células de Rhizobium na mistura fosse maior para a inefetiva, e postulou que hospedeira distingue, entre estirpes efetivas e inefetivas. Entretanto, Marques Pinto et al. (1974) e Labandera & Vincent (1975) demonstraram que a competitividade de uma estirpe não é necessariamente relacionada com a sua efetividade.

A cultivar Schofield nodulou mais com a estirpe inoculada efetiva BR-23r, e no caso da cultivar IRI.1022, houve diferença na nodulação com idade entre estirpes inoculadas, mostrando que nos 40 dias de idade a estirpe inefetiva BR-11r foi mais competitiva para a nodulação com as estirpes do solo do que estirpe efetiva, e que o contrário foi observado aos 70 dias de idade (Quadro 8 e 10). A estirpe BR-23r é tida como uma das mais efetivas para algumas cultivares de Stylosanthes guyanensis, que apresentam maior dificuldade de nodulação (Franco, comunicação pessoal). No experimento anterior (Quadro 6) esta estirpe teve aumentada a sua capacidade para nodulação, na cultivar IRI.1022, pela mutação para resistência à

estreptomomicina. Apesar disso, ela apresentou poder competitivo igual ao das estirpes do solo, mesmo que essas estirpes tivessem inicialmente uma desvantagem numérica. Uma avaliação da população nativa de Rhizobium pelo "plant dilution test" (Vincent 1970) mostrou ser mais numerosa (1400-9464 Rhizobium/g de solo) para a cultivar Schofield do que para a cultivar IRI.1022 (90-958 Rhizobium/g de solo), ambas com a probabilidade estatística de 5%.

A proporção de nódulos produzidos por estirpes numa dada mistura não é necessariamente relacionada com a sua proporção no inoculante (Vincent Waters 1953, Johnson & Means 1954, Holland 1970, Marques Pinto et al. 1971). Além disso, Curnow (1971) obteve grande recuperação das estirpes de R. trifolii inoculadas em trevo crescendo no solo, com população inicial de Rhizobium baixa. Entretanto, o número de R. trifolii inoculado declinou com o tempo, tendo algumas estirpes persistido melhor do que outras. A persistência das estirpes inoculadas foi menor quando a população inicial de Rhizobium do solo foi grande.

A análise da regressão idade x % de nódulos devidos às estirpes inoculadas das diferentes combinações entre cultivares e estirpes (Fig. 4) mostra que, com o aumento da idade, a proporção de nódulos produzidos pelas estirpes do inoculante diminuiu na cultivar IRI.1022, mais acentuadamente para a estirpe inefetiva enquanto o contrário foi observado para a cultivar Schofield, em que a estirpe efetiva BR-23r dominou quase completamente as estirpes do solo, além de ser significativamente mais

competitiva para nodulação do que a estirpe inefetiva BR-11r em relação às estirpes do solo, com o decorrer do tempo.

É oportuno frisar que, se a coleta do presente experimento fosse encerrada aos 40 dias de idade, no caso da cultivar IRI.1022 (Quadro 10) a conclusão seria diferente da que foi alcançada por Robison (1969) com Trifolium subterraneum em condições controladas, ou seja, a competitividade segundo este autor é correlacionada com a efetividade. Os resultados do presente experimento demonstram que aos 40 dias a competitividade foi maior com estirpe inefetiva na cultivar IRI.1022, concordando com Franco (1974), quando fez competirem em condições controladas em meio agarizado, diferentes misturas de estirpes efetivas com inefetivas, na cultivar IRI.1022. As conclusões seriam inversas se a coleta deste experimento fosse feita somente aos 70 dias de idade. Os resultados obtidos mostram a complexidade do problema. Como a 1ª coleta só foi feita aos 40 dias e só desde então é que houve um decréscimo da % de nódulos produzidos pela estirpe inefetiva, há concordância com os resultados de Franco (1974) indicando que esta estirpe tem grande afinidade com esta cultivar. A diminuição relativa da nodulação com a idade poderia ser atribuída a dois fatores; aumento da população autóctone na presença da planta ou decréscimo da estirpe inoculada nas condições de solo. Também foi observado por Insrie (1973-1974) que não houve correlação entre a nodulação em meio agarizado e em vários solos.

4.3.1.3. Número de nódulos devidos as estirpes inoculadas.

Com os dados anteriores, relativos à % de nódulos devidos às estirpes inoculadas, pode-se então calcular do número total de nódulos o número de nódulos devidos a cada estirpe (BR-11r, BR-23r ou as estirpes do solo). Foram encontrados resultados altamente significativos para todas as observações. A análise estatística dos efeitos simples, para idade, cultivar e estirpes, mostrou que houve aumento progressivo do número de nódulos devidos às estirpes, com o aumento da idade. A cultivar Schofield produziu em média 54% a mais de nódulos do que a cultivar IRI.1022 para todas as idades. As estirpes do solo, em competição com as inoculadas, produziram maior número de nódulos do que as estirpes inoculadas, e entre estas, a efetiva produziu mais nódulos do que a inefetiva, sendo que, na inoculação, as concentrações delas, inefetivas e efetivas, foram idênticas (2×10^9 células/ml).

O comportamento de cada estirpe em relação às cultivares nas diferentes idades (Quadro 8 e 10) indicou que as estirpes do solo nodularam similarmente ambas as cultivares, enquanto a estirpe efetiva BR-23r foi que nodulou melhor a cultivar Schofield, ao passo que a estirpe inefetiva BR-11r só evidenciou diferenças na nodulação a favor da cultivar Schofield, aos 70 dias de idade.

Nenhuma diferença foi observada no número de nódulos entre as estirpes para a cv. Schofield, independente das idades, porei, a partir dos 50 dias, as estirpes do

solo dominaram a nodulação da cv. IRI.1022 (Quadro 8 e 10). Isto confirma a maior afinidade genética para nodulação da cultivar IRI.1022 com as estirpes do solo (Souto et al. 1972).

A regressão entre idade x número de nódulos devidos às estirpes, para as diferentes combinações entre as cultivares e estirpes (Fig. 5), mostra que a estirpe que não teve a sua nodulação aumentada foi a inefetiva BR-11r para a cultivar IRI.1022, e isto é de real importância prática, pois ela não apresenta maior competitividade para nodulação com o aumento da idade, em relação às estirpes do solo, que foram efetivas para a cultivar IRI.1022, e o fato pode explicar, em parte, porque esta cultivar, após estabelecida, não apresenta problemas graves de desenvolvimento mesmo sem adição de N.

4.3.2. Desenvolvimento da planta e eficiência da simbiose.

Foram observadas diferenças entre idades, cultivares e interação idade x cultivar para matéria seca, nitrogênio total e atividade da N_2 -ase (Quadro 11).

O acréscimo da matéria seca e N total independente das cultivares, foi observado a partir dos 40 dias de idade, o que foi coincidente com o início da atividade da N_2 -ase que se deu entre os 30-40 dias de idade. Segundo Hardy & Holsten (1971), a fase inicial da atividade da N_2 -ase varia com as espécies; para Glycine max foi aos 20-30 dias, e

para Arachis hipogea aos 35 dias. O início da fixação de N₂ no presente experimento mostra também que as plantas, até esta idade, se supriram do N das sementes (N% = 5,50) e do N do solo (N = 0,06%), o que revelou pouca exigência na alimentação nitrogenada desta espécie, que crescia sem sintomas de deficiência de N até os 30 dias de idade, sem nenhuma aplicação de N mineral. A cultivar IRI.1022, que teve sua atividade da N₂-ase menor do que a Schofield, aos 40 e 50 dias, recuperou sua fixação de N₂, e na coleta aos 70 dias de idade ela ultrapassou a cultivar Schofield (Quadro 12). Esta última produziu em média mais 38 e 32% de matéria seca e N total do que IRI.1022, respectivamente, porém as diferenças de produção de matéria seca e N total entre as cultivares, dentro de cada idade, a favor da cultivar Schofield, tiveram tendência a decrescer a partir dos 30 dias de idade, mostrando, como foi observado anteriormente para nodulação, uma recuperação da cv. IRI.1022 com a idade.

A única diferença encontrada para o teor de N foi entre as idades; a % de nitrogênio, decrescendo com a idade, indicou que a alimentação nitrogenada das plantas em todo o experimento foi satisfatória.

O peso seco das sementes da cultivar Schofield foi 16% maior do que o da cultivar IRI.1022, e apesar de não significativo o ganho diário até os 30 dias de idade, houve tendência da cultivar Schofield produzir mais matéria seca do que a cultivar IRI.1022; esta tendência, porém, foi invertida a partir daquela idade, a favor da cv. IRI.1022,

e isto é mostrado nas diferenças entre os coeficientes de regressão (Quadro 12). Alguns trabalhos afirmam que o peso seco das sementes é correlacionado com o peso seco das plântulas na fase inicial de estabelecimento (Whiteman 1968, Ludlow & Wilson 1972). Excluindo problema principal do estabelecimento de algumas cultivares, que é relacionado com a sua simbiose, uma medida adequada para obter-se melhor crescimento inicial das cultivares de alfafa do Nordeste seria a seleção ou melhoramento das cultivares no sentido de produzirem sementes maiores. Resultados de experimentos realizados no Setor de Solos da EMBRAPA-RJ, ainda não publicados, mostraram que a área cotiledonar é uma importante superfície de fotossíntese no estabelecimento alfafa do Nordeste, podendo também ser fator limitante no seu estabelecimento.

5. CONCLUSÕES

- 1) A amostra do tipo "raiz não lavada" mostrou-se como o método mais adequado para avaliar a atividade da N_2 -ase das cultivares estudadas de *S. guyanensis*. Houve similaridade de atividade da N_2 -ase dos nódulos na raiz sem parte aérea e daqueles na raiz com parte aérea, na cultivar IRI.1022.
- 2) Foi obtida uma mutante de Rhizobium resistente à estreptomicina que foi significativamente mais eficiente do que a estirpe original.
- 3) A cultivar Schofield produziu maior número e peso de nódulos, maior atividade da N_2 -ase dos nódulos e mais matéria seca e N total do que a cultivar IRI.1022, sendo que esta vantagem foi mais pronunciada na fase inicial de estabelecimento e diminui com a idade da planta.
- 4) Comparando as duas estirpes usadas, a efetiva foi a mais competitiva em nodular as duas cultivares de *S. guyanensis*. A percentagem de nódulos formados pela estirpe inefetiva decresceu com a idade da planta.

6. RESUMO

Foram feitos vários experimentos em casa de vegetação, com a finalidade de estudar: 1) tipos de amostras (raiz, planta inteira e sistema intacto) com lavagem ou não com água, para avaliação do N_2 -ase; 2) mutação para resistência à estreptomicina em estirpe efetiva e inefetiva de Rhizobium, e 3) competição de estirpes do Rhizobium, inefetiva e efetiva, com a população nativa de um solo podzólico na nodulação, no desenvolvimento da planta e na eficiência de fixação de nitrogênio de duas cultivares de S. guyanensis.

A metodologia desenvolvida para estudar a atividade da N_2 -ase mostrou o efeito negativo da lavagem dos nódulos, na atividade da N_2 -ase destes. Os resultados indicaram ainda que, até 1 hora após a colheita, a determinação da atividade da N_2 -ase em nódulos ligados ao sistema radicular sem parte aérea ou em planta inteira deram resultados similares na cultivar IRI.1022.

Observaram-se diferenças significativas ($p < 0,01$) na nodulação, no desenvolvimento da planta e na eficiência de fixação de N_2 na cultivar IRI.1022, a favor da estirpe

de Rhizobium efetiva resistente à estreptomicina, quando comparada com a original.

Houve diferenças na nodulação e no desenvolvimento da planta entre as cultivares. A cultivar Schofield produziu maior número e peso de nódulos e mais matéria seca e N total do que a cv. IRI.1022, A cv. IRI.1022, que produziu menor número de nódulos no início de crescimento, teve recuperada a sua nodulação na maturidade.

A cultivar Schofield apresentou maior afinidade de nodulação com as estirpes inoculadas do que a cultivar IRI.1022. A estirpe efetiva nodulou mais a cv. Schofield ao passo que as estirpes do solo nodularam mais a cultivar IRI.1022. A estirpe inefetiva só apresentou maior nodulação do que as estirpes de Rhizobium do solo na fase inicial de crescimento da planta e decresceu posteriormente, mostrando desvantagem em relação à população nativa.

7. ABSTRACT

Several greenhouse experiments were carried out with two Stylosanthes guyanensis Aubl. cultivars to study:

(1) Sampling methods for best evaluation of N₂-ase activity from the nodules (roots, whole plant and intact system); with and without washings with water.

(2) Selection of streptomycin resistant mutants from effective and ineffective Rhizobium strains and;

(3) Competition between one effective and one ineffective Rhizobium sp. strain with the natural population in a red yellow podzolic soil, for nodulation, nitrogen fixation and plant growth of two S. guyanensis cultivars.

Washings of the nodules prior to acetylene incubation showed a decrease in the N₂-ase (C₂H₄) activity. Up to one hour after harvest, there was no difference in the N₂-ase (C₂H₄) activity in the cultivar IRI.1022, between nodules on roots with tops and nodules on roots detached from the tops. The combination of the streptomycin resistant strain and the cultivar IRI.1022 showed a significant increase (P < 0,01) in nodulation, nitrogen fixation and

plant growth in relation to the parent streptomycin sensitive strain.

The cultivar Schofield showed more plant dry weight and total nitrogen than the cultivar IRI.1022 ($P < 0,01$). The cultivar IRI.1022 showed less nodules than the cultivar Schofield at the early stage of establishment, but there was no difference later on.

The Schofield cultivar showed better performance with the Rhizobium strains used than the cultivar IRI.1022. The cultivar Schofield showed higher proportion of nodules produced by the effective strain used whilst the cultivar IRI.1022 showed a higher proportion of nodules produced by the strains from the soil.

The proportion of nodules produced by the ineffective strain was higher than the proportion produced by the native strains, at the earlier stage, but reversed with time indicating -poor establishment of the inoculated strain.

8. BIBLIOGRAFIAS CITADAS

- Abdel-Wahab, S.M., Rifaat, O.M. & Hamdi, Y.A. 1973. Characteristics of certain antibiotic-resistant mutants of Rhizobium trifolii strains. GIAM IV. São Paulo, Brasil. (In: Alves, 1975).
- Adegbola, A.A., Onayinka, B. 1966. Some observations on the responses of Stylosanthes gracilis to seed inoculation. Nigerian Agricultural Journal. 3:35-38.
- Allen, O.N., Allen, E.K. 1940. Response of the peanut plant to inoculation with Rhizobium, with special reference to morphological development of the nodules. Bot. Gaz., 102:121-142.
- Alves, M. de F. 1975. Mutantes de Rhizobium japonicum (Kirchner) Buchanan, resistentes à estreptomicina e sua infecciosidade. Tese Mestrado Escola Superior de Agricultura "Luís de Queiroz", da Universidade de São Paulo. Piracicaba, São Paulo.

- Balassa, G. 1963. Genetic transformation of Rhizobium.
Bac. Rev. 27:223-241.
- Balassa, R. 1960. Transformation of strain of Rhizobium lupini. Nature. 188:246-247.
- Bergersen, F.J., Goodchild, D.J. 1973. Aeration pathways in soybean root nodules. Aust. J. Biol. Sci., 26:729-40.
- Bergersen, F.J., Turner, G.L. 1975. Leghaemoglobin and the supply of O₂ to nitrogen fixing root nodule bacteroides: Studies of an experimental systems with no gas phase. J. Gen. Microbiol. 89:31-47.
- Bergersen, F.J., Turner, G.L., Applepy, C.A. 1973. Studies the physiological role of leghaemoglobin in soybean root nodules. Biochimica et Biophysica Acta. 292(1):271-282.
- Bliss, C.I. 1937. Analysis of field experimental data expressed in percentages. Plant Protection 12:67-77.
- Bond, G. 1950. Ann. Bot. (Lond.) 15,95. In: Gibson 1975.
- Brockwell, J., Gault., R.R. Schwinghamer, B.A. 1971. Streptomycin resistance as a tool for ecological studies of Rhizobium trifolium. Proceeding of the Fourth Australian Legume Nodulation Conference. Canberra. Australia. Paper 31.

- Bryan, W.W. 1961. Lotononis bainesii Baker a legume for a subtropical pastures., Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb. 1:3-10.
- Buller, R.E., Aronovich, S., Quinn, L.R., Bisshoff, W.V.A. 1970. Performance of tropical legumes in the upland savannah of Central-Brazil. Proc. XI Int. Grassld. Conf. 143-146.
- Bushnell, O.A., Sarles, W.B. 1939. Investigations upon the Antigenic Relationships among root-nodule bacteria of the soybean and lupine cross-Inoculation Group. J. Bacterial 38:401-410.
- Caldwell, B.E. 1969. Initial competition of root-nodule bacteria on soybeans in a field environment. Agron. J. 61: 813-815.
- Chatel, D.L., Greenwood, R.M., Packer, C.A. 1968. Saprophytic competente as an important character in the selection of Rhizobium for inoculation. Trans. 9th. Int. Cong. Soil Sci. Adelaide-Australia. 2:65-73.
- Chandapillai, M.M. 1972. Studies on the nodulation of Stylosanthes guyanensis Aubl. I. Effect of added organic matter in four types of Malaysian soil. Trop. Agric. (Trinidad) 49(3):205-213.

- Cloonan, M.J. 1963. Black nodules on Dolichos. Austr. J. Sci. 26:121.
- Cloonan, M.J. & Vincent, J.M. 1967. The nodulation of annual summer legumes sown in the for North coast of New South Wales. Aust. J. Exp. Agric. An. Husb. 7:181-189.
- Curnow, B.C., 1971. Ecological studies of Rhizobium spp. in Victoria. Proc. of the Fourth Aust. Leg. Nod. Conference - Canberra - Australia. Paper 26.
- Damirgi, S.M., Frederick, L.R., Anderson, I.C. 1967. Sero groups of Rhizobium japonicum in soybean nodules as affected by soil types. Agron. J. 59:10-12.
- Dart, P.J. 1975. The infection Process. Biological Nitrogen Fixation. Edited by A. Quispel for North-Holland Publishing Co. Chapter 11.1:381-429.
- Dart, P.J., Day, J.M., Harris, D. 1972. Assay of nitrogenase activity by acetylene reduction. Proc. Use of isotopes for study of fertilizer utilization by legume crops. Vienna. 85.100.
- Date, R.A. 1972-1973. Rhizobium ecology. Annual Report Division of Tropical Agronomy. CSIRO. Australia. pp.57.

- Date, R.A., Norris, D.O. 1972-1973. Strain testing in the glasshouse. Annual Report. Division of Tropical Agronomy. C.S.I.R.O. Australia. pp.54.
- De-Polli, H., Vargas, M.A.T., Franco, A.A., Döbereiner, J. 1973. Efeitos da inundação na nodulação e desenvolvimento de leguminosas forrageiras tropicais. *Pesq. Agropec. Bras., Ser. Zootec.*, 8:27-34.
- Döbereiner, J. 1964. Black nodules on Centrosema pubescens. *Soil Biol. Intern. News Bull.* 2:33.
- Döbereiner, J. 1970. Inoculação cruzada e eficiência na simbiose de leguminosas tropicais. Anais do Seminário sobre Metodologia e Planejamento de Pesquisa com Leguminosas Tropicais. IPEACS. Km 47. Itaguaí. Rio de Janeiro. 181-192.
- Dudman, W.F., Brockwell, J. 1968. Ecological studies of root-nodule bacteria introduced into field environments. I. A survey of field performance of clover inoculants by gel immune diffusion serology. *Aust. J. Agric. Res.*, 19:739-47.
- Fishhook, K., Evans, H.J., Boersma, L.L. 1973. Measurement of nitrogenase activity of intact legume symbionts in situ using the acetylene reduction assay. *Agron. J.* 65:429-432.

- Franco, A.A. 1974. Competition amongst rhizobial strains for the colonization and nodulation of two tropical legumes. M. Sc. thesis - School of Microbiology University of New South Wales - Australia. 183 p.
- Franco, A.A., Maranhão, J.I.M., Döbereiner, J. 1970. Influência do revestimento das sementes no estabelecimento da nodulação de Centrosema pubescens Benth. em solo ácido com toxidez de Mn. Anais V Reun. Lat. Amer. de Rhizobium. Rio do Janeiro. 292-302.
- Francis, A.J.A. 1971. A comparison of effective and ineffective associations in the Rhizobium-legume symbiosis. Dissertation Abstracts International, B. 32(1):449.
- Fred, E.B. & Walksman, S. 1928. Laboratory manual of general microbiology. McGraw-Hill Book Co. Inc., New York.
- Galli, P. 1958. Inoculações cruzadas com bactérias dos nódulos de leguminosas tropicais. Rev. Agric., Piracicaba, 33(3):139-150.
- Gibson, A.H. 1975. "Limitations to dinitrogen fixation by legumen". In Symposium on Dinitrogen Fixation, W.E. Newton and C.J. Nyman editors. Washington State University Press, Pullman, Washington (In press).

- Gollobin, G.S., Levin, R.A. 1973. Streptomycin resistance in Rhizobium japonicum. Proc. of the Fourth North American Rhizobium (Ohio).
- Ham, G.E. 1967. Serogroups of Rhizobium japonicum in soybean nodules under various soil conditions, previous crops and host varieties. Ph. D. Thesis. Iowa State Univ. of Science and Technology.
- Ham, G.E., Frederick, L.R., Anderson, I.C. 1971. Serogroups of Rhizobium japonicum in soybean nodules. Sampled in Iowa Agron. J. 63:69-72.
- Hardy, R.W.F., Burns, R.C., Holsten, R.D. 1973. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. Soil Biol. Biochem. 5:47-81.
- Hardy, R.W.F. & Havelka, U.D. 1973. Overcoming the nitrogen input barrier in soybean. Proc. of the Fourth North American Rhizobium (Abstract). pp. 7.
- Hardy, R.W.F. & Holsten, R.D. 1971. N₂ fixation by annual symbionts: C₂H₂ - C₂H₄ assay methodology, growth cycle profiles, varietal and N-fertilizer effects. Proc. Fourth Aust, Leg. Nodulation - Canberra, Australia, pp.34.

- Hardy, R.W.F., Holsten, R.D., Jackson, E.K., Burns, R.C. 1968. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixations laboratory and field evaluation. *Pl. Physiol.* 43:1185-1207.
- Hely, F.W., Bergensen, F.J., Brockwell, J. 1957. Microbial antagonism in the rhizosphere as a factor in the failure of inoculation of subterranean clover. *Aust. J. Agric. Res.* 8:24-44.
- Nigashi, S. 1967. Transfer of clover infectivity of Rhizobium trifolii to Rhizobium phaseoli as mediated by an episomic factor. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 13:391-403.
- Holland, A.A., 1970. Competition between soil and seed-borne Rhizobium trifolii in nodulation of introduced Trifolium subterraneum. *Plant and Soil.* 32:293.
- Horrell, C.R., Court, M.N. 1965. Effect of the legume Stylosanthes gracilis on pasture yields at Serere, Uganda. *Journal of the British Grassland Society.* 20:72-76.
- Hughes, D.Q., Vincent, J.M. 1942. Serological studies of the root-nodule bacteria. *Proc. of the Linnean Soc. New South-Wales.* Vol. lxxvii, parts 3-4:142-152.

- Hymowitz, T. 1971. Collection and evaluation of tropical and subtropical Brazilian forage legumes. Trop. Agric. (Trinidad). 48(4):309-314.
- Imrie, B.O. (1973-1974). Breeding methods research. Desmodium. C.S.I.R.O. Division of Tropical Agronomy. Annual. Report. pp.74.
- Jansen van Rensburg, H., Strijdom, B.W. 1969. Phytophylactica 1:201. In: Dart 1975.
- Jenkins, H.V., Vincent, J.M. Waters, L.M. 1954. The root-nodule bacteria as factors in clover establishment in the red basaltic soils of the Lismore district, New South Wales. 3-Field inoculation trials. Aust. J. Agric. Res. 5:77-89.
- Jensen, H.L. 1942. Nitrogen fixation in leguminous plants. I-General characters of root-nodule bacteria isolated from species of Medicago and Trifolium in Australia. Proc. Linn. Soc. N.S.W. 66:98-108.
- Johnson, H.W., Means, U.M. 1964. Selection of competitive strains of soybean nodulating bacteria. Agron. J. 56:60-62.

- Jones, D.G., Russell, P.E. 1972. Thy application of immunofluorescence techniques to host plant/nodule bacteria selectivity experiments using Trifolium repens. Soil Biol. Biochem. 4:227-282.
- Jordan, D.C. 1952. Studies on the legume root nodule bacteria. II - The production and behavior of colonial mutants produced by X-ray irradiation. Can. Jour. Bot. 30:125-130.
- Kleczkowska, J. 1950. A study of phage resistant mutants of Rhizobium trifolii. J. Gen. Microbiol. 4:298-310.
- Kleczkowska, J. 1957. A study of the distribution and the effects of bacteriophage of root nodule bacteria in the soil. Can J. Microbiol. 3:171-180.
- Krasilnikov, N.A. 1945. Induction of new virulence properties in nodule bacteria. Mikrobiologiya. 14:230. In: Dart 1975.
- Krasilnikov, N.A. 1958. Soil organisms and higher plants. English translation from Russian, National Science Foundation, Washington, 1961. In: Dart 1975.
- Krasilnikov, N.A. & Melkumova, T.A. 1963. Isv. Akad Namk S.S.S.R. Ser. Biol. 5:693. In: Dart 1975.

- Huo, T., Boersma, L. 1971. Soil water suction and root temperatures effects on nitrogen fixation in soybeans. *Agron. J.* 63:901-904.
- Labandera, C.A. & Vincent, J.M. 1975. Competition between an introduced and native Uruguayan strains of Rhizobium trifolii. *Plant and Soil* 42:327-347.
- Levin, R.A., Montgomery, M.P. 1973. Symbiotic effectiveness of antibiotic-resistant mutants of Rhizobium japonicum. *Abst. An. Meet Amer. Soc. Microbiol.* 73,15.
- Ljunggren, H. 1961. Transfer of virulence in Rhizobium trifolii. *Nature.* 191:263.
- Ljunggren, H. 1969. *Physiol. Plantarum Supplement* 5. In: Dart 1975.
- Lopes, E.S., Lovadini, L.A.C., Gergantini, H., Miyasaka, S., Leon, J.C.C. 1970. Avaliação da fixação do nitrogênio atmosférico em soja perene e siratro por Rhizobium autóctone de dois grandes grupos de solos. *Anais V Reun. Lat. Amer. de Rhizobium.* Rio de Janeiro. 266-274.
- Loveday, J. 1963. Influence of oxygen diffusion rate on nodulation of subterranean clover. *Aust. J. Sci.* 26:90. In: Gibson 1975.

- Ludlow, M.M., Wilson, G.L. 1972. Relationships between seed and seedling dry weight of tropical pasture grasses and legumes. *J. Aust. Inst. Agric. Sci.* 38(1):65-67.
- Mague, T.H., Burris, R.H. 1972. Reduction of acetylene and nitrogen by field-grown soybeans. *New Phytol* 71:275.
- Mareckhova, H. 1970. *Zentr. Bakteriolog. Parisenk. Abt. II*, 125-594. In: Dart 1975.
- Marques Pinto, C.A.R., Yao, P.Y., Vincent, J.M. 1971. Competition between strains of Rhizobium for nodule formation. Proc. of the Fourth Australian Legume Nodulation - Canberra, Australia.
- Marques Pinto, C.A.R., Yao, P.Y., Vincent, J. 1974. Nodulating competitiveness amongst strains of Rhizobium meliloti and R. trifolii. *Aust. J. Agric. Res.* 25:317-329.
- Means, U.M., Johnson, H.W., Erdman, L.W. 1961. Competition between strains effecting nodulating in soybeans. *Soil Sci. Society Proceedings.* 25:105-108.
- Modi, V.V. 1973. Genetic transformation of Rhizobium. Nitrogen fixation and the biosphere. *International Biological Programme.* pp.64.

- Nicol, H., Thornton, H.G. 1941. Competition between related strains of nodule bacteria and its influence on infection of the legume host. Proc. Roy. Soc. Ser. B., 130:32-59.
- Norris, D.O. 1965. Rhizobium relationships in legumes. An. IX Congr. Int. Pastagens, São Paulo, 2:1087-1092.
- Norris, D.O. 1967. The intelligent use of inoculants and lime pelleting for tropical legumes. Trop. Grassld., 1:107-121.
- Norris, D.O. 1970. The contribution of research in legume bacteriology to the development of Australian pastures. Proc. XI Int. Grassld. Cong. A - 22 - A - 30.
- Obaton, M. 1971. Utilisation de mutants spontanés résistants aux antibiotiques pour l'étude écologique de Rhizobium. C. R. Acad. Sc. Paris, t.272; p.2630-2633.
- Purchase, H.F., Nutman, P.S. 1957. Studies on the physiology of nodule formation. VI The influence of bacterial numbers in the rhizosphere on nodule initiation. Annals of Botany, N.S. Vol. XXI, n° 83.
- Robinson, A.C. 1969. Competition between effective and ineffective strains of Rhizobium trifolii in the nodulation of Trifolium subterraneum L. Aust. J. Agric. Res. 20:827-41.

- Robinson, A.C. 1969a. Host selection for effective Rhizobium trifolii by red clover and subterranean clover in the field. Aust. J. Agric. Res., 20:1053-60.
- Savory, R.M., Thomas, D. 1971. Pasture handbook for Malawi. Bunda College of Agriculture, University of Malawi. 121 pp.
- Schwinghamer, E.A. 1962. Studies on induced variation in the rhizobia. III. Host range modification of Rhizobium trifolii by spontaneous and radiation-induced mutation. An. J. of Botany 49(3):269-277.
- Schwinghamer, E.A. 1964. Association between antibiotic resistance and ineffectiveness in mutant strains of Rhizobium spp. Can. J. Microb. 10(2):221-233.
- Schwinghamer, E.A. 1967. Effectiveness of Rhizobium as modified by mutation for resistance to antibiotics. Antonie van Leeuwenhoek 33(2):121-136.
- Schwinghamer, E.A. 1971. A model for possible strain improvement by mutation for nutritional independence. In Rhizobium. Fourth Australian Legume Nodulation Conference. Canberra. Australia. pp.22.

- Schwinghamer, E.A., Evans, H.J., Dawson, M.D. 1970. Evaluation of effectiveness in mutant strains of Rhizobium by acetylene reduction relative to other criteria of N₂ fixation. Pl. Soil 33(1):192-212.
- Skrdleta, V. 1969. Application of immunoprecipitation in agar gel for the serological typing of soybean root-nodules. Folia Microbiol., Praha. 14:32-35.
- Skrdleta, V., Karimov, J. 1969. Competition between two ' matic serotypes of Rhizobium japonicum used as double-strain inocula in varying proportions. Arch. Mikrobiol. 66,25-28.
- Skrdleta, V. 1970. Competition for nodule sites between two inoculum strains of Rhizobium japonicum as affected by delayed inoculation. Soil Biol. Biochem. 2:167-171.
- Sloger, C., Bezdicek, D., Milberg, R., Boonkerd 1973. Acetylene reduction studies in the field soybeans. Proc. of the Fourth North American. Rhizobium Conference (Abstracts) Columbus - Ohio pp.7.
- Souto, S.M. Cóser, A.C., Döbereiner, J. 1972. Especificidade de uma variedade nativa de alfafa do Nordeste (Stylosanthes gracilis) na simbiose com Rhizobium sp. Pesq. Agropec. Bras., Sér. Zootec. 7:1-5.

- Souto, S.M., Lucas, E.D. de 1972. Estabelecimento de leguminosas forrageiras tropicais. Pesq. Agropec. Bras., Sér. Zootec. 7:33-38.
- Souto, S.M., Monteiro, M. do C. da C. 1972. Índice de sementes de forrageiras. Bol. do SNAA/IPEACS/DNPEA-M.A. Série avulsa. 29 pp.
- Sprent, J.I. 1969. Prolonged reduction of acetylene by detached soybean nodules. Planta, 88:372.
- Sprent, J.I. 1971. The effect of water stress on nitrogen fixing root nodules I. Effects on the physiology of detached soybean nodules. New Phytol, 70:9-17.
- Sprent, J.I. 1972. The effects of water stress on nitrogen fixing root nodules II. Effects on the fine structure of detached soybean nodules. New Phytol. 71:443-450.
- Sprent, J.I. 1972a. The effects of water stress on nitrogen fixing root nodules. IV. Effects on whole plants of Vicia faba and Glycine max. New Phytol, 71-603-611.
- Sprent, J.I. Nitrogen fixation by legumes subjected to water and light stress. Nitrogen fixation and the biosphere. International Biological Programms 24-25.

- Sprent, J.I., Silvester, W.B. 1973. Nitrogen fixation by Lupinus, arboreus grown in the open and under different aged stands of Pinus radiata. *New Phytol*, 73:991.
- Staniewski, R. 1970. Typing of Rhizobium by phages. *Canadian J. Microbiology*. 16:1003-1009.
- Stonard, P. 1968. Pine-stem stylo a legume of promise. *Queensland Agric. J.* 478-484.
- Thomas, D. 1973. Nitrogen from tropical pasture legumes on the African continent. *Herbage Abstracts* 43(2):33-39.
- t'Mannetje, L. 1969. Rhizobium affinities and phenetic relationships within the genus Stylosanthes. *Austr. J. Bot.* 17-553-64.
- Trinick, M.J. 1968. *Exp. Agric.* 4:243. In: Norris 1970.
- Tuzimura, K., Watanabe, I. 1962. The growth of Rhizobium in the rhizosphere of the host plant. *Soil Sci. and Plant Nutrition*. 8(2):19-24.
- Vettori, L. 1969. Métodos de análise de solo. *Bol. Eq. Ped. Fert. Solo*. N° 7, 24 p.
- Vincent, J.M. 1954. The root-nodule bacteria of pasture legumes. *Proc. Linn. Soc. N.S.W.* 79:IV-XXXII.

- Vincent, J.M. 1970. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. I.P.B., Handbook n° 15, Oxford, Blackwell Scient. Publ.
- Vincent, J.M., Waters, L.M. 1953. The influence of host on competition amongst clover root-nodule bacteria. J. Gen. Microbiol. 9:357-370.
- Vincent, J.M., Waters, L.M. 1954. The root-nodule bacteria as factors in clover establishment in the red basaltic soils of the Lismore district, New South Wales. 2. Survival and success of inocula in laboratory trials. Aust. J. Agric. Res. 5:61-76.
- Weisblum, B., Davies, J. 1968. Antibiotic inhibitors of the bacterial ribosome. Bacteriological Reviews, Dec., 32(4): 493-528.
- Whiteman, P.C. 1968. The effect of temperature on the vegetative growth of six tropical legume pastures. Aust. J. Exp. Agr. and Anim. Husbandry 8(34):528-32.
- Whiteman, P.C. 1972. The effects inoculation and nitrogen application on seedling growth and nodulation of Glycine wightii and Phaseolus atropurpureus in the field. Trop. Grassld., 6(1):11-16.

Zelazna-Kowalska, I. 1971. Correlation between streptomycin resistance and infectiveness in Rhizobium trifolii. Plant and Soil, vol. Especial: 67-71. In: Alves 1975.

QUADRO 1. INFLUÊNCIA DA LAVAGEM DE RAÍZES COM NÓDULOS DE *Stylosanthes guyanensis* cv. SCHOFIELD E *Lotononis bainesii* cv. CPI.16833 NA ATIVIDADE DA N₂-ase (médias de 8 repetições)

FASE DE INCUBAÇÃO	TRATAMENTO	ATIVIDADE DA N ₂ -ase DE NÓDULOS (nmoles C ₂ H ₄ /planta/h)	
		STYLOSANTHES	LOTONONIS
1 ^a	LAVAGEM	1.123* (a)	11.904* (d)
2 ^a	RELAVAGEM	504 (a)	4.839 (d)
1 ^a	SEM LAVAGEM	1.330 (b)	10.349 (e)
2 ^a	SEM LAVAGEM	1.062 (b)	5.959 (e)
1 ^a	SEM LAVAGEM	2.310 (c)	12.256 (f)
2 ^a	LAVAGEM	673 (c)	6.843 (f)

(*)Valores com letras iguais são provenientes de mesmos pedaços de raízes contendo vários nódulos. Assim cada repetição na 1^a fase de incubação, em cada tratamento, foi a mesma usada na 2^a fase.

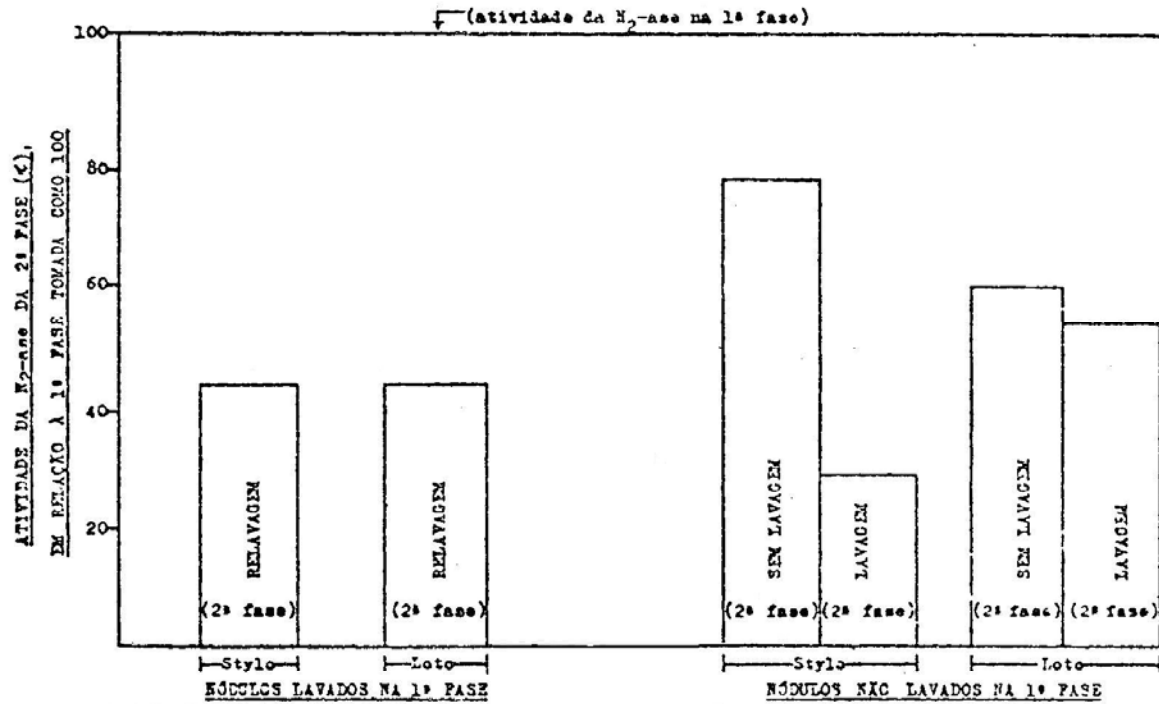


FIG.1. INFLUÊNCIA DA UMIDADE NA ATIVIDADE DA N_2 -ase DE NÓDULOS COM RAÍZ DE *Stylosanthes guyanensis* cv. Schofield E *Lotononis bainesii* cv. CPI 16.833).

Os dados para análise estatística foram transformados em arco. sen. \sqrt{D} .
As diferenças entre 1ª e 2ª fase de incubações foram altamente significativas.

CONTRASTES	Tukey	
	Stylo	Loto
LAVAGEM (1ª fase) - RELAVAGEM (2ª fase)	47,00**	51,00**
SEM LAVAGEM (1ª fase) - SEM LAVAGEM (2ª fase)	26,00**	40,00**
SEM LAVAGEM (1ª fase) - LAVAGEM (2ª fase)	67,00**	43,00**

QUADRO 2. INFLUENCIA DA LAVAGEM DA RAIZ COM NÓDULOS E DA PLANTA INTEIRA DE *Stylosanthes guyanensis* cv. IRI.1022, NA ATIVIDADE DA N₂-ase (médias de 6 repetições)

FASE DE INCUBAÇÃO	TRATAMENTO	ATIVIDADE DA NITROGENASE DE NÓDULOS (nmoles C ₂ H ₄ /planta/h)	
		RAIZ	PLANTA INTEIRA
1 ^a	LAVAGEM	154** (a)	25 (d)
2 ^a	ÚMIDO (*)	272 (a)	48 (d)
1 ^a	SEM LAVAGEM	172 (b)	119 (e)
2 ^a	SEM LAVAGEM	581 (b)	188 (e)
1 ^a	SEM LAVAGEM	174 (c)	145 (f)
2 ^a	LAVAGEM	67 (c)	44 (f)

(*) Umidade do ar mantida usando papel de filtro úmido.

(**) Valores com letras iguais são provenientes de mesmos pedaços de raízes ou de plantas contendo nódulos. Assim cada repetição na 1^a fase de incubação, em cada tratamento, foi a mesma usada na 2^a fase.

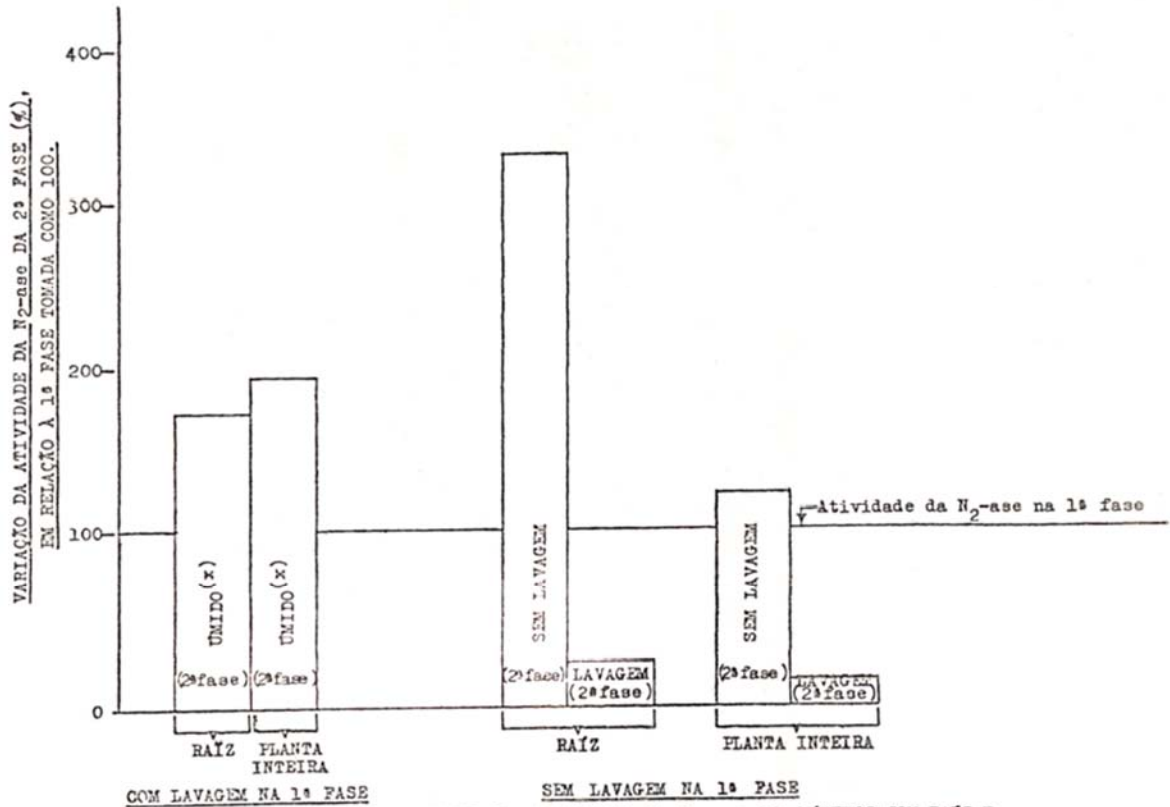


FIG.2. INFLUÊNCIA DA UMIDADE NA ATIVIDADE DA N_2 -ase DE NÓDULOS COM RAÍZ E COM PLANTA INTEIRA EM *Stylosanthes guyanensis* cv. IRI.1022.

(x) Umidade mantida usando papel de filtro úmido.

Os dados para análise estatística foram transformados em $\sqrt{n + 1}$

CONTRASTES	Tukey
RAÍZ x ÚMIDO (2ª fase) - RAÍZ x LAVAGEM (1ª fase)	3,30 ^{xx}
PLANTA INTEIRA x ÚMIDO (2ª fase) - PLANTA INTEIRA x LAVAGEM (1ª fase)	3,60 ^{xx}
RAÍZ x SEM LAVAGEM (1ª fase) - RAÍZ x LAVAGEM (2ª fase)	3,90 ^{xx}
RAÍZ x SEM LAVAGEM (2ª fase) - PLANTA INTEIRA x SEM LAVAGEM (2ª fase)	5,60 ^{xx}
RAÍZ x SEM LAVAGEM (2ª fase) - RAÍZ x SEM LAVAGEM (1ª fase)	8,20 ^{xx}
PLANTA INTEIRA x SEM LAVAGEM (2ª fase) - PLANTA INTEIRA x SEM LAVAGEM (1ª fase)	2,60 ^x

QUADRO 3. DIFERENÇAS ENTRE PLANTAS INTEIRAS E RAÍZES SEM PARTE AÉREA NA ATIVIDADE DA N₂-ase DOS NÓDULOS DE DUAS CULTIVARES DE S. guyanensis (médias de 8 repetições)

TRATAMENTO	ATIVIDADE DA N ₂ -ase DE NÓDULOS (nmoles C ₂ H ₄ /planta/h)	
	cv. Schofield	cv. IRI.1022
PLANTA INTEIRA	194	112
RAIZ	136	120

<u>CONTRASTE</u>	<u>TUKEY</u>
Planta inteira (Schofield) - Raiz (Schofield)	58,00
Planta inteira (IRI) - Raiz (IRI)	8,00

QUADRO 4. ATIVIDADE DA N₂-ase DE NÓDULOS EM SISTEMA INTACTO, EM RELAÇÃO À DA RAÍZ E PLANTA INTEIRA, SOB EFEITO DA UMIDADE (médias de 6 repetições)

FASE DE INCUBAÇÃO	TRATAMENTO	ATIVIDADE DA N ₂ -ase DOS NÓDULOS (nmoles C ₂ H ₄ /planta/h)
1 ^a	SISTEMA INTACTO	1.585* (a)
2 ^a	RAÍZ NÃO LAVADA	972 (a)
1 ^a	SISTEMA INTACTO (*)	1.590 (b)
2 ^a	RAÍZ LAVADA	286 (b)
1 ^a	SISTEMA INTACTO	1.086 (c)
2 ^a	PLANTA INTEIRA COM RAÍZ NÃO LAVADA	651 (c)
1 ^a	SISTEMA INTACTO	827 (d)
2 ^a	PLANTA INTEIRA COM RAÍZ LAVADA	143 (d)

(*) Valores com letras iguais são provenientes de mesmos pedaços de raízes, plantas inteiras com raízes e de sistemas solo com plantas contendo nódulos. Assim cada repetição na 1^a fase de incubação, em cada tratamento, foi a mesma usada na 2^a fase.

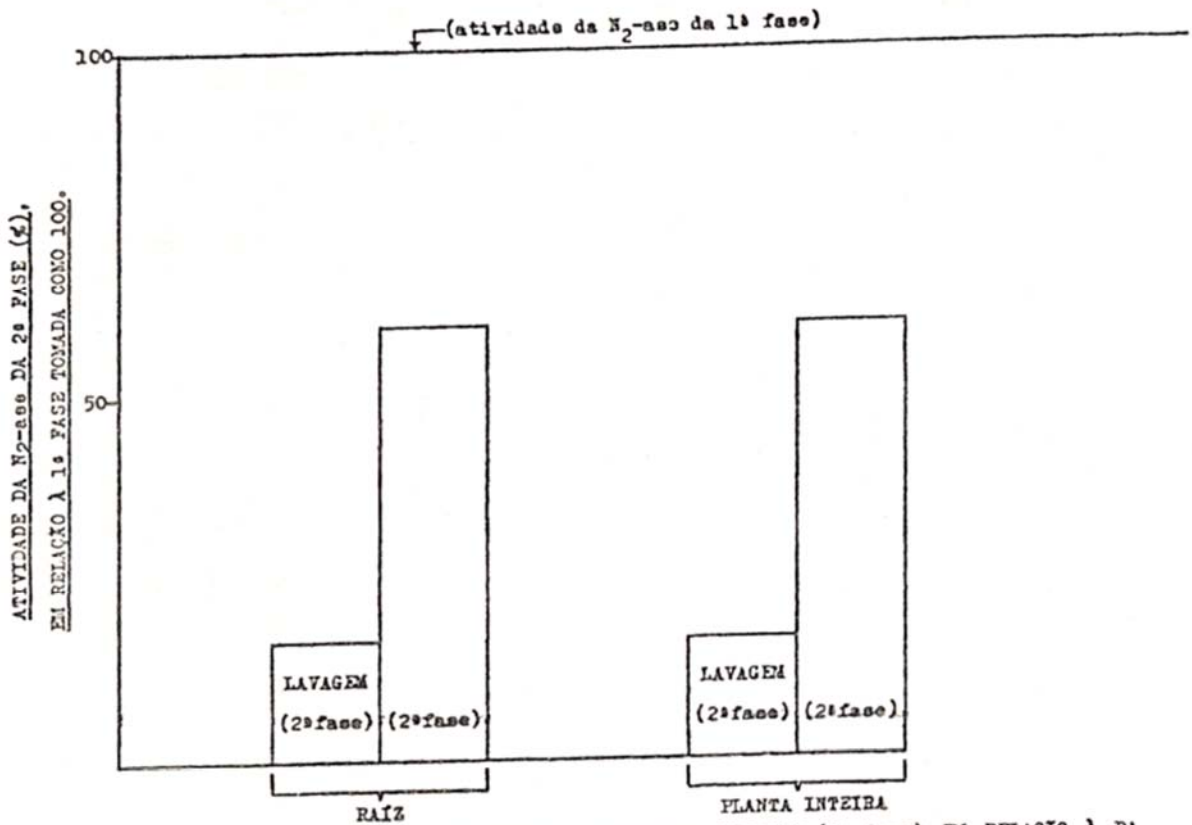


FIG.3. ATIVIDADE DA N_2 -ase DE NÓDULOS DO SISTEMA INTACTO (1ª fase) EM RELAÇÃO À DA RAÍZ E PLANTA INTEIRA, SOB EFEITO DA UMIDADE (2ª fase). ATIVIDADE DA N_2 -ase DOS NÓDULOS DO SISTEMA INTACTO (1ª FASE DE INCUBAÇÃO) TOMADA COMO 100.

Os dados para análise estatística foram transformados em arc. sen. \sqrt{n} .

CONTRASTES			Tukey
SISTEMA INTACTO (1ª fase) - RAÍZ	x LAVAGEM	(2ª fase)	66,00 ^{xx}
SISTEMA INTACTO (1ª fase) - PLANTA INTEIRA	x LAVAGEM	(2ª fase)	66,50 ^{xx}
SISTEMA INTACTO (1ª fase) - RAÍZ	x SEM LAVAGEM	(2ª fase)	39,00 ^{xx}
SISTEMA INTACTO (1ª fase) - PLANTA INTEIRA	x SEM LAVAGEM	(2ª fase)	40,00 ^{xx}
RAÍZ x SEM LAVAGEM	(2ª fase) - PLANTA INTEIRA	x SEM LAVAGEM	(2ª fase) 1,00

QUADRO 5. CRESCIMENTO DE ESTIRPES RESISTENTES NUM MEIO DE CULTURA 79, SEM E COM ESTREPTOMICINA(*) (médias de 6 repetições)

ESTIRPES DE <u>Rhizobium</u> sp.	ESTREPTOMICINA	NÚMERO DE <u>Rhizobium</u> /ml
BR-11r	0	18 x 10 ⁻⁷
(inefetiva)	150 µg/ml	15 x 10 ⁻⁷
BR-23r	0	29 x 10 ⁻⁷
(efetiva)	150 µg/ml	28 x 10 ⁻⁷

(*) Na análise estatística, os dados foram transformados em log.10ⁿ.

QUADRO 6. EFEITO DE ESTIRPES MUTANTES RESISTENTES À ESTREPTOMICINA NA MODULAÇÃO E FIXAÇÃO DE N_2 , EM DUAS CULTIVARES DE *Stylosanthes javanensis* (médias de 4 repetições)

ESTIRPES ^(a)	NÚMERO DE NÓDULOS/VASO ^(b)		PESO SECO DE NÓDULOS (mg/vaso)		ATIVIDADE DA N_2 -ase (nódulos C_2H_4 /planta/h)	
	Schofield	IRI.1022	Schofield	IRI.1022	Schofield	IRI.1022
BR-11	120	190	32	10	0	0
BR-11r	125	99	32	7	0	0
BR-23	192	69	51	12	2132	314
BR-23r	170	206	45	44	1746	2040

<u>Pontes de Variação</u>	<u>Número de nódulos</u> F	<u>Peso de nódulos</u> F	<u>Atividade da N_2-ase</u> F
CULTIVAR	1,67	60,25 ^{XX}	45,25 ^{XX}
ESTIRPE	9,73 ^{XX}	13,89 ^{XX}	35,65 ^{XX}
CULTIVAR x ESTIRPE	13,30 ^{XX}	7,69 ^{XX}	64,35 ^{XX}
C.V. %	10	24	13

Dobramento da interação

<u>CULTIVAR</u>	<u>CONTRASTE</u>	<u>NÚMERO DE NÓDULOS</u> F	<u>PESO SECO DE NÓDULOS</u> F	<u>ATIVIDADE DA N_2-ase</u> F
IRI	(BR-23r-IR-23)	44,00 ^{XX}	27,82 ^{XX}	97,93 ^{XX}
IRI	(BR-11r-IR-11)	14,66 ^{XX}	0,36	
IRI	(BR-23r+BR-23)-(BR-11r+IR-11)	0,03	20,65 ^{XX}	
Schofield	(BR-23r - BR-23)	0,53	2,02	2,10
Schofield	(BR-11r - BR-11)	0,09	0	0
Schofield	(BR-23r+BR-23)-(BR-11r+IR-11)	9,82 ^{XX}	13,62 ^{XX}	

(a) BR-11 e BR-23 originais sensíveis; BR-11r e BR-23r mutantes resistentes à estreptomicina.

(b) Dados para análise estatística foram transformados para $\sqrt{n+1}$

QUADRO 7. EFEITO DE ESTIRPES MUTANTES RESISTENTES À ESTREPTOMICINA NO DESENVOLVIMENTO DE DUAS CULTIVARES DE *Stylosanthes guianensis* (médias de 4 repetições)

ESTIRPES	MATÉRIA SECA (mg/vaso)		N% (a)		N TOTAL (mg/vaso)	
	Schofield	IRI.1022	Schofield	IRI.1022	Schofield	IRI.1022
Testemunha	100	172	1,22	1,26	2,19	2,16
BR-11	185	140	1,25	1,36	2,31	1,90
BR-11r	174	58	1,71	2,10	2,97	1,21
BR-23	2.500	517	2,10	2,40	52,50	13,12
BR-23r	2.450	2.245	2,15	2,20	53,60	49,39

Fontes de Variação	Matéria seca P	N% P	N Total P
CULTIVAR (C)	12,80 ^{xxx}	5,56 ^x	10,72 ^{xxx}
ESTIRPE (E)	49,35 ^{xxx}	20,41 ^{xxx}	65,52 ^{xxx}
C x E	8,27 ^{xxx}	0,34	8,75 ^{xxx}
C.V. %	41	15	37

Desdobramento da interação

CULTIVAR	CONTRAÇÕES	MATÉRIA SECA P	N TOTAL P
IRI	(BR-23r - BR-23)	34,19 ^{xxx}	43,01 ^{xxx}
IRI	(BR-11r - BR-11)	0,08	0,01
IRI	(BR-11r + BR-11 - 2T)	0,08	0,01
Schofield	(BR-23r - BR-23)	0,02	0
Schofield	(BR-11r - BR-11)	0	0,01
Schofield	(BR-11r + BR-11 - 2T)	0	0,01

(a) Dados para análise estatística foram transformados em \sqrt{n}

QUADRO 8. COMPETIÇÃO ENTRE DUAS ESTIRPES DE *Ehizobium* sp. E A POPULAÇÃO NATIVA DO SOLO, NA NODULAÇÃO DE DUAS CULTIVARES DE *S. FUYANENSIS*

(médias de 4 repetições)

IDADE (dias)	ESTIRPES DE <i>Ehizobium</i> sp.	NÚMERO DE NÓDULOS/VASO (a)		% NÓDULOS (b)		NÚMERO DE NÓDULOS (a)		PESO SECO DE NÓDULOS (c)	
		ov. IRI.1022	ov. Schofield	DEVIDO À CADA ESTIRPE	DEVIDO À CADA ESTIRPE/VASO	ov. IRI.1022	ov. Schofield	ov. IRI.1022	ov. Schofield
20	BR-11r	2	28	-	-	-	-	-	-
	BR-23r	1	27	-	-	-	-	-	-
	Solo	1	10	-	-	-	-	-	-
30	BR-11r	40	70	-	-	-	-	-	-
	BR-23r	28	61	-	-	-	-	-	-
	Solo	30	45	-	-	-	-	-	-
40	BR-11r	62	103	73	71	45	73	3	5
	BR-23r	56	85	49	100	27	85	2	4
	Solo	50	73	100	100	50	73	2	3
50	BR-11r	298	341	39	65	116	221	18	32
	BR-23r	213	374	45	93	96	348	14	41
	Solo	283	296	100	100	283	296	18	35
70	BR-11r	501	553	14	54	70	304	61	88
	BR-23r	721	464	28	100	201	464	93	76
	Solo	624	465	100	100	624	465	83	72
Fonte de Variação									
		NÚM. DE NÓDULOS/VASO		% NÓDULOS DEVIDO À ESTIRPE		NÚM. DE NÓDULOS DEVIDO À ESTIRPE		PESO SECO DE NÓDULOS	
IDADE (I)		221,73**		33,63**		804,50**		230,65**	
CULTIVAR (C)		7,99**		281,50**		236,70**		5,46**	
ESTIRPE (E)		1,37		148,86**		168,90**		0,55	
I x C		3,76**		38,00**		15,00**		4,38**	
I x E		0,28		12,06**		77,10**		0,41	
C x E		0,58		102,60**		106,10**		1,62	
I x C x E		1,23		13,06**		27,40**		1,34	
O.V. %		21,84		19,82		16,71		34,56	

(a) Até os 10 dias as plantas não produziram nódulos. Os dados para análise estatística foram transformados em $\sqrt{n+1}$

(b) Os dados para análise estatística foram transformados em arco sen. \sqrt{n} (Segundo Bliss, 1937)

(c) Os nódulos foram pesados a partir dos 40 dias de idade.

QUADRO 9. INTERAÇÃO IDADE x CULTIVAR, NO NÚMERO E PESO SECO DE NÓDULOS DE DUAS CULTIVARES DE *S. guyanensis* (médias de 4 repetições)

IDADE (dias)	NÚMERO DE NÓDULOS/VASO		PESO SECO DE NÓDULOS (a) (mg/vaso)	
	ov. IRI.1022	ov. Schofield	ov. IRI.1022	ov. Schofield
20	1	22	-	-
30	33	58	-	-
40	56	87	2	4
50	265	337	17	36
70	615	494	79	79

(a) Os nódulos só foram pesados a partir dos 40 dias.

Desdobramento da interação:

NÚMERO DE NÓDULOS				PESO SECO DE NÓDULOS			
VALORES ACUMULADOS		VALORES NÃO ACUMULADOS		VALORES ACUMULADOS		VALORES NÃO ACUMULADOS	
IDADE	CONTRASTES	F	INTERVALOS ENTRE IDADES	IRI	Scho	IRI	Scho
20	(Scho-IRI) 9,90**	20-30	0,4216	0,3030	1,57	40	(Scho-IRI) 0,11
30	(Scho-IRI) 3,25	30-40	0,2016	0,2100	0,10	50	(Scho-IRI) 14,10**
40	(Scho-IRI) 2,59	40-50	0,9050	0,8960	0,05	70	(Scho-IRI) 0
50	(Scho-IRI) 3,29	50-70	0,3979	0,1954	1,65		
70	(IRI-Scho) 4,24*						

b = coeficiente de regressão entre nodulação x idade

t = teste "t" entre "b"

QUADRO 10. DESDOBRAMENTO DO EFEITO DA INTERAÇÃO CULTIVAR X ESTIRPE PARA CADA IDADE, DA PERCENTAGEM E DO NÚMERO DE NÓDULOS DEVIDO ÀS ESTIRPES DE Rhizobium sp.

IDADE (dias)	% DO NÚMERO DE NÓDULOS DEVIDO ÀS ESTIRPES (a)		NÚMERO DE NÓDULOS DEVIDO ÀS ESTIRPES (b)					
	ESTIRPES DENTRO DA CULTIVAR		ESTIPES DENTRO DA CULTIVAR		CULTIVARES DENTRO DA ESTIRPE			
	CULTIVAR	CONTRASTE	F	CULTIVAR	CONTRASTE	F		
40	IRI	(ER-11r - ER-23r)	14,80 ^{xx}	IRI	não desdobrado	2,13	BR-11r (Scho-IRI)	2,10
		(Solo - ER-11r)	63,28 ^{xx}				BR-23r (Scho-IRI)	11,90 ^{xx}
	Schofield	(ER-23r - ER-11r)	50,51 ^{xx}	Schofield	não desdobrado	1,17	Solo	(Scho-IRI) 2,00
50	IRI	(ER-23r - ER-11r)	0,39	IRI	(ER-11r - ER-23r)	0,23	BR-11r	(Scho-IRI) 2,30
		(Solo - ER-23r)	98,04 ^{xx}		(Solo - ER-11r)	5,23 ^x	BR-23r	(Scho-IRI) 10,23 ^{xx}
	Schofield	(ER-23r - ER-11r)	2,61	Schofield	não desdobrado	2,08	Solo	(IRI-Scho) 0,60
		(Solo - ER-23r)	98,04 ^{xx}					
70	IRI	(ER-23r - ER-11r)	5,27 ^x	IRI	(ER-23r - ER-11r)	4,55 ^x	BR-11r	(Scho-IRI) 8,24 ^x
		(Solo - ER-23r)	113,45 ^{xx}		(Solo - ER-23r)	7,80 ^x	BR-23r	(Scho-IRI) 4,57 ^x
	Schofield	(ER-23r - ER-11r)	59,49 ^{xx}	Schofield	não desdobrado	2,04	Solo	(IRI-Scho) 0,50

(a) Os dados para análise estatística foram transformados em $\arcsen \sqrt{n}$

(b) Os dados para análise estatística foram transformados em $\sqrt{n+1}$

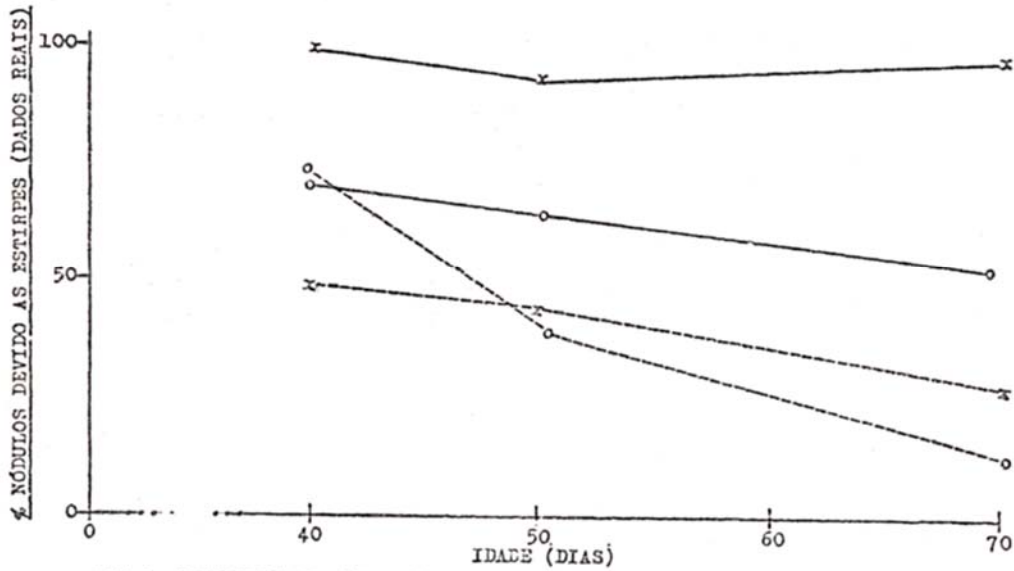


FIG.4. REGRESSÃO DA % DE NÓDULOS DEVIDO AS ESTIRPES SOBRE AS IDADES, EM DUAS CULTIVARES DE *Stylosanthes guyanensis* INOCULADAS COM ESTIRPES DE *Rhizobium* sp.

— IRI	$\left\{ \begin{array}{l} \text{ER-11r} \text{ --- } \circ \\ \text{ER-23r} \text{ --- } \times \end{array} \right.$	$y = 107,6 - 1,2820 x; r = 0,93^{**}$	$\frac{\text{Desvios entre "b" (teste t)}}{2,93^{**}(\text{ER-23r} \times \text{ER-11r})}$
		$y = 62,8 - 0,4350 x; r = 0,79^{**}$	
— Scho	$\left\{ \begin{array}{l} \text{ER-11r} \text{ --- } \circ \\ \text{ER-23r} \text{ --- } \times \end{array} \right.$	$y = 70,7 - 0,3246 x; r = 0,66^x$	$r = 0,11$

Dados para análise de regressão foram transformados em arc. sen. \sqrt{n} .

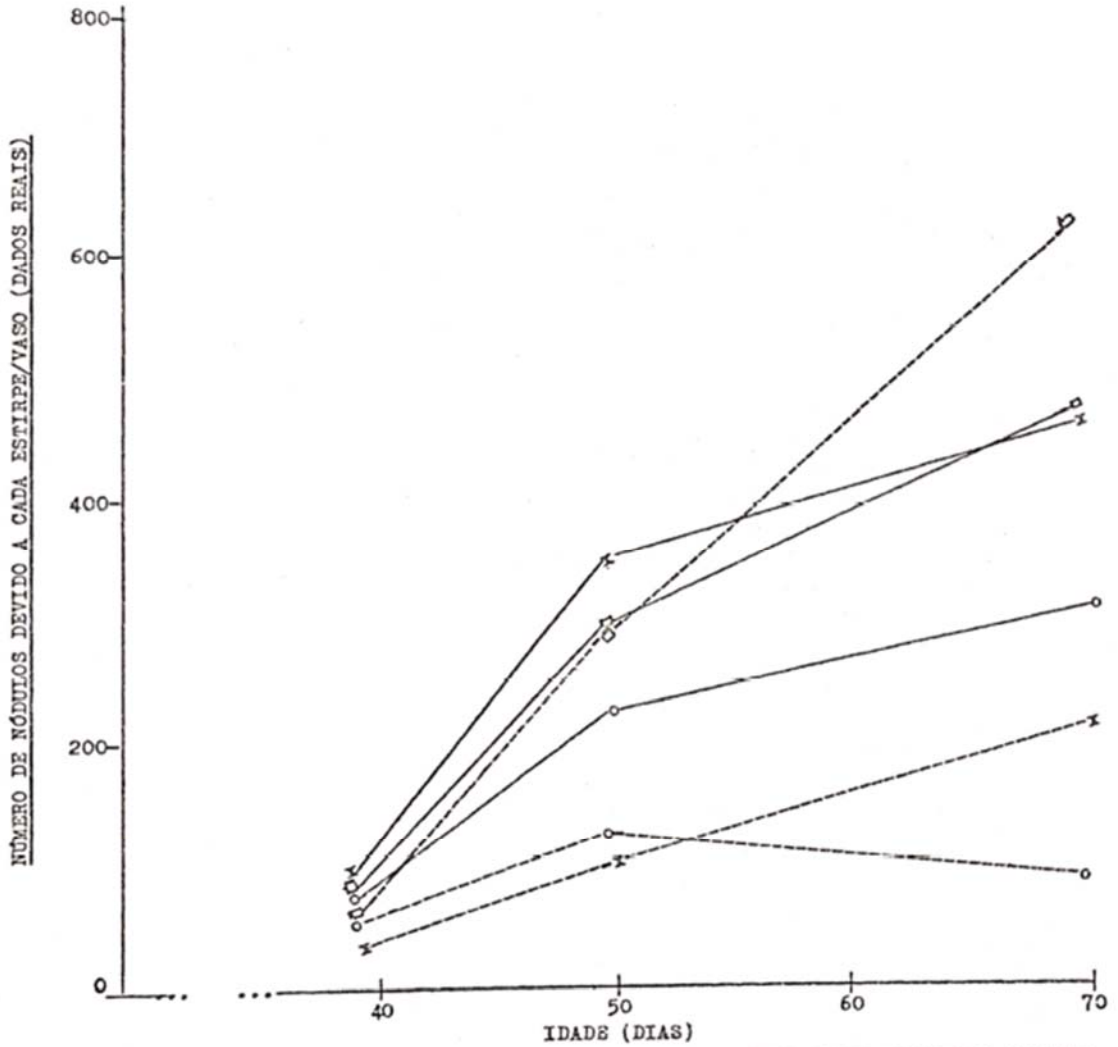


FIG.5. REGRESSÃO DO NÚMERO DE NÓDULOS DEVIDO AS ESTIRPES SOBRE AS IDADES EM DUAS CULTIVARES DE *Stylosanthes guyanensis* INOCULADAS COM ESTIRPES DE *Rhizobium* sp.

				<u>Desvio entre "b"</u> Valor t
--- IRI	ER-11r —○	$y = 9,52 - 0,0264 x$	$r = 0,095$	2,00 (ER-23r x Solo)
	ER-23r —x	$y = 4,42 + 0,2667 x$	$r = 0,870^{**}$	
	Solo —□	$y = 12,40 + 0,5303 x$	$r = 0,810^{**}$	
--- Scho	ER-11r —○	$y = 0,90 + 0,2667 x$	$r = 0,970^{**}$	1,73 (ER-11r x Solo)
	ER-23r —x	$y = 3,65 + 0,3706 x$	$r = 0,780^{**}$	
	Solo —□	$y = 7,37 + 0,4156 x$	$r = 0,840^{**}$	

Dados para análise de regressão foram transformados em $\sqrt{n + 1}$.

QUADRO 11. EFEITO DE ESTIRPES DE *Rhizobium* sp. EM DIFERENTES IDADES, NO DESENVOLVIMENTO E NA ATIVIDADE DA N_2 -ase DE DUAS CULTIVARES DE *S. fulvovirescens* (médias de 4 repetições)

IDADE (dias)	ESTIRPES DE <i>Rhizobium</i> sp.	MATERIA SECA (c)		N % (a)		N TOTAL (c)		ATIVIDADE DA N_2 -ase (b)	
		(mg/vaso)	cv. IRI.1022	cv. Schofield	cv. IRI.1022	cv. Schofield	(mg/vaso)	cv. IRI.1022	cv. Schofield
10	BR-11r	26	32	4,50	4,05	1,19	1,32	0	0
	BR-23r	24	34	4,60	4,40	1,10	1,50	0	0
	Solo	24	28	4,40	4,40	1,60	1,24	0	0
20	BR-11r	92	111	3,90	4,20	3,60	4,67	0	0
	BR-23r	63	121	3,85	3,85	2,45	4,66	0	0
	Solo	73	95	3,85	4,20	2,83	3,99	0	0
30	BR-11r	183	341	4,00	4,15	7,35	14,15	0	0
	BR-23r	162	292	3,95	4,15	6,41	12,14	0	0
	Solo	73	289	4,10	4,35	8,09	12,59	0	0
40	BR-11r	521	846	4,00	3,70	20,86	31,30	46	225
	BR-23r	477	775	3,60	3,90	17,19	30,23	65	247
	Solo	476	832	3,85	3,70	18,33	30,81	39	195
50	BR-11r	1.558	2.470	3,00	2,55	46,76	63,00	1.153	2.842
	BR-23r	1.577	2.642	2,90	2,60	45,75	68,69	1.313	5.717
	Solo	1.769	2.523	2,95	2,45	52,20	61,83	1.900	4.241
70	BR-11r	6.360	8.941	2,60	2,50	165,36	223,53	8.125	5.687
	BR-23r	7.443	9.218	2,60	2,50	193,53	230,46	5.395	5.850
	Solo	7.373	9.780	2,60	2,50	191,71	244,50	9.343	4.225
Pontes de Variação		MATERIA SECA		N %		N TOTAL		ATIVIDADE DA N_2 -ase	
		P		P		P		P	
IDADE (I)		8.080,25**		18,37**		390,75**		237,77**	
CULTIVAR (C)		424,33**		0,36		22,00**		20,44**	
I x C		6,42**		0,48		2,50*		10,22**	
C.V.%		11		12		17		25	

(a) Os dados para análise estatística foram transformados em \sqrt{n}

(b) A atividade da N_2 -ase foi detetada pela primeira vez aos 40 dias de idade.

(c) Os dados para análise estatística foram transformados em $\log_{10} n$

QUADRO 12. INTERAÇÃO IDADE x CULTIVAR, NA MATÉRIA SECA, N TOTAL E ATIVIDADE DA N₂-ase DE DUAS CULTIVARES DE S. guineensis (médias de 4 repetições)

IDADE (dias)	MATÉRIA SECA (mg/vaso)		N TOTAL (mg/vaso)		ATIVIDADE DA N ₂ -ase (nmolos C ₂ H ₄ /h/vaso)	
	cv. IRI.1022	cv. Schofield	cv. IRI.1022	cv. Schofield	cv. IRI.1022	cv. Schofield
10	24	31	1,11	1,35	0	0
20	76	109	2,96	4,44	0	0
30	181	307	7,28	12,96	0	0
40	491	817	10,79	30,78	50	222
50	1.635	2.545	48,23	64,50	1.423	4.266
70	7.059	9.313	183,53	232,83	7.621	5.254

Desdobramento da interação:

IDADE	MATÉRIA SECA		N TOTAL		ATIVIDADE DA N ₂ -ase	
	VALORES ACUMULADOS	VALORES NÃO ACUMULADOS	VALORES ACUMULADOS	VALORES NÃO ACUMULADOS	IDADE	CONTRASTES F
	b (mg/dia) ± t		b (mg/dia) ± t			
	CONTRASTES F	INTERVALOS ENTRE IDADES	CONTRASTES F	INTERVALOS ENTRE IDADES		
10	(Scho-IRI) 29,16**	10-20 0,0472 0,0542 1,46	(Scho-IRI) 1,25	10-20 0,0417 0,0507 0,21	40	(Scho-IRI) 25,44**
20	(Scho-IRI) 58,33**	20-30 0,0356 0,0420 1,33	(Scho-IRI) 4,75**	20-30 0,0388 0,0451 0,98	50	(Scho-IRI) 14,44**
30	(Scho-IRI) 120,83**	30-40 0,0450 0,0433 0,23	(Scho-IRI) 8,75**	30-40 0,0416 0,0385 0,48	70	(IRI-Scho) 0,99
40	(Scho-IRI) 116,67**	40-50 0,0587 0,0517 1,46	(Scho-IRI) 6,50*	40-50 0,0413 0,0328 1,98		
50	(Scho-IRI) 87,50**	50-70 0,0328 0,0282 1,91	(Scho-IRI) 2,50	50-70 0,0288 0,0279 0,47		
70	(Scho-IRI) 33,33**		(Scho-IRI) 1,50			

b = coeficiente de regressão entre os parâmetros (matéria seca, N total e atividade da N₂-ase) x idade

t = teste "t" entre "b"