

COMISSÃO III - BIOLOGIA DO SOLO

RELAÇÃO ENTRE CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS NO INOCULANTE E COMPETIÇÃO POR SÍTIOS DE INFECÇÃO NODULAR ENTRE ESTIRPES DE *RHIZOBIUM JAPONICUM* EM SOJA ⁽¹⁾

J. R. R. PERES ⁽²⁾ & C. VIDOR ⁽³⁾

RESUMO

Estudou-se o efeito de misturas contendo diferentes relações de concentração de células viáveis sobre a competição de duas estirpes de *R. japonicum* por sítios de infecção nodular em quatro cultivares de soja ('Bragg', 'Santa-Rosa', 'UFV-1' e 'IAC-2'). Foram utilizadas as estirpes 587 e 5019, identificadas como as mais competitivas em experimentos prévios de seleção de estirpes de *R. japonicum*. A pesquisa foi conduzida em casa de vegetação num Latossolo Vermelho-Escuro (solo originalmente sob vegetação de cerrado) contendo baixa população de *R. japonicum* (< 10 células g^{-1} de solo seco). Cada estirpe foi usada na concentração de 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 células g^{-1} de inoculante, mantendo-se a dosagem mínima e variando as demais para cada estirpe. As plantas foram colhidas 65 dias após a semeadura, para avaliação da quantidade e peso de nódulos secos, bem como do peso de matéria seca e N-total da parte aérea.

Quando as estirpes foram utilizadas na mesma concentração ($10^3 : 10^3$), a porcentagem de ocorrência das estirpes nos nódulos foi semelhante. Entretanto, a porcentagem de nódulos induzidos pelas duas estirpes esteve em torno de 80 e 20 quando a concentração de uma era dez vezes superior à da outra. Quando a relação de concentração entre as estirpes era igual ou superior a cem vezes, a porcentagem de ocorrência foi superior a 90 de uma sobre a outra, com raras exceções.

Os resultados demonstram que pode haver uma modificação na competição por sítios de infecção nodular, quando se utilizam diferentes relações de concentração entre estirpes altamente competitivas.

SUMMARY: RELATIONSHIP BETWEEN INOCULUM RATES AND COMPETITIVENESS FOR NODULE SITES BETWEEN TWO *RHIZOBIUM JAPONICUM* STRAINS ON SOYBEAN

Competitiveness for nodule sites on soybean cultivars ('Bragg', 'Santa-Rosa', 'UFV-1', and 'IAC-2') between two *R. japonicum* strains as affected by different ratios of concentration between the strains was studied. The experiment was carried out in greenhouse in a soil (Acrustox) with low native *R. japonicum* population (< 10 cells g^{-1} dry soil). Each strain was used in rates of 10^3 , 10^4 , 10^5 , and 10^6 cells g^{-1} inoculant, maintaining the minimum rate and varying the others for each strain.

There was no dominance for nodule sites when the strains were mixed at ratio 1 : 1 ($10^3 : 10^3$). However, at ratio 10:1, the percentages of occurrence in the nodules were about 80 and 20 respectively. At ratio 100:1 or higher there was a complete dominance of the strain present in higher concentration in the inoculant, occurring in most cases in more than 90% of the nodules. The results show that competitiveness for nodule sites can change by using different ratios of concentration between highly competitive strains.

INTRODUÇÃO

A obtenção de estirpes de *R. japonicum* de alta eficiência em fixar o N_2 continua sendo uma meta importante para aumentar a produtividade da soja.

O cultivo contínuo com soja cria condições para estirpes competitivas de *R. japonicum* se estabelecerem. Muitas vezes, grande porcentagem dos nódulos pode estar relacionada com estirpes ineficientes, resultando em maior população dessas estirpes. Esse fato pode levar ao insucesso no estabelecimento de estirpes de

maior eficiência no solo, quando não se conhecem suas habilidades competitivas na formação de nódulos, em comparação com estirpes nativas ou naturalizadas (Freire & Vidor, 1978).

Diferenças na competição por sítios de infecção nodular entre estirpes de rizóbio em areia e em solo contendo baixa população de rizóbio têm sido demonstradas por vários pesquisadores (Johnson *et alii*, 1965, Vidor, 1977, Vidor *et alii*, 1979, e Peres & Vidor, 1980). Entretanto, a introdução de estirpes eficientes em solos contendo alta população de rizóbio indica pouco sucesso delas em competir efetivamente na for-

⁽¹⁾ Parte da dissertação de Mestrado em Agronomia (Solos) apresentada pelo primeiro autor à Faculdade de Agronomia/UFRGS em 1979. Recebido para publicação em março de 1980 e aprovado em novembro de 1980.

⁽²⁾ Engenheiro Agrônomo, CPAC/EMBRAPA. Planaltina (DF).

⁽³⁾ Engenheiro Agrônomo, Equipe de Microbiologia do Solo, IPAGRO, Secretaria da Agricultura (RS), e Prof. Adjunto do Depto. de Solos/UFRGS, Porto Alegre (RS). Bolsista do CNPq.

mação de nódulos com as estirpes nativas ou naturalizadas (Johnson *et alii*, 1965, Weaver & Frederick, 1974, e Vidor, 1977). Portanto, a busca de estirpes eficientes e de alta capacidade competitiva por sítios de infecção nodular, em solos com população estabelecida do rizóbio específico, assume uma importância fundamental na recomendação de estirpes aos fabricantes de inoculantes. Caso contrário, poder-se-á correr o risco de obter inoculantes contendo estirpes de alta eficiência, mas de baixa competição por sítio de infecção nodular. Entretanto, deve-se conhecer inicialmente o grau de competição entre estirpes utilizadas em mistura em solos contendo baixa população do rizóbio específico para, então, numa etapa posterior, avaliar suas capacidades competitivas em solos contendo população estabelecida.

Esta pesquisa teve como objetivo principal estudar o efeito de misturas contendo diferentes relações de concentração de células viáveis no inoculante, sobre a competição por sítios de infecção nodular, entre duas estirpes de *R. japonicum* em soja, num solo contendo baixa população do rizóbio.

MATERIAL E MÉTODOS

Uma porção de aproximadamente 600kg da camada superficial (0-20cm) de um Latossolo Vermelho-Escuro, distrófico e textura argilosa (solo originalmente sob vegetação de cerrado), foi coletada no Centro de Pesquisas Agropecuárias dos Cerrados (CPAC) em 1978. A área havia sido cultivada com arroz de sequeiro, onde se utilizou uma adubação de manutenção da ordem de 300kg/ha da fórmula 14-16-8 suprida com zinco no sulco. Em 1976 foi feita uma calagem de 4t/ha de calcário dolomítico e uma adubação corretiva de 240kg/ha de P_2O_5 , na forma de superfosfato triplo aplicado a lanço, e 100kg/ha de K_2O na forma de cloreto de potássio no sulco.

O solo foi seco ao ar, peneirado e armazenado em sacos de polietileno até o momento de instalação do experimento, que foi conduzido em casa de vegetação pertencente ao Departamento de Solos/UFRGS, Porto Alegre (RS). As plantas foram cultivadas em vasos com 2kg de solo. Antes de colocar o solo nos vasos, fez-se uma complementação com fósforo (100 ppm de P), na forma de NaH_2PO_4 , e de potássio (50 ppm de K) na forma de KCl. Os sais foram utilizados em solução numa quantidade de água destilada necessária para elevar a umidade do solo a 31% (sua capacidade de campo era de 28%) no dia da semeadura, fazendo-se a correção para esse nível diariamente durante a execução do experimento.

O experimento foi um fatorial incompleto, utilizando-se o delineamento experimental em blocos ao acaso com quatro repetições. Utilizaram-se os cultivares «Bragg», «Santa-Rosa», «UFV-1» e «IAC-2», bem como as estirpes 587 e 5019, identificadas como as mais competitivas em experimentos prévios de seleção de estirpes de *R. japonicum* (Peres & Vidor, 1980). Essas duas estirpes foram fornecidas pela Equipe de Microbiologia do Solo/IPAGRO, Secretaria da Agricultura (RS), sendo que a 587 foi isolada no Rio Grande do Sul (isolamento n.º 6/67) e, a 5019, no Rio de Janeiro pela EMBRAPA/UEPAE-ITAGUAI, km 47, onde recebeu a denominação 29W. Foram utilizadas as seguintes relações de concentração entre ambas as estirpes: $A_{10}^3B_{10}^3$; $A_{10}^3B_{10}^1$; $A_{10}^3B_{10}^2$; $A_{10}^3B_{10}^4$; $A_{10}^3B_{10}^5$ e $A_{10}^3B_{10}^6$ células g^{-1} de inoculante e uma testemunha para avaliar a capacidade do solo em suprir nitrogênio para as plantas. As letras A e B correspondem, respectivamente, às estirpes 587 e 5019.

As sementes foram esterilizadas superficialmente com etanol 95% por cinco minutos e $HgCl_2$ 0,1% por dois minutos, antes de sete lavagens sucessivas com água destilada esterilizada. Foram utilizadas seis sementes por vaso e, uma

semana após a germinação, deixaram-se duas plantas por vaso.

As estirpes de *R. japonicum* foram cultivadas em meio líquido manitol-extrato de levedura por quatro dias, centrifugadas e lavadas com solução fisiológica. Em seguida foram ressuspensas com 5ml de solução fisiológica, e a turbidez final das células foi ajustada para 40 unidades num colorímetro fotoelétrico (Klett-Somerson), obtendo-se uma concentração em torno de cem milhões de células viáveis por mililitro de suspensão determinada segundo a técnica de diluição em placas.

As relações de concentração dos inoculantes foram feitas de acordo com a seguinte metodologia: a suspensão de células de cada estirpe inicialmente ajustada para 40 unidades Klett ($\approx 10^8$ células viáveis ml^{-1}) foi diluída com solução fisiológica esterilizada para 10^7 ; 10^6 ; 10^5 e 10^4 células viáveis ml^{-1} e, então, feitas as misturas de acordo com as combinações desejadas. Na obtenção da relação de concentração $A_{10}^3B_{10}^3$ foram utilizados 7ml da suspensão 10^4 células viáveis ml^{-1} da estirpe 587 e 8ml da suspensão 10^4 células viáveis ml^{-1} da estirpe 5019, obtendo-se 15ml de uma suspensão contendo em torno de 10^4 células viáveis ml^{-1} . Esse volume foi adicionado a 50g de turfa seca esterilizada, resultando numa concentração final em torno de $2,3 \times 10^3$ células viáveis g^{-1} de inoculante. O mesmo procedimento foi utilizado para preparar as demais combinações, usando-se as diluições apropriadas a cada uma. Os inoculantes foram armazenados em refrigerador (4°C) por três dias. No momento da semeadura foi feita a contagem do número de células viáveis nos inoculantes, segundo a técnica de diluição em placas, obtendo-se as seguintes concentrações: $A_{10}^3B_{10}^3$, 6×10^3 células g^{-1} ; $A_{10}^3B_{10}^1$, 6×10^4 células g^{-1} ; $A_{10}^3B_{10}^2$, 4×10^3 células g^{-1} ; $A_{10}^3B_{10}^4$, 5×10^6 células g^{-1} ; $A_{10}^3B_{10}^5$, 5×10^4 células g^{-1} ; $A_{10}^3B_{10}^6$, 5×10^5 células g^{-1} de inoculante.

A inoculação foi feita na hora da semeadura, usando-se 1g de inoculante por 10cm de sulco, simulado nos vasos. As plantas foram colhidas 65 dias após a semeadura para avaliações do peso de matéria seca e nitrogênio total da parte aérea, bem como número e peso de nódulos secos.

Foram utilizados 40 nódulos por vaso para avaliar a competição por sítios de infecção nodular entre as duas estirpes. Entretanto, o número insuficiente de nódulos em alguns tratamentos, aliado à impossibilidade de identificar a natureza da reação serológica em alguns nódulos, fez com que o número final de nódulos tipificados fosse variável entre os tratamentos (Quadro 3). A tipificação serológica foi feita através de reações de aglutinação entre antissoros específicos para as duas estirpes e nódulos de plantas inoculadas com as diferentes misturas das duas estirpes, segundo metodologia descrita por Vincent (1970).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A quantidade e o peso de nódulos foram influenciados positivamente pelo aumento da concentração de inóculo (Quadro 1). O aumento da concentração da estirpe 5019 no inoculante esteve associado com um aumento gradual do número e peso de nódulos, enquanto a 587 apresentou efeito menos pronunciado, principalmente na concentração $A_{10}^3B_{10}^3$, onde foram observados efeitos prejudiciais não identificados sobre a nodulação.

Os dados demonstram que a concentração mais baixa (6×10^3 células viáveis $vaso^{-1}$) foi insuficiente para aumentar consideravelmente o número e o peso de nódulos. Esse nível representa aproximadamente 0,25 vez a concentração mínima recomendada em número de células viáveis de rizóbio por semente (6 a 7×10^3) células semente $^{-1}$). O aumento do número e peso de nódulos resultante do aumento da concentração de inóculo sugere que, do ponto de vista prático, não se pode generalizar um número ótimo de células para inoculação, sendo necessário ter in-

formações mais precisas sobre os fatores do solo que influenciam a simbiose. Segundo Vincent (1974), em locais sem limitações de solo e clima, 100 a 1.000 células viáveis de rizóbio por semente seriam suficientes para proporcionar boa nodulação. Entretanto, para condições menos favoráveis e com população de rizóbio estabelecida, seriam necessárias de 10^5 a 10^6 células viáveis de rizóbio por semente. Esses dados vêm em apoio às observações feitas por Vilela *et alii* (1978), em pesquisas realizadas em solos de cerrados, nos quais encontraram a melhor nodulação em soja com a concentração de inoculante igual a dez vezes a quantidade recomendada, mostrando que os fatores limitantes do solo de

cerrados influenciam a nodulação nas doses normalmente utilizadas.

Observam-se diferenças não significativas no peso de matéria seca e N-total da parte aérea, com exceção do cultivar «UFV-1», que apresentou diferenças significativas entre níveis de inóculo para N-total (Quadro 2). A variação nos teores de N-total existente entre os cultivares, no mesmo nível de inóculo, pode ser resultante de diferenças nos potenciais genéticos e desenvolvimento vegetativo dos cultivares (Vidor *et alii*, 1972, e Vidor *et alii*, 1979). Esse fato reforça a proposição de Caldwell & Hartwig (1970), os quais demonstraram que a fixação do N_2 não pode ser vista isoladamente, sendo ne-

Quadro 1. Quantidade e peso de nódulos secos (mg/vaso) de quatro cultivares de soja cultivados em Latossolo Vermelho-Escuro (solo originalmente sob vegetação de cerrado), em resposta à inoculação com diferentes níveis de células de duas estirpes de *R. japonicum*. Médias de quatro repetições

Níveis de de inóculo	Quantidade de nódulos				Peso de nódulos secos			
	'Bragg'	'Santa-Rosa'	'UFV-1'	'IAC-2'	'Bragg'	'Santa-Rosa'	'UFV-1'	'IAC-2'
	n.º				g			
Test.	18d	7de	5c	4c	86c	33c	22c	48b
A ₃ B ₃	23cd	7de	12b	5b	129bc	81bc	181bc	47ab
A ₃ B ₄	47bc	41ab	35ab	8b	180bc	193ab	280a	65ab
A ₃ B ₅	75ab	75a	40a	8bc	246ab	241a	283a	74ab
A ₃ B ₆	94a	59ab	16abc	49a	336a	252a	172ab	198a
A ₄ B ₃	73ab	18cd	6c	4c	244ab	153abc	71bc	49b
A ₅ B ₃	12d	3e	3c	3c	87c	37c	56bc	61ab
A ₆ B ₃	62ab	35bc	25ab	14ab	237ab	197ab	137bc	114ab

CV = 24,10% para número de nódulos, dados transformados em $\sqrt{x+1}$.

CV = 46,70% para peso de nódulos secos.

OBS.: As letras A e B correspondem, respectivamente, às estirpes 587 e 5019 e, os índices 3, 4, 5 e 6, às concentrações de 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 células g^{-1} de inoculante.

Os números com as mesmas letras (colunas) não se diferenciam estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%

Quadro 2. Matéria seca e nitrogênio total de quatro cultivares de soja cultivados em Latossolo Vermelho-Escuro (solo originalmente sob vegetação de cerrado) em resposta à inoculação com diferentes níveis de células de duas estirpes de *R. japonicum*. Médias de quatro repetições

Níveis de inóculo	Matéria seca				Nitrogênio total			
	'Bragg'	'Santa-Rosa'	'UFV-1'	'IAC-2'	'Bragg'	'Santa-Rosa'	'UFV-1'	'IAC-2'
	g/vaso				mg/vaso			
Test.	6,78a	7,18a	6,18a	7,20a	77a	76a	61c	86a
A ₃ B ₃	6,34a	6,77a	6,96a	7,15a	75a	78a	106ab	82a
A ₃ B ₄	6,63a	6,63a	6,31a	6,68a	76a	91a	116a	100a
A ₃ B ₅	6,24a	6,51a	6,25a	6,73a	78a	83a	108a	95a
A ₃ B ₆	6,21a	6,61a	7,12a	6,44a	88a	105a	99ab	111a
A ₄ B ₃	6,33a	7,10a	6,63a	6,88a	84a	100a	86abc	101a
A ₅ B ₃	6,71a	7,02a	6,20a	7,26a	78a	77a	76bc	83a
A ₆ B ₃	6,85a	6,03a	6,58a	6,86a	88a	104a	96ab	105a

CV = 8,09% para matéria seca.

CV = 16,09% para N-total.

OBS.: As letras A e B correspondem, respectivamente, às estirpes 587 e 5019 e, os índices 3, 4, 5 e 6, às concentrações de 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 células g^{-1} de inoculante.

Os números com as mesmas letras (colunas) não se diferenciam estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

cessário levar em consideração a associação rizóbio-planta. Por conseguinte, num trabalho de seleção de estirpes de *R. japonicum* em diferentes cultivares, torna-se necessário avaliar o potencial de resposta desses cultivares à adubação nitrogenada para servir como parâmetro indicador do potencial das estirpes em fixar o N_2 .

A falta de resposta aos níveis de inóculo, em termos de matéria seca e N-total, pode ter sido influenciada pela presença de formas inorgânicas de nitrogênio existente no solo (60mg vaso^{-1}). Essa concentração de N-inorgânico contribuiu para o retardamento do efeito da fixação do N_2 , refletindo-se no conteúdo de N-total dos cultivares e determinando pouca diferença entre os níveis de inoculante. O conteúdo de N-total na testemunha representa um somatório entre o N-inorgânico existente inicialmente no solo; o nitrogênio proveniente da fixação pelos nódulos e, possivelmente, amônio e nitratos liberados no solo durante o período de desenvolvimento das plantas, uma vez que as análises de nitrogênio foram feitas em solo seco antes do início do experimento. Os primeiros sintomas visuais de deficiência de N (coloração verde-amarelada) começaram a aparecer na testemunha e no nível mais baixo de inóculo 40 dias após a semeadura. Essa deficiência também foi observada no tratamento $A10^3B10^3$, que apresentou baixo número e peso de nódulos. Apesar de não ter havido diferenças significativas, observa-se que o conteúdo de N-total nesses três tratamentos foi consistentemente mais baixo do que nos outros (Quadro 2).

A variação na concentração das estirpes no inoculante esteve intimamente associada com sua intensidade de ocorrência nos nódulos (Quadro 3). Quando as estirpes 587 e 5019 foram utilizadas na mesma concentração no inoculante ($A10^3B10^3$), as porcentagens de sua ocorrência nos nódulos foram semelhantes (45 e 52). Esse fato sugere que não existe predominância na formação de nódulos quando estirpes altamente competitivas por sítios de infecção nodular são usadas na mesma relação de concentração no inoculante. Entretanto, a porcentagem de nódulos formados pelos cultivares esteve em torno de 80 e 20 quando a concentração de uma estirpe era dez vezes superior à da outra. Quando a relação de concentração entre as estirpes era igual ou superior a cem vezes, a porcentagem de ocorrência foi superior a 90 de uma sobre a outra, com raras exceções. Os resultados evidenciam que a ocorrência dessas estirpes nos nódulos dependeu de suas concentrações no inoculante, confirmando, assim, os resultados obtidos por Weaver & Frederick (1974) e Kapusta & Rouwenhorst (1973). A alta capacidade competitiva evidenciada por essas estirpes, porém, não pode ser devidamente explicada, uma vez que os mecanismos reguladores desse fenômeno ainda não são devidamente conhecidos (Gibson, 1976). Por outro lado, Means *et alii* (1961) e Skrdleta & Karimova (1969) demonstraram que uma estirpe de *R. japonicum*, utilizada em mistura com outra estirpe, ocorreu em maior porcentagem nos nódulos de soja, mesmo em con-

centrações bastante inferiores a outra estirpe. Tal fato demonstra claramente que uma estirpe de alta eficiência fixadora, mas de baixa capacidade competitiva, dificilmente contribuirá significativamente na formação de nódulos, se estiver na presença de outra altamente competitiva.

Quadro 3. Ocorrência das estirpes de *R. japonicum* 587 e 5019 em nódulos de soja cultivada em Latossolo Vermelho-Escuro (solo originalmente sob vegetação de cerrado) em diferentes relações de concentração de inóculo em soja

Níveis de inóculo	Nódulos tipificados	587	5019	Sem reação
	n.º	%		
Testemunha	63	17	51	32
A_3B_3	123	45	52	3
A_3B_4	341	16	79	5
A_3B_5	389	2	98	0
A_3B_6	391	0	100	5
A_4B_3	201	78	17	5
A_5B_3	60	57	37	6
A_6B_3	321	93	6	1

OBS.: As letras A e B correspondem, respectivamente, às estirpes 587 e 5019 e, os índices 3, 4, 5 e 6, às concentrações de 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 células g^{-1} de inoculante.

A presença das estirpes 587 e 5019 na testemunha pode ser devida a uma possível contaminação na condução do experimento, ou presença de estirpes no solo com estrutura antigênica semelhante à das duas estirpes (Quadro 3). A ocorrência de 32% de nódulos sem reação na testemunha e 51% tipificados como pertencentes à estirpe 5019, que vem sendo utilizada em áreas experimentais próximas ao local de coleta do solo, reforça a hipótese da presença das estirpes em questão no local de coleta, uma vez que o uso continuado de implementos agrícolas poderia ter contribuído decisivamente no transporte de estirpes de *R. japonicum* de um local para outro.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que pode haver uma reversão na ocorrência de estirpes nos nódulos, quando se utilizam diferentes relações de concentração entre estirpes altamente competitivas. Poder-se-ia esperar, portanto, maior ocorrência nos nódulos da estirpe que estivesse em maior número junto à semente ou na superfície da raiz (Labandera & Vincent, 1975). Esse fato sugere que o uso de inoculantes contendo alta população das estirpes 587 e 5019, em solos com população estabelecida de *R. japonicum*, possibilitaria uma competição mais efetiva por sítios de infecção nodular pela estirpe de maior concentração no inoculante. Essa hipótese, porém, necessita ser confirmada em experimentos subseqüentes.

Uma estirpe de rizóbio introduzida através da inoculação pode não sobreviver no solo e estirpes menos eficientes podem ocorrer com maior frequência nos nódulos em anos subsequentes (Caldwell & Weber, 1970). Em nosso meio, tem sido dada pouca ênfase a estudos envolvendo a sobrevivência de estirpes de *R. japonicum* no solo. Alguns pesquisadores têm justificado esse fato em função de a soja ser uma cultura anual e, sua inoculação com estirpes eficientes e de boa capacidade competitiva, poder ser feita anualmente. Conseqüentemente, a sobrevivência das estirpes no rizoplasma durante o período de infecção seria suficiente para uma boa nodulação. Entretanto, ainda existe muito pouca informação sobre a capacidade competitiva por sítios de infecção nodular, e a informação existente indica baixa capacidade competitiva das estirpes que vinham sendo utilizadas nos inoculantes. Portanto, a persistência de estirpes eficientes no solo apresentando baixa especificidade hospedeira e alta capacidade competitiva, por sítios de infecção nodular, é uma característica desejável (Vidor *et alii*, 1979). Em função disso, seria importante conhecer a extensão pela qual as estirpes utilizadas nos inoculantes poderiam ser influenciadas pela população de *R. japonicum* no solo, com o passar dos anos, bem como seu comportamento frente aos fatores de natureza biológica e não biológica do solo (Freire, 1977).

LITERATURA CITADA

- CALDWELL, B. E. & HARTWIG, E. E. - Serological distribution of soybean root nodule bacteria in soils of south eastern USA. *Agron. J.*, 62:621-622, 1970.
- CALDWELL, B. E. & WEBER, D. F. - Distribution of *Rhizobium japonicum* serogroups in soybean nodules as affected by planting date. *Agron. J.*, 62:12-14, 1970.
- FREIRE, J. R. J. - Inoculation of soybeans. In: Vincent, J. M., Whitney, A.S. & Bose, J., ed.-Exploiting the legume-*Rhizobium* symbiosis in tropical agriculture. College of Tropical Agriculture Miscellaneous Publication, 145, University of Hawaii, Department of Agronomy and Soil Science, 1977. p.335-379.
- FREIRE, J. R. J. & VIDOR, C. - Fixação do nitrogênio pela simbiose soja-*Rhizobium japonicum*. In: A soja no Brasil. Miyasaka, S., ed., 1978 (No prelo).
- GIBSON, A. H. - *Rhizobium*, legumes and their symbiosis. Trabalho apresentado no Curso intensivo sobre fixação de nitrogênio nos trópicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1976. 68p.
- JOHNSON, H. W.; MEANS, U. M. & WEBER, C. R. - Competition for nodule sites between strains of *Rhizobium japonicum* applied as inoculum and strains in the soil. *Agron. J.*, 57: 179-185, 1965.
- KAPUSTA, G. & ROUWENHORST, D. - Influence of inoculum size on *Rhizobium japonicum* serogroup distribution frequency in soybean nodules. *Agron. J.*, 65:916-919, 1973.
- LABANDERA, C. A. & VINCENT, J. M. - Competition between an introduced strain and native uruguayan strains of *Rhizobium trifolii*. *Plant and Soil*, 42:237-247, 1975.
- MEANS, U. M.; JOHNSON, H. W. & ERDMAN, L. W. - Competition between bacterial strains affecting nodulation in soybeans. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.*, 25: 105-108, 1961.
- PERES, J. R. R. & VIDOR, C. - Seleção de estirpes de *Rhizobium japonicum* e competitividade por sítios de infecção nodular em cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). *Agron. Sulriogr.* 16(1), 1980 (No prelo)
- SKRDLETA, J. & KARIMOVA, J. - Competition between two somatic serotypes of *Rhizobium japonicum* used as double strain inocula in varying proportions. *Arch. Microbiol.*, 66:25-28, 1969
- VIDOR, C. - Studies of saprophytic competence in strains of *Rhizobium japonicum* (Kirchner) Buchanan. Ph.D. Dissertation, The Ohio State University, Columbus, OH, USA, 1977. 189p. (Mimeo)
- VIDOR, C.; BROSE, E. & PEREIRA, J. S. - Competição por sítios de infecção nodular entre estirpes de *Rhizobium japonicum* em cultivares de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). *Agron. Sulriogr.* 15: 227-238, 1979.
- VIDOR, C.; FREIRE, J. R. J.; GODINHO, I.; SOARES, J.; MENDES, N. & KORNELIUS, Z. - Especificidade simbiótica entre estirpes de *Rhizobium japonicum* e variedades de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). *Agron. Sulriogr.*, 8:61-67, 1972.
- VILELA, L.; MIRANDA, L. N.; PERES, J. R. R.; SUHET, A. R.; VARGAS, M. A. & LOBATO, E. - A cultura da soja em solos de Cerrados do Distrito Federal de Brasília. Brasília, Centro de Pesquisas Agropecuária dos Cerrados, 1978. 16p. Comunicado Técnico, 2.
- VINCENT, J. M. - A manual for the practical study of root nodule bacteria. International Biological Programme, Burgess, London, 1970. 164p.
- VINCENT, J. M. - Root-nodule symbioses with *Rhizobium*. In: Quispel, A., ed. The biology of nitrogen fixation. North-Holland Research Monographs, Frontiers of Biology, 33:265-341, 1974.
- WEAVER, R. W. & FREDERICK, L. R. - Effect of inoculum rate on competitive nodulation of *Glycine max* (L.) Merrill. II. Field studies. *Agron. J.*, 66:233-236, 1974.