

SIMBIOSE DE ESTIRPES HOMÓLOGAS COM LINHAGENS DE *Centrosema pubescens*¹

AVÍLIO A. FRANCO², ARYNO SERPA³ e SEBASTIÃO MANHÃES SOUTO⁴

SINOPSE.- Foi feito um experimento em condições de casa de vegetação, com linhagens de *C. pubescens* Benth comparando-as com o cultivar "Deodoro", para estudar os efeitos de estirpes homólogas de *Rhizobium* sp., na simbiose e desenvolvimento das plantas.

Para as duas coletas efetuadas aos 28 e 56 dias, após o plantio, verificaram-se efeitos altamente significativos das estirpes na nodulação e desenvolvimento das plantas. As linhagens apresentaram diferenças significativas aos 28 dias do plantio. Na coleta aos 56 dias estas diferenças foram menores e, apesar de não significativas, a linhagem 5.1/64 apresentou 25% de nitrogênio a mais que o cultivar Deodoro.

Foi encontrada regressão altamente significativa do N total das plantas com o peso de nódulos ($r = 0,94$), independentemente da estirpe de *Rhizobium* ou da linhagem de *Centrosema*.

Diferenças encontradas na eficácia das estirpes entre coletas aos 28 e 56 dias após o plantio, mostraram que, para espécies perenes, nem sempre a precocidade deve ser a única característica a ser observada na seleção das estirpes. Isto sugere o uso de mais de uma estirpe para garantir uma fixação eficiente, tanto no início do estabelecimento da leguminosa como no seu desenvolvimento posterior.

INTRODUÇÃO

A seleção de variedade e linhagens de leguminosas, muitas vezes, é feita com desprezo da principal característica desta família, isto é, sua capacidade de fixar nitrogênio do ar.

Diferenças entre linhagens e variedades de algumas leguminosas quanto à sua capacidade de nodulação e fixação de nitrogênio têm sido encontradas por vários autores (Erdman & Means 1953, Johnson & Means 1960, Döbereiner *et al.* 1966).

A centrosema é uma leguminosa que apresenta especificidade hospedeira, não nodulando com *Rhizobium* isolado de outras espécies apesar de o *Rhizobium* dela isolado nodular a maioria das espécies tropicais (Bowen 1959a, Döbereiner 1970). Trabalhos de Bowen e Kennedy (1961) mostraram diferenças genéticas quanto à nodulação entre linhagens de centrosema e Serpa e Cunha F.^o (1970) verificaram, nesta mesma espécie, a herdabilidade do número de nódulos e admitiram a existência de fenótipos da nodulação precoce e tardia.

Norris (1967) sugeriu que, ao se fazer seleção de estirpes para leguminosas tropicais, deve-se começar com estirpes homólogas, isto é, estirpes isoladas da mesma espécie ou variedade. Guzman e Döbereiner (1969), estudando diferentes estirpes de *Rhizobium* em simbiose

com centrosema, verificaram que, ao nível de espécie, as homólogas foram superiores às estirpes de inoculação cruzada.

O trabalho de melhoramento genético em *C. pubescens*, no sentido de obter linhagens com a maior somatória de características desejáveis, vem sendo realizado no Instituto de Pesquisa Agropecuária do Centro-Sul (IPEACS) desde 1963. Com o aparecimento de linhagens melhoradas, a procura de estirpes que as nodulem e fixem N eficientemente se fez necessária, tornando-se para isto também necessário o conhecimento da ocorrência ou não de homologia ao nível de linhagem.

A finalidade deste experimento foi o estudo do comportamento de estirpes de *Rhizobium* em simbiose com linhagens de *C. pubescens* selecionadas a partir do cultivar Deodoro.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi feito um experimento em vasos de Leonard, em casa de vegetação, com o esquema experimental fatorial $5 \times 7 \times 2$, com duas repetições e os seguintes tratamentos:

- variedade de *C. pubescens* Benth "Deodoro" e as seguintes linhagens: IPEACS-5.3/64, IPEACS-5.1/64, IPEACS-4.2/64 e IPEACS-7/69;
- estirpes de *Rhizobium* sp.: C-29 + C-100, CP-1, CP-2, CP-3 e CP-4; testemunha e testemunha nitrogenada;
- duas épocas de coletas: aos 28 e aos 56 dias do plantio.

A variedade de centrosema "Deodoro" é nativa na região e já amplamente difundida nas pastagens do país, com o nome popular de jitarana.

As linhagens utilizadas foram selecionadas da variedade original "Deodoro" com a finalidade de obter material forrageiro qualitativa e quantitativamente superior à variedade original.

¹ Aceito para publicação em 22 mar. 1972.

² Apresentado no XIII Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, Vitória, 1971.

³ Eng.^o Agrônomo do Setor de Solos do Instituto de Pesquisa Agropecuária do Centro-Sul (IPEACS), Km 47, Rio de Janeiro, GB, ZC-26, e Pesquisador Assistente, bolsista, do Conselho de Pesquisas (CNPq) (8.007/68).

⁴ Pesquisador em Agricultura do Setor de Nutrição Animal e Agrostologia (SNNA) do IPEACS e Pesquisador Assistente, bolsista, do CNPq (9.835/70).

⁵ Eng.^o Agrônomo do SNAI do IPEACS e Pesquisador Assistente, bolsista, do CNPq (4.108/69).

As estirpes de *Rhizobium* sp. C-29 e C-100 são indicadas como as melhores para a variedade "Deodoro". As estirpes CP-1, CP-2, CP-3 e CP-4 foram isoladas, respectivamente, de nódulos das linhagens IPEACS-5.3/64, IPEACS-5.1/64, IPEACS-4.2/64 e IPEACS-7/69, crescendo no campo sem inoculação.

Cada vaso recebeu, como substrato, 1,7 kg de areia de praia, lavada em água corrente até desaparecimento do excesso de NaCl. Após preparados, os vasos foram esterilizados em autoclave durante uma hora. A água de irrigação, antes de ser usada, era fervida. Todos os vasos receberam 800 ml de solução contendo: 119,200 mg de KCl, 40,000 mg de K_2HPO_4 , 240,000 mg de KH_2PO_4 , 394,400 mg de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 275,200 mg de $CaSO_4 \cdot 2H_2O$, 0,160 mg de $MnSO_4 \cdot 2H_2O$, 0,008 mg de $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, 1,144 mg de H_3BO_3 , 4,000 mg de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ e 4,000 mg de ácido cítrico. A solução com os nutrientes foi adicionada em duas vezes.

A testemunha nitrogenada, além da adubação básica, recebeu, por vaso, 49,0 mg de N, 4 dias após o plantio e mais 49,0 mg 24 dias após a primeira aplicação.

As sementes usadas foram cedidas pelo Setor de Agrostologia e Nutrição Animal do IPEACS.

Foi feito o plantio no dia 9.10.1970. Fez-se desbaste para três plantas por vaso, e a inoculação foi feita em cobertura 12 dias após o plantio.

Em ambas as coletas, fez-se observação de posição, número e peso seco dos nódulos, e peso seco, nitrogênio percentual (N%) e nitrogênio total das plantas. As plantas e nódulos foram secados em estufa a 65°C até peso constante e o nitrogênio das plantas, após moídas, determinado pelo método de Kjeldahl (semi-micro).

Na análise estatística foram excluídos os dados da testemunha e testemunha nitrogenada, devido a estes terem variado muito em relação aos tratamentos de inoculação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados deste experimento são apresentados nos Quadros 1 e 2. A análise foi feita para cada idade separadamente (Quadro 3) e em conjunto (Quadro 4).

QUADRO 1. Efeito de estirpes de *Rhizobium Centrosema pubescens* (

n duas idades, na nodulação de linhagens de lias de duas repetições)

Idades em dias	Estirpes de <i>Rhizobium</i> ^a	Posição dos nódulos na raiz ^b					Número de nódulos/vaso					Peso de nódulos (mg/vaso)				
		Deod.	5.3/64	5.1/64	4.2/64	7/69	Deod.	5.3/64	5.1/64	4.2/64	7/69	Deod.	5.3/64	5.1/64	4.2/64	7/69
		28	C-29+C-100	3,5	4,0	3,5	3,5	4,0	45,5	76,5	64,0	66,5	59,0	28	45	53
	CP-1	4,0	3,5	3,5	4,0	4,0	68,0	94,5	107,0	79,0	62,0	40	52	68	41	42
	CP-2	3,5	3,0	3,0	3,5	3,5	78,0	73,5	127,0	106,0	86,0	41	35	67	38	45
	CP-3	3,5	4,0	3,5	4,0	3,5	78,5	74,5	118,0	92,0	59,5	36	41	72	39	36
	CP-4	3,0	4,0	3,5	4,0	3,5	68,0	89,0	80,0	76,0	64,5	41	54	55	42	43
56	C-29+C-100	3,0	3,5	3,0	3,5	3,0	213,5	183,0	376,0	230,5	214,0	611	251	692	475	267
	CP-1	3,0	3,5	3,5	3,5	3,0	147,0	337,0	229,0	161,0	142,5	527	809	910	588	408
	CP-2	3,5	3,0	3,0	3,5	3,5	223,0	277,5	304,0	205,0	140,5	658	653	678	555	432
	CP-3	3,5	3,0	3,5	3,5	3,5	238,0	332,0	181,0	248,5	160,6	941	789	905	680	672
	CP-4	3,0	4,0	3,5	3,5	3,5	120,5	242,5	333,5	155,5	204,0	620	975	1195	732	658

^a A testemunha e testemunha nitrogenada não apresentaram nódulos.

^b A posição dos nódulos foi avaliada pela seguinte escala empírica: 1 = nódulos somente na raiz secundária; 2 = nódulos mais na raiz secundária que na principal; 3 = nódulos mais na raiz principal que na secundária; 4 = nódulos somente na raiz principal.

QUADRO 2. Efeito de estirpes de *Rhizobium* no desenvolvimento de linhagens de *Centrosema pubescens* (médias de duas repetições)

Idades em dias	Estirpes de <i>Rhizobium</i>	Peso seco das plantas (g/vaso)					Teor de N nas plantas (N%)					N total das plantas (mg/vaso)				
		Deod.	5.3/64	5.1/64	4.2/64	7/69	Deod.	5.3/64	5.1/64	4.2/64	7/69	Deod.	5.3/64	5.1/64	4.2/64	7/69
		28	C-29+C-100	0,25	0,40	0,45	0,25	0,30	3,0	2,4	2,5	2,3	2,7	7	10	11
	CP-1	0,40	0,50	0,55	0,35	0,40	3,3	2,9	3,6	3,4	3,5	14	15	20	11	14
	CP-2	0,30	0,35	0,40	0,35	0,45	2,8	2,6	3,7	2,9	3,2	9	9	15	10	15
	CP-3	0,40	0,35	0,45	0,35	0,35	3,0	3,3	3,8	3,3	2,8	12	12	18	12	10
	CP-4	0,40	0,50	0,45	0,35	0,40	2,8	2,9	3,2	3,6	2,9	11	15	14	13	12
	T ^a	0,30	0,40	0,45	0,40	0,35	1,4	1,0	1,4	1,4	1,2	5	5	6	6	5
	TN	1,10	0,85	1,10	1,30	0,95	3,2	3,3	3,1	3,0	3,0	35	27	33	40	27
56	C-29+C-100	2,95	1,30	3,55	2,45	2,30	1,9	1,4	1,7	1,9	1,5	58	18	61	48	35
	CP-1	4,25	4,65	5,90	3,80	3,55	1,7	1,9	1,8	1,8	1,5	72	90	109	66	64
	CP-2	4,55	4,25	4,85	3,70	3,10	1,7	2,0	2,3	1,9	1,6	78	84	113	69	50
	CP-3	6,85	5,30	6,60	5,35	6,95	2,1	2,2	2,2	2,3	1,9	142	119	142	121	139
	CP-4	4,00	5,40	6,65	4,25	4,50	2,1	2,0	1,8	2,3	1,9	85	118	120	96	87
	T	0,30	0,60	0,55	0,50	0,40	1,2	1,1	1,4	1,1	1,3	4	6	8	6	5
	TN	7,20	5,75	6,20	4,40	5,55	1,0	1,5	1,2	1,5	1,3	73	92	73	63	69

^a Devido à grande variação da testemunha nitrogenada (NT), na 1.ª coleta, e da testemunha (T), na 2.ª coleta, em relação aos tratamentos de inoculação os valores destes tratamentos não entraram na análise estatística.

Verifica-se que, quanto à nodulação, algumas das linhagens selecionadas foram realmente superiores à variedade original. No peso seco e N total das plantas, entretanto, somente ocorreram diferenças significativas aos 28 dias. Aos 56 dias, talvez pelo aumento do C.V. (de 19 passou a 36%), as diferenças não foram signifi-

sentava em número insuficiente no inoculante e, só depois de se multiplicar no solo, talvez favorecida pela planta, foi capaz de formar novos nódulos, agora já nas raízes secundárias. Segundo Vincent (1970), a capacidade de competição do *Rhizobium* na infecção das raízes é uma boa característica da estirpe.

QUADRO 3. Análise da variância dos resultados apresentados nos Quadros 1 e 2 (valores F)^a

Fontes de variação	GL	Número de nódulos ^b		Peso de nódulos		Peso de planta		N%		N total	
		28 dias	56 dias	28 dias	56 dias	28 dias	56 dias	28 dias	56 dias	28 dias	56 dias
Estirpe	4	3,00*	1,04	—	5,34**	5,00**	8,10**	6,90**	7,44**	10,60**	10,80**
Linhagem	4	3,55*	6,45**	12,87**	4,50	7,50*	1,82	2,60 ^{ps}	2,76 ^{ps}	8,87**	1,80
Interação linhagem x estirpe	16	—	1,82	—	—	—	—	1,65	1,40	—	—
Erro	24	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C.V. (%)		14	14	21	30	16	34	14	19	20	36

* = significância ao nível de 5%, ** = significância ao nível de 1%, ps = os valores determinados estão próximos à significância ao nível de 5%.

^b Valores transformados para $\sqrt{n+1}$.

QUADRO 4. Análise da variância das duas coletas (idades) em conjunto (valores F)

Fontes de variação	GL	Nódulos		Planta		N total
		Número	Peso seco	Peso seco	N%	
Estirpe	4	9,38**	4,27**	1,75	4,12**	1,89
Linhagem	4	—	4,27**	7,15**	10,18**	9,26**
Idade	1	271,05**	379,07**	313,35**	381,32**	222,49**
Linhagem x estirpe	16	1,25	—	—	1,85*	—
Linhagem x idade	4	2,35	2,87*	1,33	1,10	1,15
Estirpe x idade	4	1,94	4,09**	6,08**	3,57*	7,91**
Linhagem x estirpe x idade	16	1,77	—	—	1,23	—
Resíduo	49	—	—	—	—	—
C.V. (%)		15	45	48	12	49

cativas, apesar de a linhagem IPEACS-5.1/64 apresentar-se com valores mais altos, tanto no peso das plantas quanto no N total fixado.

O comportamento das diversas estirpes e linhagens será visto com mais detalhes ao se analisar separadamente cada parâmetro estudado.

Número de nódulos

O número de nódulos de cada linhagem com a estirpe dela isolada nunca foi, estatisticamente, inferior à nodulação de cada linhagem com as demais estirpes, nas duas épocas, sendo que, na segunda, a interação estirpe x linhagem esteve perto da significância. Esta homologia ao nível de linhagem indica o máximo de especificidade. Verificou-se ainda interação significativa da estirpe com época, quando a mistura C-29 + C-100 na primeira idade apresentou menor número de nódulos, e já aos 56 dias, apesar de não significativo, foi a que apresentou maior número. Observou-se ainda que nesta coleta os nódulos se apresentavam mais nas raízes secundárias do que o verificado na primeira coleta (Quadro 1). Parece que neste tratamento, como se tratava de uma mistura, a estirpe mais efetiva se apre-

sentava em número insuficiente no inoculante e, só depois de se multiplicar no solo, talvez favorecida pela planta, foi capaz de formar novos nódulos, agora já nas raízes secundárias.

Peso de nódulos

No Quadro 1 verifica-se que os resultados do peso seco de nódulos mostraram diferenças entre estirpes e entre linhagens, sendo que as estirpes CP-3 e a linhagem 5.1/64 se apresentaram como as melhores.

A interação significativa estirpe x época no peso de nódulos, foi devida à grande variação ocorrida entre estirpes na 2.^a coleta, já que na 1.^a coleta as diferenças não foram significativas.

Peso da planta

Quanto à produção de matéria seca encontraram-se diferenças altamente significativas entre as diversas estirpes nas duas idades, sendo que aos 28 dias as estirpes CP-1 e CP-4 foram as melhores, mas aos 56 dias a estirpe CP-3, que era igual à testemunha aos 28 dias, passou a ser superior às demais, apresentando produção igual à testemunha nitrogenada. Nos Quadros 2 e 4 verifica-se que foi altamente significativa a interação

estirpe \times época e que, em simbiose com a estirpe CP-1, aos 28 dias as plantas apresentaram maior desenvolvimento que as demais, ocorrendo o contrário aos 56 dias. Na simbiose com a estirpe CP-3 ocorreu o inverso. O comportamento das demais estirpes foi similar nas duas idades. Aos 28 dias observa-se ainda que a simbiose com a mistura de estirpe C-29 + C-100 parece ter sido prejudicial ao desenvolvimento das plantas, pois nestes tratamentos as plantas se apresentaram com menos matéria seca do que a testemunha. Na determinação do N total, entretanto, verifica-se que estas mesmas estirpes apresentaram o dobro do N total da testemunha nesta mesma idade.

A linhagem 5.1/64 apresentou-se superior às demais na primeira idade. Na segunda, devido a ter sido muito alto o coeficiente de variação as diferenças não foram significativas, mas a linhagem 5.1/64 continuou sendo a que apresentou maior produção de matéria seca.

Nitrogênio percentual

Observaram-se diferenças significativas entre estirpes nas duas coletas, apresentando-se as plantas em simbiose com as estirpes CP-3 e CP-4 como as melhores.

Em relação às linhagens, as diferenças estiveram perto da significância tanto na primeira coleta como na segunda (Quadro 2), sendo que a linhagem 5.1/64 novamente se apresentou como a melhor. É interessante notar que, com apenas 28 dias de diferença de idade, da primeira para a segunda coleta, o N% decresceu, tanto nas plantas dependentes de simbiose quanto nas alimentadas com N mineral, independentemente das linhagens. Bowen (1959b), já havia observado este decréscimo de N% em plantas mais velhas de jitrana.

N total das plantas

Na coleta aos 28 dias, as plantas já apresentavam fixação de N, sendo observado que com a melhor estirpe apresentavam 45% do N total da testemunha nitrogenada e 274% em relação à testemunha. A estirpe de menor eficácia nesta idade apresentou 29% do N total da testemunha nitrogenada e 174 em relação à testemunha. Verifica-se também que, nesta fase de estabelecimento, as plantas dependentes do N simbiótico apresentam desvantagem em relação às plantas com adubação de N mineral (Quadro 2), mas já aos 56 dias esta situação foi superada e as plantas inoculadas com boas estirpes apresentaram até 179% do N total das plantas que receberam adubação de 98 mg de N mineral/vaso. Foi significativa a interação estirpe \times idade, sendo o efeito das estirpes, quanto ao N total, similar ao do peso seco da planta. A estirpe CP-1 teve melhor comportamento aos 28 dias e CP-3 aos 56 dias, mostrando que a precocidade de estirpes nem sempre deve ser caráter absoluto no critério para a seleção. Houve diferença de comportamento das linhagens 5.3/64, 4.2/64 e 7/69 da 1.^a para a 2.^a idade, estando a interação linhagem \times época perto da significância. É interessante observar a reação da linhagem 5.1/64 que se manteve constante como a melhor nas duas idades.

Com os resultados de peso seco de nódulos e do N total das plantas fez-se uma regressão (Fig. 1), altamente significativa (com o coeficiente de correlação $r = 0,94$), estando todos os valores em uma reta, independentemente da estirpe de *Rhizobium*, da linhagem de centrosema ou da idade das mesmas. Ainda nesta figura, podemos observar que a estirpe CP-3, com todas

as linhagens, se apresentou superior às demais, na segunda coleta. Variações quanto à eficiência da fixação (valores b) foram observadas anteriormente em outros trabalhos com jitrana (Döbereiner 1970), verificando, este autor, menor eficiência em vasos de Leonard. No presente experimento, quando se analisaram separadamente a 1.^a e a 2.^a idades, obtiveram-se valores "b" de 0,227 e 0,129, respectivamente, mostrando que na fase inicial de desenvolvimento existe maior volume do tecido nodular funcional e, à medida que o nódulo vai crescendo e envelhecendo, este volume de tecido fixador não cresce proporcionalmente ao crescimento dos nódulos.

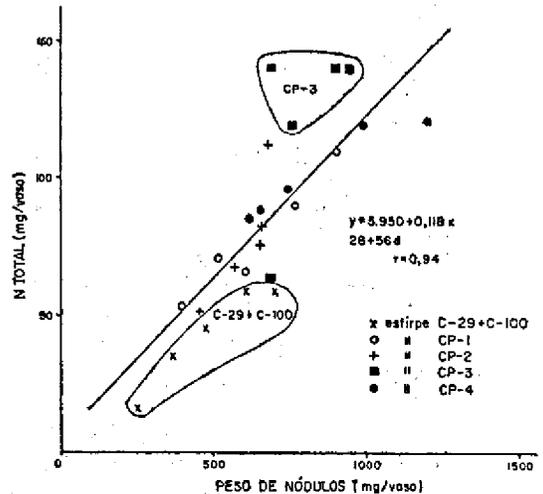


FIG. 1. Regressão do peso de nódulos com o N total.

CONCLUSÕES

Foi constatada significância ($P < 0,01$), na idade de 56 dias, para a estirpe CP-3 em relação às demais e ao tratamento nitrogenado, com maior produção de N total.

Na competição de estirpes de *Rhizobium* com todas as linhagens de jitrana, a avaliação da nodulação e fixação de nitrogênio em uma fase muito jovem da planta pode levar erros.

A linhagem 5.1/64 foi a mais produtiva nas duas idades estudadas.

REFERÊNCIAS

- Bowen, G.D. 1959a. Specificity and nitrogen fixation in the *Rhizobium* symbiosis of *Centrosema pubescens* Benth. Qd J. agric. Sci. 16:267-282.
- Bowen, G.D. 1959b. Field studies on nodulation and growth of *Centrosema pubescens* Benth. Qd J. agric. Sci. 16:253-266.
- Bowen, G.D. & Kennedy, M.M. 1961. Heritable variation in nodulation of *Centrosema pubescens* Benth. Qd J. agric. Sci. 18:161-170.
- Döbereiner, J. 1970. Inoculação cruzada e eficiência na simbiose de leguminosas tropicais. Anais Sem. Metodologia e Planejamento Pesq. Leg. Tropicais, Inst. Pesq. Agropec. Centro-Sul, Rio de Janeiro, p. 181-192.
- Döbereiner, J., Arruda, N.B. de & Penteado, A. de F. 1966. Especificidade hospedeira, em variedades de soja, na simbiose com *Rhizobium*. Pesq. agropec. bras. 1:207-210.
- Erdman, L.W. & Means, M.M. 1953. Strain variation of *Rhizobium meliloti* on three varieties of *Medicago sativa*. Agron. J. 45:625-629.

- Guzman, I. & Döbereiner, J. 1969. Effectiveness and efficiency in the symbiosis of four cross inoculated tropical legumes. *Revta Lat.-Amer. Microbiol. Parasitol.* 11:137-140.
- Johnson, H.W. & Means, M.M. 1960. Interactions between genotypes of soybeans and genotypes of nodulating bacteria. *Agron. J.* 52:651-654.
- Norris, D.O. 1967. The intelligent use of inoculants and lime pelleting for tropical legumes. *Trop. Grassl.* 1(2):107-121.
- Serpa, A. & Cunha Filho, L.A. 1970. Variação hereditária e ambiente dos caracteres número de nódulos e comprimento da raiz principal em *Centrosema pubescens* Benth. *Anais V Reun. Lat.-Amer. de Rhizobium*, Inst. Pesq. Agropec. Centro-Sul, Rio de Janeiro, p. 1-10.
- Vincent, J.M. 1970. The production and use of inoculants. *Anais Sem. Metodologia e Planejamento Pesq. Leg. Tropicais, Inst. Pesq. Agropec. Centro-Sul, Rio de Janeiro, p. 133-158.*

ABSTRACT.- Franco, A.A.; Serpa, A.; Souto, S.M. [*Symbiosis of Centrosema pubescens with line homologous Rhizobium strains.*]. Simbiose de estirpes homólogas com linhagens de *Centrosema pubescens*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Zootecnia* (1973) 8, 13-17 [Pt, en] IPEACS, Km 47, Rio de Janeiro, GB, ZC-26, Brazil.

A greenhouse experiment was carried out with *Centrosema pubescens* Benth. comparing the variety "Deodoro" with 4 of its lines, to study differences in nodulation and plant yield, utilizing several different strains of *Rhizobium*.

For the two harvests at 28 and 56 days after sowing, highly significant strain effects were observed in nodulation and plant growth. Differences between lines were significant only in the first harvest. Line homologous strains seemed to produce more nodules than non-homologous ones.

A highly significant regression of nodule weight and total plant nitrogen was found which was independent of the *Rhizobium* strain or host.

There was an interaction between strains and harvests and therefore it was suggested that strain precocity is not the most important characteristic to be observed in strain selection for perennial plants. The use of more than one strain in the inoculant, one precocious and another with later high efficiency should be considered.