

COMISSÃO III - BIOLOGIA DO SOLO

EFEITO DO NITROGÊNIO MINERAL NA ATIVIDADE DA NITROGENASE E NITRATO REDUTASE, DURANTE O CICLO DA SOJA NO CAMPO⁽¹⁾

A.A. FRANCO⁽²⁾; O.O.M. DA FONSECA⁽³⁾ & I.E. MARRIEL⁽⁴⁾

RESUMO

Em experimento de campo, com seis repetições, foi estudado o efeito de quatro níveis de adubação nitrogenada nas atividades das enzimas nitrogenase (N_2 -ase) e nitrato-redutase (NR-ase) na acumulação de nitrogênio nas plantas e na produção de grãos de Glycine max (L.) Merrill cultivar santa-rosa.

O máximo da atividade da enzima NR-ase ocorreu no início da floração, diminuindo rapidamente durante a formação de vagens, mesmo com adubação parcelada de nitrogênio. A atividade máxima da enzima N_2 -ase (C_2H_2) ocorreu após o pico da atividade da NR-ase e permaneceu alta durante a formação de vagens e enchimento dos grãos (68% da atividade máxima da N_2 -ase foi mantida nas plantas testemunhas com sementes contendo 66% do peso fresco total). Isso indica que a maior contribuição do $N-NO_3^-$ proveniente do solo se deu antes da floração, enquanto o N proveniente da simbiose foi mais importante durante a granação da soja. Observou-se além da atividade da N_2 -ase, alta atividade da NR-ase nos nódulos durante todo o ciclo da planta. Com aumento dos níveis de adubação nitrogenada ocorreu diminuição na quantidade de nitrogênio fixado pela simbiose e nenhum aumento da produção de grãos.

SUMMARY: NITROGENASE AND NITRATE REDUCTASE ACTIVITIES IN FIELD SOYBEAN AS Affected BY NITROGEN FERTILIZER

A field experimental with 4 nitrogen levels and 6 replications was carried out to study the nitrogenase (N_2 -ase - C_2H_2) and nitrate reductase activity patterns, plant nitrogen accumulation and grain yield in Glycine max (L.) Merrill cultivar Santa Rosa.

The maximum NR-ase activity was reached at early flowering, with a rapid decline at pod filling stage. The maximum N_2 -ase activity was reached at early pod filling and maintained during grain filling stage (Sixty eight percent of the maximum N_2 -ase activity was maintained in control plants bearing seeds with 66% of total fresh weight). These results indicate that the soil nitrogen is used early in plant growth whereas most of the symbiosis contribution is later in the cycle, at pod and grain filling stages. Besides the N_2 -ase activity in the nodules it was recorded a very high NR-ase activity during the whole plant cycle. Increasing nitrogen fertilizer, increased total plant nitrogen, decreased nitrogen fixation and resulted in no grain yield increase.

INTRODUÇÃO

A soja alcançou posição de destaque como fonte de proteína para a alimentação tanto do homem, como dos animais. Seu potencial genético permite produções 3 a 4 vezes superiores à média atual ao considerarmos as produções de até 6.300 kg/ha mencionadas por Scott e Aldrich (1970). O nitrogênio é um dos responsáveis pela baixa produção, não só pela disponibilidade mas também pela quantidade de energia gasta pela planta para sua assimilação.

Segundo Hardy *et alii* (1971) a fixação do nitrogênio atmosférico aparece normalmente entre 3 e 5 semanas após o plantio. O nitrogênio que supre as plantas até então é oriundo das sementes e do solo. A demanda de nitrogênio nessa fase é baixa; entretanto, em solos extremamente deficientes, pequena dose de N mineral

aplicada no plantio poderia estimular maior crescimento inicial das plantas e, em consequência, aumentar a nodulação e a produção de grãos. No entanto, Hathcock (1975) testou vários níveis de nitrogênio aplicados no plantio, em dois solos com menos de 1,5% de matéria orgânica e não obteve aumento da produção.

A habilidade da soja em usar simultaneamente nitrogênio do solo e N_2 atmosférico tem mascarado respostas à adubação nitrogenada. Em experimentos com linhagens de soja que não nodulam, são necessárias doses extremamente altas de adubos nitrogenados (acima de 200 kg/ha) para obter produções equivalentes às das isolinhas que nodulam (Bhangoo e Albitton, 1975; Pal e Saxena, 1975). A redução de nitrato a nitrito pode ser considerada fator limitante da incorporação de $N-NO_3^-$ em proteínas (Beevers e Hageman, 1969). A medida dessa atividade nas folhas serve como indicadora da redução de nitrato na soja (Hatam e Hume, 1976); portanto, ser usada como indicadora da assimilação de nitrogênio do solo. A atividade da N_2 -ase medida pela redução do C_2H_2 é indicadora do potencial de fixação de N_2 atmosférico no sistema. Thibodeau e Jaworski (1975), Hardy *et alii* (1968) e Lawn e Brun (1974) constataram uma

⁽¹⁾ Contribuição do Programa de Cooperação Internacional em Treinamento e Pesquisa Básica em Fixação de Nitrogênio nos Trópicos. Apresentado no XVI Congresso Brasileiro de Ciência do Solo. Recebido para publicação em agosto de 1977 e aprovado em março de 1978.

⁽²⁾ Pesquisador da EMBRAPA, UEPAE de Itaguaí - RJ.

⁽³⁾ Eng. Agrônomo trabalhando no Programa de Fixação de Nitrogênio, Convênio CNPq-EMBRAPA-UFRJ.

⁽⁴⁾ Pesquisador da EMBRAPA, atualmente no CNPM-Sorgo, Sete Lagoas - MG.

relação inversa entre as atividades da NR-ase e nitrogenase (N_2 -ase) durante o ciclo da planta parecendo razoável sugerir que a energia requerida em ambos os processos é suficientemente grande para impedir que atividades altas ocorram simultaneamente.

O objetivo deste trabalho foi estudar no campo a nutrição nitrogenada da soja através da determinação das atividades das enzimas N_2 -ase e NR-ase e a acumulação de nitrogênio durante todo o ciclo da soja.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em área da EMBRAPA-UEPAE-Itaguaí, RJ, em solo Podzólico Vermelho-Amarelo da Série Itaguaí, cuja análise química mostrou: 7 ppm de fósforo; 111 ppm de potássio; 4 mE de $Ca^{++} + Mg^{++}/100\text{ cm}^3$; 0,2 mE de $Al^{+++}/100\text{ cm}^3$ e $pH = 5,5$.

O delineamento experimental usado foi o de blocos ao acaso com 6 repetições e 4 níveis de nitrogênio; 0,50, 100 e 150 kg por hectare. A adubação de nitrogênio foi feita em 3 vezes, uma, quatro e oito semanas após o plantio. Usou-se nitrocálcio com 13,5% de N na forma nitríca e 13,5% de N na forma amoniacal. O tamanho das parcelas foi de 5 x 7 m com 0,7 m entre linhas deixando-se, após o desbaste, 20 plantas por metro de linha.

O preparo do terreno constou de 2 araduras e 3 gradagens. Foram aplicadas 2 toneladas de calcário por hectare, sendo uma de calcítico e uma de dolomítico, 25 dias antes do plantio. Foram aplicados 80 kg/ha de P_2O_5 na forma de superfosfato simples, 20 kg/ha de K_2O na forma de cloreto de potássio e 40 kg/ha de «Fritted Trace Elements» Br-14. Foi usado o cultivar de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) santa rosa inoculado com as estípites de *Rhizobium japonicum*, R.54a + CB-1809, em «pellet» com $CaCO_3$ misturado ao FTE. O plantio foi feito em 11/11/75 e a colheita para produção de grãos em 7 e 22/04/76.

Durante o experimento foram feitas duas pulverizações com Carvin 85M, pó molhável, para combater o ataque de insetos sugadores, que mesmo assim afetaram a produção de grãos.

Durante todo o ciclo da planta foram feitas colheitas para determinação das atividades das enzimas nitrogenase e nitrato-redutase, peso seco dos nódulos e nitrogênio total das plantas. Todas as colheitas tiveram início às nove horas da manhã. No dia 14/01/76 foram feitas colheitas com intervalos de uma ou duas horas, das 5 h da manhã até 1 h do dia seguinte, para relacionar as atividades das enzimas medidas às 9 h com as atividades totais do dia.

Determinação da atividade da nitrato-redutase (NR-ase) - Em cada amostragem, os folíolos centrais da folha mais nova com máxima expansão foram coletados de 10 plantas de cada parcela e colocados superpostos para retirada de discos de 1 cm de diâmetro, com um furador de rolhas. Apesar de serem misturados, 3 subamostras de 200 mg foram usadas para determinação da atividade da NR-ase segundo Harper e Hageman (1972). As leituras foram feitas em espectrofotômetro Coleman usando filtro de 540 nm. A determinação da atividade da NR-ase nos nódulos foi feita usando subamostras de nódulos cortados e o mesmo procedimento descrito para as folhas.

Determinação da atividade da nitrogenase (N_2 -ase) - Foram removidas do solo as dez plantas de cada parcela usadas para determinação da atividade da NR-ase; as raízes noduladas foram colocadas dentro de frascos de 3.000 ml, dos quais foi substituído 12% do ar atmosférico por acetileno. Após uma hora de incubação à temperatura ambiente, amostras de 0,5 ml do gás foram retiradas e injetadas em um cromatógrafo de gás Perkin Elmer F-11, com coluna de 0,3 x 100 cm com Poropak N, e nitrogênio como gás de arraste, para determinação do etileno produzido.

Nitrogênio total - As determinações do N total das plantas foram feitas pelo método semi-micro de Kjeldahl de uma subamostragem das dez plantas previamente moídas.

Determinação do peso seco dos nódulos - Após o ensaio para determinação da atividade da N_2 -ase, os nódulos foram destacados das raízes e secos em estufa de circulação de ar a 60°C; após 72 horas foram pesados.

Na apresentação dos resultados, as linhas verticais nas figuras representam o desvio-padrão das médias das seis repetições.

RESULTADOS

Os dados das atividades das enzimas N_2 -ase (C_2H_2) e NR-ase estão apresentados na Figura 1B, estando somente representados a teste-munha e o tratamento com adubação máxima de nitrogênio (150 kg/ha). Os tratamentos com adubações intermediárias apresentaram valores também intermediários e com a mesma tendência. O aumento da disponibilidade de nitrogênio no solo aumentou a atividade da NR-ase e diminuiu a atividade da N_2 -ase. Entretanto,

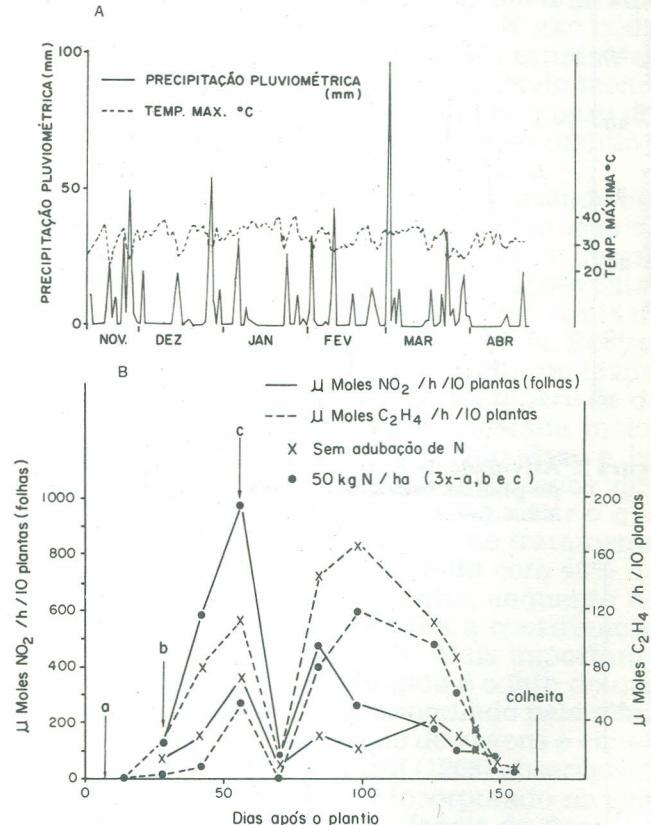


Figura 1.A. Temperatura e precipitação locais durante o experimento.

Figura 1.B. Atividade das enzimas nitrogenase (—) e nitrato redutase (---) durante o ciclo da soja. Cada ponto representa médias de 6 repetições. Os desvios-padrões dos dados analisados em conjunto foram para N_2 -ase 23,00 e para NR-ase 18,56.

mesmo no nível máximo de adubação ocorreu apreciável fixação de nitrogênio. Foi também observado que o máximo da atividade da NR-ase ocorreu entre 50 e 60 dias após o plantio, decrescendo rapidamente na fase de formação de vagens, independentemente da adubação parcelada do nitrogênio. A atividade da N_2 -ase manteve-se alta em todos os tratamentos, até 100 dias após o plantio, englobando, assim, o período de formação das vagens e parte de enchi-

mento dos grãos, que é o mais crítico quanto à nutrição nitrogenada. A amostragem realizada após um período de duas semanas sem chover, juntamente com altas temperaturas, na segunda quinzena de janeiro (Figura 1A), mostrou praticamente nenhuma atividade de ambas as enzimas, com recuperação imediata na colheita seguinte, após ter chovido. Isso indica que a falta de atividade de ambas enzimas foi devida a causa temporária, além do efeito físico direto da falta de água, provavelmente à falta de energia, pela inativação da fotossíntese decorrente do fechamento dos estômatos.

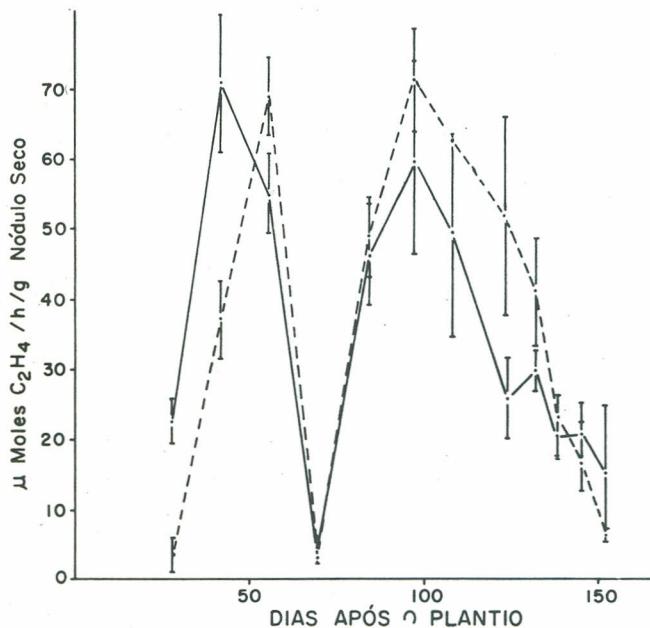


Figura 2. Atividade de N₂-ase (C₂H₂) específica nos nódulos de plantas sem (—) e com adubação de 150 kg N/ha (---).

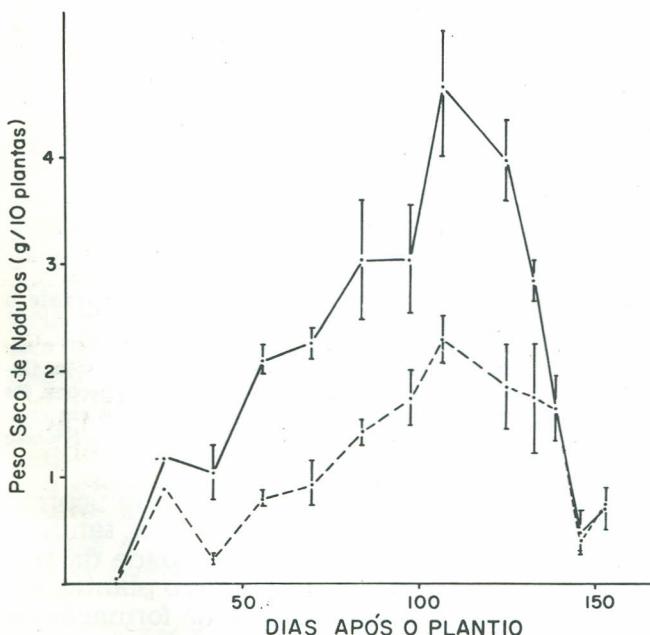


Figura 3. Formação de nódulos em plantas sem (—) e com adubação de 150 kg de N/ha (---).

Na Figura 2 são apresentados os resultados da atividade específica da N₂-ase (C₂H₂)

mostrando que o máximo foi alcançado antes da floração, sendo que o aumento da atividade total que ocorreu desse período até a formação das vagens foi devido ao aumento do peso dos nódulos (Figura 3). A presença do N mineral atrasou a produção de nódulos mas não diminuiu a sua eficiência em fixar N₂ atmosférico. Deve ser ainda ressaltado que a falta de chuva ocorrida no mês de janeiro diminuiu a atividade da N₂-ase (Figura 2) mas não causou queda da nodulação (Figura 3).

Durante todo o experimento foi determinada, além da atividade da N₂-ase (C₂H₂), a atividade da NR-ase nos nódulos (Figura 4). A atividade da NR-ase específica foi sempre mais alta nos nódulos que nas folhas, mas com uma variação de atividade durante o ciclo similar à das folhas. Essa atividade nos nódulos representou em média 10% da atividade total das folhas mais nódulos, sendo maior que 20% na fase crítica de formação de grãos.

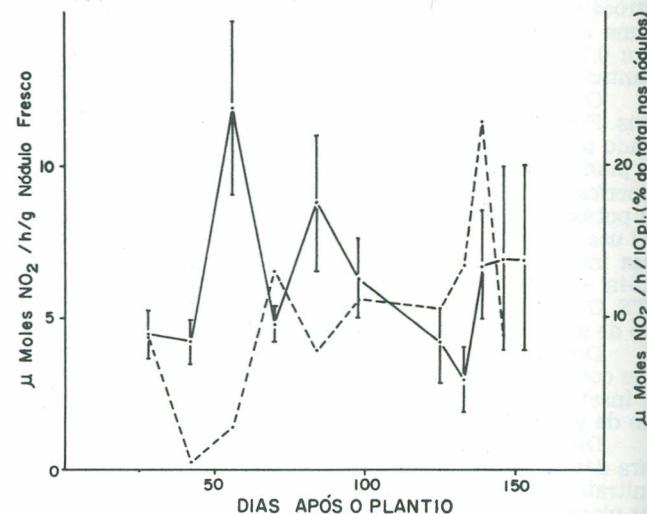


Figura 4. Atividade da NR-ase nos nódulos (—) e percentagem do total (folhas + nódulos) determinada nos nódulos (---).

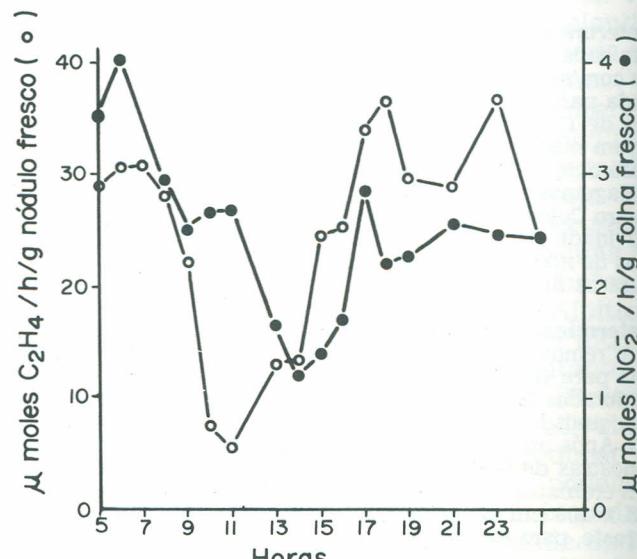


Figura 5. Flutuação das atividades das enzimas N₂-ase (desvio-padrão = 4,89) e NR-ase (desvio-padrão = 0,72) durante um dia.

A determinação da flutuação das atividades das enzimas N_2 -ase e NR-ase durante todo um dia mostrou queda de atividade de ambas as enzimas no período de maior insolação (Figura 5), sendo a atividade da N_2 -ase mais afetada que a atividade da NR-ase.

O fator de correção para as determinações da atividade da N_2 -ase às 9 h em relação à média diária foi de 1,18. Com esse fator foi possível fazer uma estimativa do nitrogênio fixado por dia e proceder à integração do nitrogênio que potencialmente poderia ser fixado durante o ciclo da planta. Na Figura 6 são apresentados esses dados e o nitrogênio total das plantas determinado pelo método de Kjeldahl nos tratamentos-testemunha e com a maior adubação de nitrogênio, os dois tratamentos intermediários apresentaram resultados similares intermediários. A adubação de N mineral diminuiu a fixação do N_2 atmosférico e aumentou o N total das plantas, aumento este que não correspondeu em aumento de produção de grãos. As produções obtidas foram: 1.528, 1.761, 1.451 e 1.377 kg/ha respectivamente para a testemunha e adubação com 50, 100 e 150 kg de N/ha com valor $F = 0,459$ (não significativo) entre tratamentos.

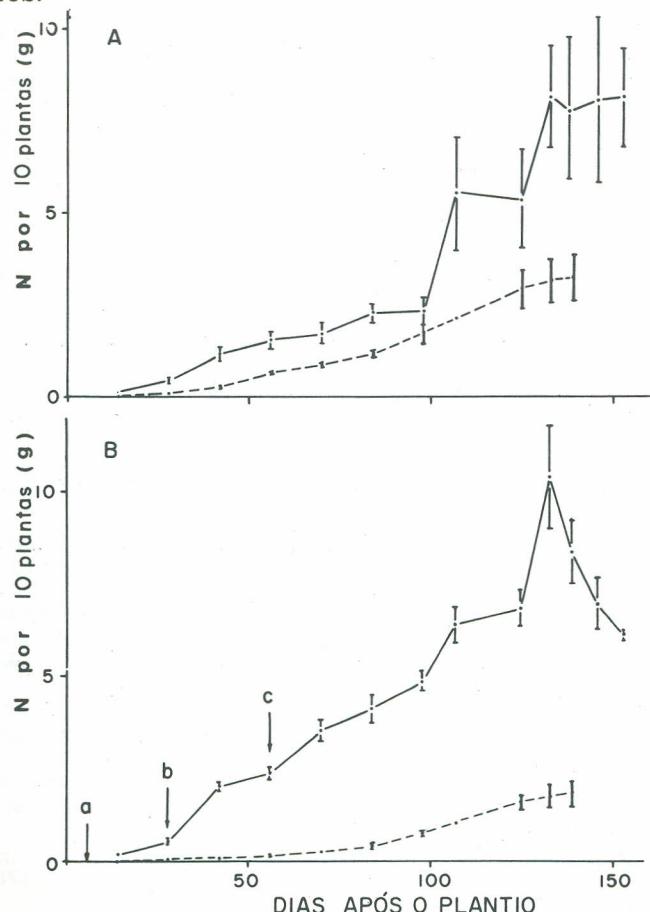


Figura 6. Nitrogênio total determinado nas plantas (—) e estimado pela redução do C_2H_2 (---) nas plantas sem (A) e com adubação de 150 kg N/ha (B).

DISCUSSÃO

A distribuição das atividades das enzimas N_2 -ase (C_2H_2) e NR-ase durante o ciclo da soja

obtidos neste experimento concordam com os resultados obtidos por Hardy *et alii* (1971) e Weber *et alii* (1971) para a N_2 -ase; Harper e Hageman (1972) para NR-ase e Thibodeau e Jaworski (1975) para ambas as enzimas. As atividades das duas enzimas em parte se superpõem, sendo que o máximo das intensidades é sucessivo; o da NR-ase ocorre no início da floração e o da N_2 -ase durante a formação de vagens. Estes resultados mostram que a adubação de nitrogênio depois do estabelecimento da soja bem nodulada não resulta em benefício para a produção de grãos, pelo menos no cultivar e estirpes de *Rhizobium* usados. Na maioria dos solos cultiváveis a necessidade de nitrogênio no início do crescimento das plantas não é grande, podendo ser satisfeita pelo nitrogênio proveniente da semente e do solo. Entretanto, para solos extremamente deficientes em nitrogênio uma adubação inicial com doses baixas de N não poderia ser desprezada. Hathcock (1975) estudou essa possibilidade em dois solos contendo menos de 1,5% de matéria orgânica, usando quatro doses baixas de nitrogênio aplicadas no plantio e não obteve nenhuma resposta positiva.

O cálculo do nitrogênio fixado usando atividade da nitrogenase medida pela redução do C_2H_2 foi feito sempre às 9 h com um fator de correção calculado a partir de determinações feitas a cada hora das 5 à 1 h do dia seguinte, em 14 de janeiro, no início da floração (Figura 5). Por ser um período muito quente, sem muita umidade, houve queda da atividade durante o período de maior insolação, quando seria esperada maior atividade, como observado por Thibodeau e Jaworski (1975). Dessa forma os resultados que aparecem na Figura 5 devem subestimar o que realmente ocorreu. Mesmo assim no tratamento testemunha a simbiose contribuiu com 40% do nitrogênio incorporado na planta, enquanto no tratamento com 150 kg de N/ha a contribuição da simbiose desceu para 16%. Mais importante ainda que o percentual atingido é o fato de que esse nitrogênio está sendo assimilado pela planta na fase crítica de formação de vagens e enchimento de grãos. Hardy *et alii* (1968) observaram que 75 a 90% de nitrogênio incorporado na soja através da simbiose ocorria depois da floração, e que somente 25% do total do nitrogênio da planta vinha da simbiose. Entretanto esses autores não deram a necessária ênfase no que a contribuição da simbiose poderia representar para a produção de grãos. Também não foi avaliada a disponibilidade de N nos solos. As observações de que a contribuição da simbiose e o início da fixação ocorreram 3-5 semanas após o plantio são parecidas com as obtidas em nosso experimento com adubação nitrogenada. A N_2 -ase na testemunha, com 14 dias já apresentava atividade de redução de 0,19 umoles $C_2H_2.h^{-1}$. planta⁻¹.

Harper (1971) observou absorção máxima de nitrato em soja crescendo em solução nutritiva, 87 a 97 dias após o plantio. Os resultados da Figura 1 e de Harper e Hageman (1972) mostram que nessa fase do ciclo da planta, a ativi-

dade da NR-ase nas folhas é muito baixa. Atividade da NR-ase nos nódulos de soja já foi observada anteriormente (Evans, 1954) sem, entretanto, ter sido relacionada com a possibilidade de ser um processo assimilatório de N do solo. W.J. Russell, D.R. Johnson e D.D. Randall da Universidade de Missouri (trabalho ainda não publicado) observaram 1,5% de excesso de ^{15}N , em forma reduzida em exsudatos coletados na haste, uma a duas horas após adição de excesso $^{15}\text{NO}_3^-$ às raízes de soja bem noduladas. Como as raízes não mostraram atividade de NR-ase os autores atribuíram a redução do NO_3^- aos nódulos. Nódulos do presente experimento mostraram atividade da NR-ase durante todo o ciclo da planta mas não mostraram atividade da nitrito-reductase. Se a redução de nitrato nos nódulos representa um processo assimilatório de nitrogênio do solo, teria grande importância principalmente na fase final do ciclo, quando a redução de NO_3^- é mínima nas folhas.

São necessárias quantidades extremamente altas de nitrogênio (200 a 300 kg/ha) para que isolinhas de soja não noduladas tenham produções equivalentes às de isolinhas noduladas (Pal e Saxena, 1975; Bhangoo e Albritton, 1975). Pal (1975) usando isolinhas não nodulantes, comparadas com as nodulantes obteve valores de 57 a 83% de N provenientes da simbiose em plantas sem adubação nitrogenada e de 18 a 32% nas plantas que receberam 200 kg N/ha. Esses resultados são muito superiores aos encontrados pela integração somente da atividade de N_2 -ase (C_2H_2). Várias hipóteses podem ser levantadas para explicar isso, com a maior energia requerida para expandir o sistema radicular nas isolinhas não noduladas (Weber, 1966), a complementação das duas fontes, decorrentes da sucessão da atividade da NR-ase e N_2 -ase e da redução de nitrato nos nódulos, principalmente no fechamento do ciclo, quando a atividade nas folhas é praticamente nula, se for comprovado que este é um processo assimilatório de nitrogênio do solo. Além disso, as dificuldades de se obterem valores absolutos corretos pela integração das medidas da atividade na N_2 -ase provavelmente são as principais causas daquela discrepância.

CONCLUSÕES

1. O cultivar de soja santa-rosa apresentou o máximo de redução de nitrato no início da floração, diminuindo rapidamente durante a formação de vagens. O máximo da fixação do N_2 atmosférico ocorreu durante a formação de vagens e manteve-se durante o enchimento de grãos, apresentando uma atividade de 68% do máximo quando as sementes já haviam atingido 66% do peso verde total.

2. O aumento da adubação nitrogenada resultou em aumento do N total das plantas, em diminuição da fixação de N_2 atmosférico, e em nenhum aumento significativo da produção de grãos. Portanto, o N proveniente da simbiose foi mais importante para a formação dos grãos.

3. A contribuição do N proveniente da simbiose foi calculado em 40% para a testemunha e 16% para a adubação com 150 kg N/ha, com valores intermediários para adubações de 50 a 100 kg N/ha.

4. Além da N_2 -ase foi observada uma atividade da NR-ase nos nódulos durante todo o ciclo da planta, constituindo em média 10% da atividade total somada à das folhas, mas sendo maior na fase final do ciclo da planta.

5. Os resultados obtidos neste experimento e em trabalhos recentes, aqui mencionados, indicam que a adubação com nitrogênio no solo, resulta praticamente em nenhum benefício para a produção de grãos.

LITERATURA CITADA

- BEEVERS, L. & HAGEMAN, R.H. - Nitrate reductase in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 20: 495-522, 1969.
- BHANGOO, M.S. & ALBRITTON, D.J. - Response of nodulating and nonnodulating soybean isolines to applied nitrogen. *Ark. Farm Res.*, 24:6, 1975.
- EVANS, H.J. - Diphosphopyridine nucleotide - nitrate reductase from soybean nodules. *Plant Physiol.*, 29: 298-301, 1954.
- HARDY, R.W.F.; HOLSTEN, R.D.; JACKSON, E.K. & BURNS, R.C. - The acetylene - ethylene assay for N_2 -fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.*, 43: 1185-1207, 1968.
- HARDY, R.W.F.; BURNS, R.C.; HEBERT, R.R.; HOLSTEN, R.D. & JACKSON, E.K. - Biological nitrogen fixation: a key to world protein. In: Lie, T.A. & Mulder, E.G., ed. *Biological nitrogen fixation in natural and agricultural habitats*. Plant and Soil, Spec. vol., The Hague: Nijhoff, 1971, p.561-590.
- HARPER, J.E. - Seasonal nutrient uptake and accumulation patterns in soybeans. *Crop Sci.*, 11: 347-350, 1971.
- HARPER, J.E. & HAGEMAN, R.H. - Canopy and seasonal profiles of nitrate reductase in soybeans. *Plant Physiol.*, 49:146-154, 1972.
- HATAM, M. & HUME, D.J. - Relations between nitrate reductase activity and nitrogen accumulation in soybeans. *Can. J. Plant. Sci.*, 56: 377-384, 1976.
- HATHCOCK, B.R. - Effects of applied nitrogen on juvenile growth and nodulation of soybeans. Tennessee Farm and Home Science, Report 96:32-33, 1975.
- LAWN, R.J. & BRUN, W.A. - Symbiotic nitrogen fixation in soybeans. I Effect of photosynthetic source - sink manipulations. *Crop Sci.*, 14: 11-16, 1974.
- PAL, U.R. - Contribution of symbiosis to the nitrogen needs of soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Acta Agro-nomica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 24: 430-436, 1975.
- PAL, U.R. & SAXENA, M.C. - Responses of soybean to symbiosis and nitrogen fertilization under humid subtropical conditions. *Expl. Agric.*, 11:221-226, 1975.
- SCOTT, W.O. & ALDRICH, S.R. - Fertilizer for soybeans. In: Barksdale, B., ed. *Modern soybean production*. Cincinnati, Ohio: The Farm Quarterly: p.98, 1970.
- THIBODEAU, P.S. & JAWORSKI, E.G. - Patterns of nitrogen utilization in the soybean. *Planta (Berl.)*, 127: 133-147, 1975.
- WEBER, C.R. - Nodulating and non-nodulating soybean isolines. II. Response to applied nitrogen and modified soil conditions. *Agron. J.*, 58:46-49, 1966.
- WEBER, D.F.; CALDWELL, B.E.; SLOGER, C. & VEST, H.C. - Some USDA studies on the soybean - *Rhizobium* symbiosis. In: Lie, T.A. & Mulder, E.G., ed. *Biological nitrogen fixation in natural and agricultural habitats*. Plant and Soil, Spec. vol., The Hague: Nijhoff, 1971, p.561-590.