

## ESTIRPES DE *Rhizobium japonicum* DE EXCEPCIONAL EFICIÊNCIA<sup>1</sup>

JOHANNA DÖBEREINER<sup>2</sup>, AVILIO A. FRANCO<sup>3</sup> e IVÁN GUZMÁN<sup>4</sup>

### Sinopse

Foram estudadas as regressões entre o peso dos nódulos e o nitrogênio total nas plantas em seis experimentos de casa de vegetação com soja (*Glycine max* (L.) Merrill) inoculada com 24 estirpes de *Rhizobium japonicum* (Kirchner) Buchanan. Três destas estirpes se diferenciaram significativamente das demais, apresentando coeficientes de regressão aproximadamente duas vezes maiores, o que demonstra dupla eficiência do tecido nodular.

Diferenças fisiológicas entre as estirpes excepcionais e as demais foram confirmadas pela maior sensibilidade das primeiras a concentrações crescentes de asparagina em meio de cultura.

O trabalho sugere a existência de dois grupos definidos de estirpes de *Rhizobium*, além dos ineficientes, no que se refere à eficiência nodular da soja. Diferenças contínuas entre estirpes, na eficácia global da simbiose, foram atribuídas à variação contínua do peso nodular formado.

### INTRODUÇÃO

Na seleção de estirpes de *Rhizobium*, a avaliação da capacidade de fixação de nitrogênio, medida pelo seu produto final dado pela quantidade deste elemento proveniente da atmosfera que é incorporado ao tecido vegetal, representa um fundamento básico. A compreensão das diversas fases do complicado processo da simbiose das leguminosas fornece informações adicionais indispensáveis ao êxito das pesquisas neste ramo.

Em trabalhos anteriores (Döbereiner 1966, Döbereiner *et al.* 1966) foi sugerida a avaliação da simbiose pela regressão entre o peso dos nódulos e o nitrogênio total nas plantas sendo o nitrogênio fixado  $NF = bx$ , onde o coeficiente de regressão  $b$  representa a eficiência do tecido nodular e  $x$  o peso dos nódulos. Enquanto o peso nodular, além de outros fatores, foi dependente da genética da planta e da estirpe de *Rhizobium*, a eficiência do tecido nodular não foi afetada, a não ser pela adubação nitrogenada.

Em trabalho recente (Guzmán & Döbereiner 1968a), foi proposta a diferenciação entre os termos "eficaz" e "eficiente" (effective e efficient em inglês), sendo o primeiro termo proposto para a avaliação da simbiose como um todo, enquanto o termo eficiência seria reservado para indicar a quantidade de nitrogênio fixado por unidade de tecido nodular. No mesmo trabalho os autores verificaram maior eficiência dos nódulos de *Indigofera hirsuta* quando comparados com três outras espécies. Na inoculação cruzada de duas estirpes de *Rhizobium* isoladas de cada uma destas espécies não se notou nenhuma interferência da bactéria na eficiência do tecido nodular, sendo a diferença na eficácia das diversas combinações atribuída ao peso de nódulos produzidos.

Em outros experimentos (resultados não publicados), com 50 estirpes de *Rhizobium* inoculadas em soja perene (*Glycine javanica*) e com 15 estirpes inoculadas em *Calopogonium mucunoides*, observou-se, da mesma forma, que na mesma espécie diferenças na eficácia entre estirpes foram devidas somente às diferenças nos pesos nodulares.

Recentemente, entretanto, foram encontradas três estirpes de *Rhizobium japonicum* que apresentam eficiência excepcional, fixando, por unidade de peso nodular, aproximadamente o dobro do nitrogênio das estirpes comuns de *R. japonicum*.

O presente trabalho visa confirmar a existência de dois grupos de estirpes bem definidos no que se refere à eficiência nodular.

<sup>1</sup> Recebido 14 fev. 1969, aceito 1.º ago. 1969.

Boletim Técnico n.º 88 do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Centro-Sul (IPEACS). Apresentado na IV Reunião Latino-Americana sobre Inoculantes para Leguminosas, Porto Alegre, outubro de 1968.

<sup>2</sup> Eng.º Agrônomo do setor de Solos do IPEACS, Km 47, Campo Grande, GB. ZC-26, e bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq 7105/68).

<sup>3</sup> Eng.º Agrônomo em treinamento no IPEACS pelo Escritório de Pesquisas e Experimentação (EPE).

<sup>4</sup> Professor Adjunto de Fitopatologia e Microbiologia do Solo da Universidade Autónoma de Santo Domingo, República Dominicana.

## MATERIAL E METODOS

Os dados apresentados no presente trabalho foram tirados de seis experimentos em casa de vegetação, tendo sido dois deles (SS 3/43C e SS 3/103) instalados em vasos com um solo extremamente arenoso da Série Ecologia (Gray hidromorphic) e quatro em vasos de "Leonard" com areia de praia lavada, usando-se solução nutritiva sem nitrogênio (SS 3/88, SS 3/99 A, SS 3/106 e SS 3/108). Nos vasos com solo foi feita adubação básica de PK, elementos meno-

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Alguns detalhes sobre os seis experimentos e os coeficientes das regressões e das correlações podem ser observados no Quadro 3. Já no experimento SS 3/43C se verificou que as três subculturas da estirpe  $R_{54}$  não se enquadraram na linha de regressão das 17 outras estirpes. Nos experimentos subsequentes foi confirmada a maior eficiência da  $R_{54}$ , aparecendo ainda a estirpe CB-1809 e, finalmente, num dos experimentos, a  $R_{11}$ , com eficiência superior às demais.

QUADRO 1. *Tratamentos e outros detalhes dos seis experimentos\**

N.º do experimento	Delimitação experimental	N.º de repetições	Tipo de vasos	Variedades de soja	Tratamentos
SS 3/43C	Blocos ao acaso	3	Barro com solo Ecologia + 0,5% casca de arroz	Sta. Maria	20 inoculantes
SS 3/88 <sup>b</sup>	Fatorial 3 × 3	4	Leonard com areia lavada esterilizada	Mamouth Abura Pelicano	3 inoculantes com 3 variedades
SS 3/99A <sup>b</sup>	Fatorial 2 × 2	4	Leonard com areia lavada esterilizada	Mamouth	2 inoculantes, colhido em 2 épocas (40 e 50 dias)
SS 3/103	Blocos ao acaso	3	Plásticos com solo Ecologia e com areia	Abura Pelicano	5 níveis de diluição do solo com areia, 5 níveis de calcário, dois inoculantes e duas variedades
SS 3/106	Blocos partidos	3	Leonard com areia lavada esterilizada	Majors	11 inoculantes, colhido em duas épocas (40 e 50 dias)
SS 3/108	Fatorial	4	Leonard com areia lavada não esterilizada	Pelicano	3 inoculantes de <i>Rhizobium</i> , com e sem triptofano, com e sem inoculação com <i>Azotobacter</i>

\* Alguns destes experimentos, além dos tratamentos citados, ainda tinham outros como, p. ex. adubação nitrogenada, inoculação com estirpes do grupo "Cowpea" que não nodulou etc. No presente trabalho, entretanto, somente foram usados os dados dos tratamentos citados.

<sup>b</sup> Tendo sido os experimentos SS 3/88 e SS 3/99A condições praticamente idênticas e por causa do pequeno número de tratamentos, os dados destes dois experimentos foram reunidos nos cálculos das regressões.

res e magnésio. Nos vasos de "Leonard" foi usada a solução nutritiva de Norris modificada (Guzmán & Döbereiner 1968a). Os tratamentos e outros detalhes sobre os seis experimentos são apresentados resumidamente no Quadro 1.

Os testes para a diferenciação fisiológica das estirpes foram feitos com dois isolamentos de cada estirpe, de nódulos retirados do experimento SS 3/106. Usou-se meio de cultura líquido (meio 79 de Fred & Waksman 1928) com meia dosagem de extrato de levedura filtrada em um "filtro de Seitz" e diferentes dosagens de L, D-asparagina, em frasco de Erlenmeyer de 125 ml, incubados em temperatura ambiente num agitador rotativo. A densidade ótica foi medida num fotocolorímetro Klett e Summerson com filtro de 540 m $\mu$  descontando-se a densidade ótica das testemunhas correspondentes.

As estirpes usadas e suas procedências são apresentadas no Quadro 2.

QUADRO 2. *Estirpes de Rhizobium usadas nos diversos experimentos e suas procedências*

Estirpes usadas	Local do isolamento	Inoculação usada	Ano do isolamento
$R_{2a}$ , $R_{3a}$ , $R_{4a}$ $R_{5a}$ , $R_{6a}$ , $R_{7a}$ e $R_{9a}$	IPEACS (RJ) Brasil	Sem inoculação	1960
$A_{2a}$ , $NG_{1a}$ $SM_{1b}$ e $RT_{2a}$	Brasil	Sem inoculação	1963
$R_{34a}$ , $R_{54b}$ e $R_{54c}$	Brasil	Inoc. misto SARGS	1963
$R_{18}$	Brasil	Sem inoculação	1964
$R_{21}$	Brasil	Sem inoculação	1966
$R_{10b}$ , $R_{11a}$ , $R_{12a}$ $R_{13a}$ e $R_{15a}$	V.çosa (MG) Brasil	Inoculante vindo dos EUA	1964
$R_{53}$ e $R_{61}$	Rio Pombo (MG) Brasil	Sem inoculação	1968
$R_{58}$	Brasil	Inoc. misto SARGS	1968
CB-1705, CB-1802 e CB-1809	CSIRO (Brisbane) Austrália	Enviado pelo Dr. D.O. Norris	1966
CB-1003	Austrália	Enviado pelo Dr. D.O. Norris	1965

Na Fig. 1 são apresentadas as linhas de regressão dos quatro experimentos feitos em vasos de "Leonard" com areia de praia lavada. Verifica-se uma concordância surpreendente entre os dados obtidos nos diferentes experimentos, sempre aparecendo num grupo as três estirpes excepcionais e as restantes em outro. As diferenças entre os coeficientes de regressão (Quadro 3) das estirpes excepcionais e das comuns de cada experimento foram altamente significativas enquanto os testes *t* aplicados entre as linhas de cada grupo não mostraram significância.

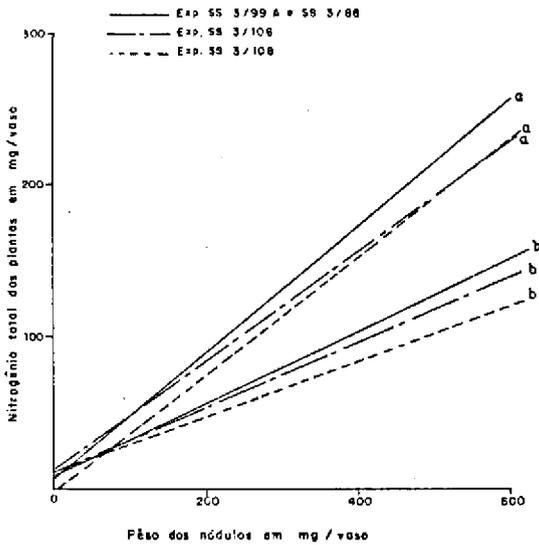


FIG. 1. Regressões das estirpes normais (b) e das excepcionais (a), dos experimentos em vasos de "Leonard" com areia.

Na Fig. 2 são apresentadas as linhas de regressão dos dois experimentos feitos em vasos, com solo. Como esperado, nota-se nestes uma variação maior devida a fatores incontroláveis, mas mesmo aqui os coeficientes de correlação são altos (Quadro 3). O ponto "a" das regressões, que equivale ao nitrogênio proveniente do solo e das sementes, foi mais alto nestes dois experimentos devido ao maior teor de nitrogênio do solo, sendo o do experimento SS 3/43C,

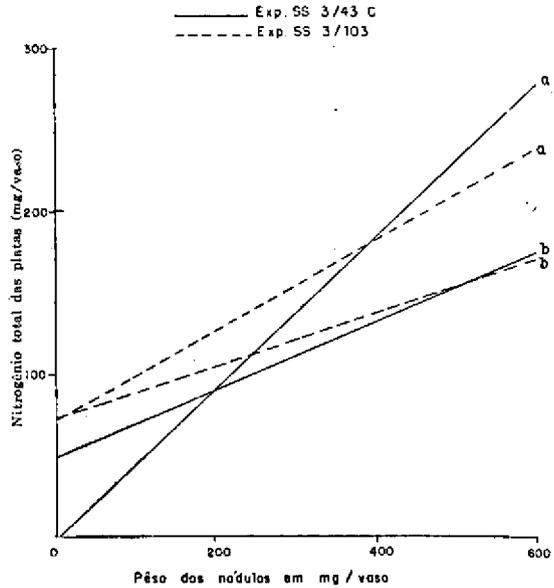


FIG. 2. Regressões entre o pêso dos nódulos e o N total, de plantas inoculadas com estirpes normais (b) e excepcionais (a), em solo.

QUADRO 3. Equações das regressões e coeficientes de correlação (*r*) entre o pêso dos nódulos e o nitrogênio total nas plantas de soja (*Glycine max*) inoculadas com estirpe de *R. japonicum* de eficiência normal e excepcional e teste *t* para as diferenças entre os coeficientes das regressões

Experimento	Estirpes usadas	Eficiência	Equações das retas	Coef. correlação	Teste (t)
SS 3/43C	R <sub>54a</sub> , R <sub>54b</sub> e R <sub>54c</sub>	Excepcional	$Y = -3,246 + 0,439X$	0,98**	
SS 3/43C	CB-1003, R <sub>2a</sub> , R <sub>3a</sub> R <sub>4a</sub> , R <sub>5a</sub> , R <sub>6a</sub> , R <sub>7a</sub> R <sub>9a</sub> , R <sub>12a</sub> , R <sub>13a</sub> , R <sub>15a</sub> , R <sub>15</sub> , A <sub>2a</sub> , RT <sub>2a</sub> NG <sub>1a</sub> , SM <sub>1b</sub> e SM <sub>1c</sub>	Normal	$Y = 29,763 + 0,210X$	0,85**	
SS 3/88	R <sub>54a</sub> e CB-1809	Excepcional	$Y = 6,252 + 0,427X$	0,76**	
SS 3/99A	CB-1809				2,49*
SS 3/88	SM <sub>1b</sub>	Normal	$Y = 8,090 + 0,240X$	0,93**	
SS 3/99A	"				
SS 3/103	R <sub>54a</sub>	Excepcional	$Y = 53,753 + 0,279X$	0,79**	2,92**
SS 3/103	SM <sub>1b</sub>	Normal	$Y = 53,876 + 0,165X$	0,90**	
SS 3/106	R <sub>54a</sub> , R <sub>54c</sub> CB-1809 e R <sub>11a</sub>	Excepcional	$Y = 12,556 + 0,364X$	0,92**	
SS 3/100	CB-1705, CB-1082 R <sub>58</sub> , R <sub>55</sub> , R <sub>61</sub> , R <sub>21</sub> e SM <sub>1b</sub>	Normal	$Y = 11,220 + 0,216X$	0,96**	4,36**
SS 3/106	R <sub>54a</sub>	Excepcional	$Y = -2,000 + 0,390X$	0,86**	3,55**
SS 3/108	SM <sub>1b</sub> e R <sub>9a</sub>	Normal	$Y = 10,388 + 0,186X$	0,96**	

no qual foi usada casca de arroz, que causou a imobilização de parte do nitrogênio do solo, mais baixo do que o ponto "a" do experimento SS 3/103.

Como na Fig. 1, também nestas regressões a diferença entre os coeficientes de regressão dos dois grupos de cada experimento foi significativa, notando-se ainda, entre os dois coeficientes de regressão das estirpes excepcionais dos dois experimentos, diferença que podia ser atribuída ao maior teor de nitrogênio disponível no solo usado no experimento SS 3/103.

Os coeficientes de correlação, na sua maioria extremamente altos, comprovam assim, dentro de cada grupo de estirpes, que a quantidade de nitrogênio fixado depende quase exclusivamente de tecido nodular disponível. Apesar de alguns autores já terem observado a importância do peso total de nódulos na avaliação da simbiose (Bowen 1959, Döbereiner *et al.* 1966), persiste a idéia de que as diferenças entre estirpes de *Rhizobium* se devem principalmente a diferenças na sua eficiência nodular e que esta eficiência varia em escala contínua (Nutman 1965). Admitindo-se isto, seria difícil obterem-se regressões como as destes experimentos e de outros apresentados em trabalhos anteriores (Döbereiner *et al.* 1966, Guzmán & Döbereiner 1968a).

Em lugar de uma escala contínua de eficiência dos nódulos, o que parece existir na soja são três linhas bem definidas, sendo uma para nódulos ineficientes, sem hemoglobina (Döbereiner *et al.* 1966), uma para a maioria das estirpes aqui chamadas "normais" e uma terceira para algumas estirpes excepcionais. Variações contínuas entre estirpes de *Rhizobium* e ainda efeitos das variedades de soja e outros fatores que sem dúvida existem, seriam então, antes de tudo, devidas às variações contínuas do tecido nodular disponível.

Comparando-se os coeficientes de regressão no Quadro 3, verifica-se, ainda, que os das estirpes excepcionais são sempre aproximadamente duas vezes maiores que os das estirpes normais. Em outro trabalho (Döbereiner 1963), calculou-se a quantidade de tecido nodular necessária para atingir 100 mg de nitrogênio em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) chegando-se à conclusão de que uma das estirpes necessitava o dobro do tecido nodular da outra, sugerindo a hipótese de que existe mais de uma enzima envolvida na fixação do nitrogênio livre do ar.

A existência, na soja, de dois grupos de estirpes, bem distintos em relação à eficiência nodular, dificilmente poderia ser explicada pela maior ou menor percentagem de células com tecido bacteróide de maior ou menor longevidade, hipótese esta sugerida por Chen e Thornton (1940) como explicação das

diferenças na eficácia entre estirpes de *Rhizobium*, pois estas seriam contínuas. Pela mesma razão, a concentração de leg-hemoglobina, como proposto por Virtanen *et al.* (1947), não deveria ser a causa, apesar de possivelmente ser uma consequência.

Parece mais provável que a causa desta diferença seja encontrada nos sistemas enzimáticos da fixação de nitrogênio em si ou da incorporação deste elemento. Sendo a taxa de síntese de amônia uma função linear da quantidade de nitrogenase, (Kock & Evans 1967) (3,47  $\mu$  moles de  $\text{NH}_3$ /minutos/mg de proteína (enzima), a diferenciação em dois grupos definidos requereria duas taxas, isto é, duas enzimas diferentes possuindo uma delas eficiência maior, ou então, ação simultânea onde a presença de uma enzima adicional nas estirpes excepcionais dobraria a taxa de fixação de nitrogênio. Por outro lado, foi observado por Bergersen e Turner (1967) um aumento de 10 a 15 vezes na taxa de síntese da amônia com a adição de succinato ou fumarato, indicando que a atividade da nitrogenase não foi o fator limitante, mas sim, o substrato.

Kennedy *et al.* (1966) encontraram desidrogenase glutâmica na fração de bacteróides em nódulos de *Ornithopus sativus* e sugeriram que o bacteróide seja capaz de proporcionar a aminação do ácido  $\alpha$  ceto glutárico em ácido glutâmico. Análogamente se poderia imaginar que na soja o fumarato serviria como receptor da amônia na síntese do ácido aspártico. No trabalho de Bergersen e Turner (1967) isto não foi confirmado porque, nas condições em que os autores trabalharam, isto é, com bacteróides lavados e em suspensão em ambiente anaeróbio, não houve síntese de aminoácidos, apesar de ter sido observado antes (Kennedy 1966) que a amônia fixada é imediatamente incorporada em  $\alpha$  amino-ácidos, quando o tecido nodular está intacto. Surge daí outra hipótese alternativa para a explicação dos dois grupos definidos de eficiência: Wierenga (1958), comparando plantas de ervilha (*Pisum sativum*) inoculadas com estirpes de eficácia diferente, notou a presença de asparagina somente na seiva das plantas inoculadas com um grupo de estirpes que fixavam o dobro, ou mais, do N fixado pelas demais, sem entretanto tomar em consideração o peso de nódulos, indispensável para se avaliar taxa da fixação. Poder-se-ia imaginar, em nosso caso, que, nas estirpes excepcionais, a presença adicional de uma asparagina-sintetase, além da aspartase, proporcionaria dupla disponibilidade de receptores, dobrando assim a taxa de fixação de nitrogênio e a eficiência dos nódulos, aparecendo como produto final asparagina em lugar de ácido aspártico. O que foi dito para ácido aspár-

tico e asparagina poderia, da mesma forma, se aplicar ao ácido glutâmico e glutamina. Kennedy (1966) estudou em *Ornithopus sativus* a velocidade da incorporação de  $N_2^{15}$  no radical amina e no radical amida da glutamina, observando, após 8 minutos, decréscimo na taxa do aparecimento de  $N_2^{15}$  no radical amina, enquanto a taxa da síntese da amida continuou em aceleração, indicando terem sido reações adicionais.

Nos experimentos de Bergersen e Turner (1967), a adição de succinato a uma suspensão de bacterídeos lavados aumentou de 10 a 20 vezes a taxa de síntese de amônia, enquanto que a absorção de  $O_2$  foi aumentada apenas 50%. Se a função de leg-hemoglobina, como proposto por Bergersen e Turner (1967), é o transporte de  $O_2$  sem elevar o potencial de óxido-redução, o aumento de duas vezes da taxa de fixação de nitrogênio, em nosso caso, acarretaria um aumento da ordem de 5-10% no teor de leg-hemoglobina. Experimentos com as mesmas estirpes de *Rhizobium japonicum* (Pedrosa et al 1969) demonstraram em média uma concentração de 13%

a mais de hemoglobina nos nódulos formados pela estirpe R<sub>61a</sub> do que nos formados pela estirpe SM1b.

Dever-se-ia esperar que diferenças fisiológicas entre estirpes excepcionais e normais fossem mais facilmente identificáveis do que diferenças contínuas entre estirpes em relação à sua capacidade de formar nódulos, a qual, por sua vez, ainda dependeria mais da planta do que o próprio processo da fixação de nitrogênio. Foram, por isto, isoladas duas subculturas dos nódulos de cada um dos tratamentos do experimento SS 3/106, as quais foram testadas em diferentes meios de cultura. Nas Fig. 3 e 4 se observa uma maior inibição, por dosagens crescentes de asparagina, das estirpes com eficiência excepcional do que das de eficiência normal. Observações indicando maior inibição pela triptofana, de estirpes mais eficazes de *Rhizobium leguminosorum*, tinham sido feitas por um dos autores (Guzmán 1966).

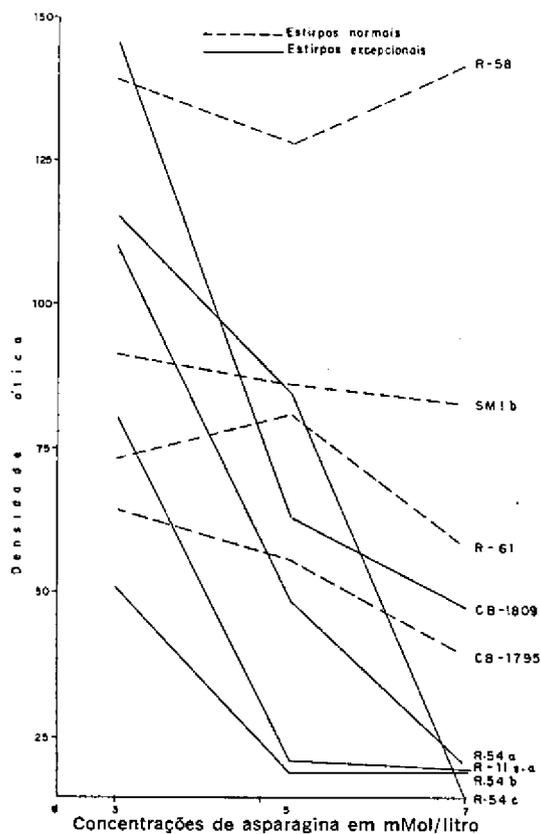


FIG. 3. Desenvolvimento de diversas estirpes de *Rhizobium* em meio de cultura durante 17 dias em presença de 3 concentrações de asparagina.

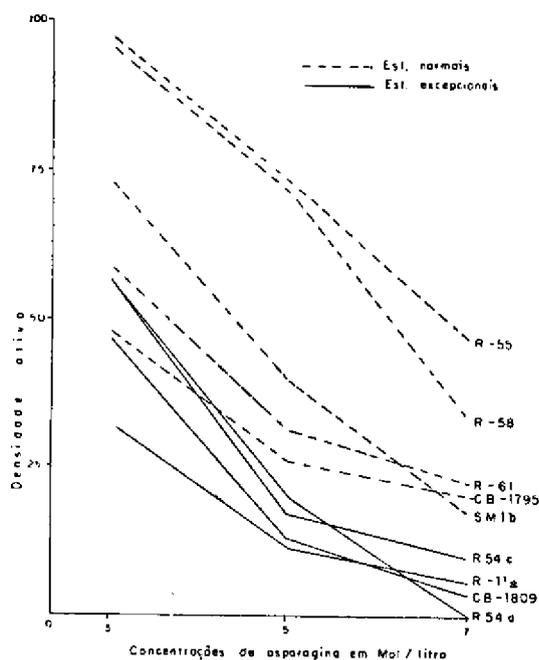


FIG. 4. Desenvolvimento em meio de cultura durante 8 dias, de diversas estirpes de *Rhizobium*, em presença de três concentrações de asparagina: Médias de duas repetições (Isolamentos).

Mesmo que, dependendo do tempo de crescimento, os efeitos da asparagina ainda tenham sido um tanto variáveis, parece patente uma diferença fisiológica entre os dois grupos de estirpes e provavelmente outras existem. A elaboração de um método para diferenciar estirpes excepcionalmente eficientes em testes de meio de cultura tem destaque eminente e, pelos resultados aqui apresentados, não parece estar longe.

Além do interesse teórico, o destaque das estirpes de eficiência excepcional, parece ter importância eminentemente na prática. As estirpes R<sub>54</sub> e R<sub>11</sub> têm-se destacado em vários dos experimentos de seleção que realizamos, estando sempre entre as melhores. A estirpe CB-1809 é a recomendada pela Commonwealth Scientific Industrial Research (CSIRO) em 1968 e foi classificada como "outstanding" (Norris 1967), atingindo a maior fixação de nitrogênio em 5 variedades de soja. Isto indica que a eficiência maior de tecido nodular proporciona maior fixação de nitrogênio global mesmo em condições naturais, possivelmente devido ao menor volume nodular necessário para atingir o mesmo produto final.

Além do aparecimento de estirpes com eficiência maior, surge no presente trabalho outro fator a ser considerado ao se usar o método proposto de avaliação da simbiose pela regressão do nitrogênio total sobre o peso dos nódulos (Döbereiner 1966, Döbereiner *et al.* 1966). Naqueles trabalhos foram apresentados resultados de experimentos de campo e de vasos com solo, nos quais, para se obter uma regressão linear, os valores relativos ao nitrogênio total foram colocados em escala logarítmica. Nas Fig. 1 e 2 podemos observar que isto não foi feito no presente trabalho. Isto porque dos seis experimentos realizados, quatro o foram em areia e dois em solo extremamente arenoso, e destes, um, ainda, em diluição com areia. A tendência de aparecerem regressões lineares nos experimentos realizados em areia já tem sido observada (Guzmán & Döbereiner 1968b e vários outros trabalhos não publicados), o mesmo não sucedendo com solo, o que se deve possivelmente à maior disponibilidade de nitrogênio nestes últimos.

#### AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Roberto Alvahydo, Engenheiro Agrônomo do Setor de Solos do IPEACS, pelas sugestões valiosas na discussão dos resultados, nossos sinceros agradecimentos.

#### REFERÊNCIAS

- Bergersen, E.J. & Turner, J.L. 1967. Nitrogen fixation by the bacteroid fraction of breis of soybean root nodules. *Biochem. biophys. Acta* 141:507-515.
- Bowen, G.D. 1959. Specificity and nitrogen fixation in the *Rhizobium* symbiosis of *Centrosema pubescens* Benth. *Qd J. agric. Sci.* 16:167-169.
- Chen, H.K. & Thornton, I.L.G. 1940. The structure of ineffective nodules and its influence on nitrogen fixation. *Roy. Soc. London. Proc. B*, 129:208-229.
- Döbereiner, J. 1963. Manganese toxicity in the *Rhizobium-bean* symbiosis (*Phaseolus vulgaris* L.). M.S. thesis, University of Wisconsin.
- Döbereiner, J. 1966. Evaluation of nitrogen fixation in legumes by the regression of total plant nitrogen with nodule weight. *Nature* 210:850-852.
- Döbereiner, J., Arruda, N.B. de & Pentead, A. de F. 1966. Avaliação da fixação do nitrogênio, em leguminosas pela regressão do nitrogênio total das plantas sobre o peso dos nódulos. *Pesq. agropec. bras.* 1:233-237.
- Fred, E.B. & Waksman, S.A. 1928. *Laboratory manual of general microbiology*. McGraw-Hill Book Co., New York.
- Guzmán, I. 1966. Tese de Eng.º Agrônomo da Faculté des Science Agronomiques de l'État, Gembloux, Bélgica.
- Guzmán, I. & Döbereiner, J. 1968a. Effectiveness and efficiency in the symbiosis of four cross-inoculated tropical legumes. IV Reun. lat-am. Inoc. Legum., Porto Alegre.
- Guzmán, I. & Döbereiner, J. 1968b. Effect of *Azotobacter chroococcum* and tryptophan on the inoculation of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) with *Rhizobium japonicum*. IV Reunião lat-am. Inoc. Legum., Porto Alegre.
- Kennedy, I.R. 1966. Primary products of symbiotic nitrogen fixation. I Short term exposure of *Sesadella nodules* to N<sub>2</sub><sup>15</sup>. *Biochem. biophys. Acta* 130:285-294.
- Kennedy, I.R., Parker, A.C. & Kidby, C.K. 1966. The probable site of nitrogen fixation in root nodules of *Ornithus sativus*. *Biochem. biophys. Acta* 130:517-519.
- Koch, B. & Evans, H.J. 1967. Properties of the nitrogen system in cell free extracts of bacteroids from soybean root nodules. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* 58:1343-1350.
- Pedrosa, F.O., Nascimento, A.J., Alvahydo, R. & Döbereiner, J. 1969. Teores de leghemoglobina e de molibdênio nos nódulos de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) inoculada com estirpes de *Rhizobium japonicum* de eficiência normal e excepcional. XII Congr. bras. Ci. Solo, Curitiba.
- Nutman, P.S. 1965. Symbiotic nitrogen fixation, p. 363-379. In Bartholomew, W.V. & Clark, F.E. (ed.), *Soil nitrogen*. Agronomy Ser. n.º 10, Am. Soc. Agron. Inc. Publ., Madison, Wis.
- Virtanen, A.I., Erkama, J. & Lincela, H. 1947. On the relation between nitrogen fixation and leg-haemoglobin content of leguminous root nodules. *Acta chem. scand.* 1:90-111.
- Wierenga, K.T. 1958. Transport of amino acids in leguminous plants, p. 256-265. In Hallsworth, E.G. (ed.), *Nutrition of the legumes*. Academic Press Inc., New York.

#### STRAINS OF *Rhizobium japonicum* WITH EXCEPTIONAL NODULATION EFFICIENCY

##### Abstract

Regressions for total plant nitrogen with nodule weight were studied in six greenhouse experiments with soybeans inoculated with 24 *Rhizobium* strains. Details on the experiments and the origin of the strains are summarized.

In all experiments, all strains except three formed a single regression line indicating that differences in effectiveness were due to differences in the amount of nodules produced, thus confirming former observations. However, three strains (CB-1809, R-54 and R-11) when separated presented regression line with a coefficient about twice as high as the other strains. These strains showed higher nodule efficiencies than had been observed with other strains, and therefore were called *exceptional*. The regressions of normal and exceptional strains in four experiments using sterilized sand cultures showed surprising similarity. The two soil experiments showed variations but there were still two well defined regressions with significantly different slopes for the normal and exceptional strains.

These observations indicate the existence of three distinct levels of nodulation efficiency among soybean strains: Unefficient, normal and exceptional in the ratio 0:1:2. Continuous differences between strains in overall effectiveness would then be due to differences only in the amount of nodules produced, and not as is generally assumed, to varying nodulation efficiency. The implications of this in the mechanism of nitrogen fixation are discussed. The existence of an additional enzyme leading to asparagine or glutamine instead of the simples aminos, which would reduce to about half the need of carbon sceletons as  $\text{NH}_3$ -acceptors, was suggested as an explanation of the doubled ratio in nitrogen fixation, in nodules formed by exceptional strains.

The three exceptional strains are outstanding also in overall effectiveness, even under field conditions, possibly because of their lower need of nodule tissue in order do obtain the same nitrogen with fixation. The *in vitro* selection of exceptional strains, those with doubled nodule efficiency, seems more promising than selection of strains which form more nodule tissue. The increased sensitivity of exceptional strains to asparagine indicates physiological differences which can be detected in culture medium.