

TEORES DE LEG-HEMOGLOBINA E DE MOLIBDÊNIO NOS NÓDULOS DE SOJA (*Glycine max*) INOCULADA COM ESTIRPES DE *Rhizobium japonicum* DE EFICIÊNCIA NORMAL E EXCEPCIONAL¹

FABIO DE OLIVEIRA PEDROSA², AGUINALDO JOSÉ DO NASCIMENTO², ROBERTO ALVAHYDO³ e JOHANNA DÖBEREINER⁴

Sinopse

Foram feitos dois experimentos em casa de vegetação, empregando vasos de Leonard esterilizados, com quatro variedades de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) inoculadas com uma estirpe de *Rhizobium japonicum* considerada normal (SM1b) e outra de eficiência excepcional (R54a) para se estudar a correlação entre o teor de leg-hemoglobina e de molibdênio dos nódulos e a fixação simbiótica de nitrogênio.

Enquanto a fixação de nitrogênio por grama de nódulos foi aproximadamente o dobro com a estirpe excepcional, o teor de leg-hemoglobina dos nódulos por ela formados foi em média 27% maior, sendo, mesmo assim, altamente significativa a diferença entre as duas estirpes, nos dois experimentos. Entretanto, nas plantas inoculadas com a mesma estirpe, não houve correlação entre o teor de leg-hemoglobina e a eficiência nodular.

O teor de molibdênio dos nódulos formados pela estirpe excepcional R54a, foi, aproximadamente, duas vezes maior que o dos nódulos formados pela estirpe normal SM1b, correspondendo, assim, à diferença na eficiência nodular entre as duas estirpes.

INTRODUÇÃO

A importância da leg-hemoglobina (LHb) na fixação simbiótica do nitrogênio pelas leguminosas foi demonstrada e estudada detalhadamente por Virtanen *et al.* (1947), tendo os referidos autores encontrado uma correlação entre o teor de LHb nos nódulos e a quantidade de N fixado e verificando, ainda, que somente nódulos que fixam nitrogênio contém LHb. Esta, no tecido nodular, encontra-se dissolvida no interior do envelope membranoso, junto aos bacteróides (Bergersen & Turner 1967).

Recentemente, Bergersen e Turner (1967), trabalhando com N₂¹⁵ e bacteróides separados em atmosfera de Argônio e lavados, comprovaram que a redução do N₂ a NH₃ se dá no bacteróide. Como a adição

de LHb à fração de bacteróides lavados não alterou a taxa de fixação, sugeriram os referidos autores que a função da LHb na fixação seja a de transportar oxigênio do envelope membranoso ao bacteróide, fornecendo deste modo o O₂ necessário à respiração do bacteróide com uma velocidade maior que a da simples difusão (Scholander 1960) e mantendo a pressão parcial de oxigênio em nível baixo, favorável ao processo de fixação. Com isto, Bergersen e Turner (1967) revogaram a hipótese anterior (Bergersen 1965) de que a LHb funcionaria no transporte de elétrons do bacteróide ao envelope membranoso, onde se verificaria a redução do N₂. Koch *et al.* (1967) isolaram de nódulos da soja a nitrogenase, enzima responsável pela redução do N₂ a NH₃, que é inativada na presença de oxigênio.

Além da de transportadora de oxigênio proposta por Bergersen e Turner (1967), foram atribuídas à LHb outras funções como a de transportar N₂ ao bacteróide ou de eliminar o O₂, evitando assim a inibição da nitrogenase pelo oxigênio (Burriss 1966).

Van Schreven (1958), revendo o papel do molibdênio, necessário em quantidades mínimas para redução do nitrato a amônia em todos os vegetais, citou os trabalhos de Bortels (1930) que verificou pela

¹ Recebido 31 dez. 1969, aceito 2 fev. 1970.

Boletim Técnico n.º 98 do Instituto de Pesquisas e Experimentação Agropecuárias do Centro-Sul (IPEACS).

Apresentado no XII Congresso Brasileiro de Ciências do Solo, Curitiba, julho 1969.

² Aluno do 4.º ano da Escola de Agronomia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq 8619/67 e 8620/67, respectivamente).

³ Professor Catedrático de Química Analítica da Escola de Agronomia da UFRRJ e Eng.º Agrônomo do IPEACS, Km 47, Campo Grande, CB. ZC-26.

⁴ Eng.º Agrônomo do Setor de Solos do IPEACS e bolsista do CNPq (7105/68).

primeira vez a necessidade de Mo para a fixação do nitrogênio nas bactérias, simbióticas ou não.

Mulder (1954) verificou que o número de nódulos no trevo e na alfafa cultivados em solos deficientes de molibdênio foi superior ao dos cultivados em solo suprido de Mo e que os nódulos das plantas cultivadas em solos deficientes eram amarelados, enquanto que os das plantas cultivadas em solos com suficiente Mo eram de cor avermelhada, indicando maior concentração de LHB.

Segundo Burris (1966), a nodulação ocorre com ou sem adição de molibdênio, mas a fixação do N₂ só se verifica na presença do molibdênio. Em trabalhos recentes, Mortenson (1965, 1966) descreveu as propriedades da nitrogenase, que é o complexo enzimático, responsável pela redução do N₂ a NH₃ formado por duas metalo-proteínas, uma contendo ferro e a outra ferro e molibdênio na proporção de 6:1.

Döbereiner *et al.* (1966) verificaram que o N total fixado depende do peso de nódulos presentes, tendo demonstrado regressões altamente significativas do N total das plantas sobre o peso de nódulos em várias leguminosas. Concluíram que o coeficiente destas regressões representa a eficiência do tecido nodular e que estirpes de *Rhizobium* variam no sentido de produzir mais ou menos tecido nodular, mas apresentam coeficientes semelhantes.

Observações recentes (Döbereiner *et al.* 1968), entretanto, demonstraram a existência de três grupos distintos de estirpes de *Rhizobium japonicum*: as ineficientes, as de eficiência normal e as de eficiência excepcional. Nas primeiras os coeficientes de regressão são nulos; as estirpes de eficiência excepcional apresentaram coeficientes significativamente maiores que as de eficiência normal, evidenciando uma eficiência nodular aproximadamente duas vezes maior.

Procurou-se neste trabalho verificar as relações entre as concentrações de LHB e de Mo dos nódulos e a eficiência do tecido nodular de duas estirpes de *Rhizobium japonicum* sendo uma normal e outra de eficiência excepcional.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizados dois experimentos em casa de vegetação usando vasos de Leonard com areia esterilizada. Foi usada solução nutritiva de Norris (1964) modificada por Döbereiner *et al.* (1968).

O primeiro experimento incluiu quatro variedades de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) inoculadas com duas estirpes de *Rhizobium japonicum*, lançadas em blocos ao acaso com oito repetições. Destas repeti-

ções, quatro foram colhidas aos 50 dias e as restantes, aos 60 dias após o plantio. O segundo experimento, feito para confirmar os resultados do primeiro, consistiu de apenas uma variedade de soja com as duas estirpes de *Rhizobium*, em delineamento inteiramente casualizado com 12 repetições, seis das quais foram colhidas aos 34 dias após o plantio e as finais, aos 42.

O primeiro experimento constou dos seguintes tratamentos: variedades de soja Majos, Pelicano, L-652 e N-45-2994, inoculadas com as estirpes de *Rhizobium*: SM1b de eficiência normal e R54a de eficiência excepcional.

No segundo experimento, a variedade Majos foi inoculada com as duas estirpes de *Rhizobium* citadas acima.

Os nódulos foram destacados, lavados, secados superficialmente com papel absorvente, contados e pesados. Em alguns desses nódulos, após a pesagem, foi determinado o conteúdo de LHB. As plantas e os nódulos restantes foram secados em estufa com circulação de ar à temperatura de 60°C.

O peso seco total dos nódulos foi obtido pesando-se os nódulos não utilizados para a extração da leg-hemoglobina, antes e depois da secagem a 60°C e calculando-se um fator de correção médio para cada estirpe de *Rhizobium* em cada época. Os pesos frescos totais dos nódulos, multiplicados por esses fatores, resultaram nos valores de peso seco de nódulos apresentados nos Quadros. A eficiência nodular foi obtida pela regressão do nitrogênio total sobre o peso de nódulos secos (valores do coeficiente b, Fig. 1). Os valores de eficiência nodular individuais apresentados nas Fig. 2 e 3 foram obtidos pela divisão do nitrogênio fixado pelo peso de nódulos secos de cada vaso. O nitrogênio fixado foi calculado subtraindo-se do N total o valor "a" da regressão dos respectivos experimentos.

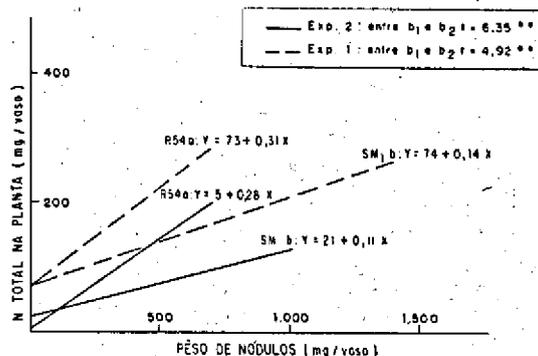


FIG. 1. Regressões do N total sobre o peso seco de nódulos.

Dosagem da leg-hemoglobina

Foi usado o método proposto por Wilson e Reisenauer (1963) com algumas modificações. Foram pesados 200-300 mg de nódulos frescos, colocados em um gral com 2 ml de solução Drabkin e macerados. O material foi transferido para tubo de centrifuga de 10 ml levando-se o gral com 1 ml de solução Drabkin. Foi feita uma centrifugação durante 15 minutos a uma aceleração de 200 vezes a da gravidade. O sobrenadante foi então transferido para tubo de ensaio de 10 ml e feita outra centrifugação igual, após acrescentar ao resíduo 1 ml de solução Drabkin e agitar. O sobrenadante da segunda centrifugação junto com o da primeira foi completado para 5 ml e transferido para tubo de ultracentrifuga e centrifugado durante 15 minutos com uma aceleração correspondente a 20.000 vezes a da gravidade.

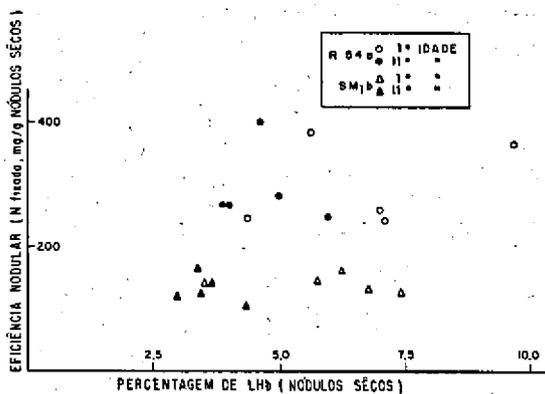


FIG. 2. Correlação entre eficiência nodular e a porcentagem de Lhb nos nódulos secos.

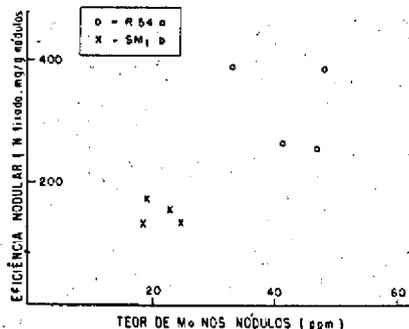


FIG. 3. Correlação entre eficiência nodular e o teor de molibdênio nos nódulos.

A intensidade da cor vermelha da leg-hemoglobina foi medida num espectrofotômetro Bausch & Lomb com radiação de comprimento de onda de 540 mμ usando solução Drabkin como "blank". A curva pa-

drão foi feita usando sangue humano hemolisado a 1:5 com água, no qual foi determinado o ferro pelo método Connery e Briggs (1962). A Lhb foi calculada a partir do ferro, admitindo-se o teor de 0,344% de Fe na hemoglobina.

Dosagem do nitrogênio

As plantas foram secadas a 60°C e moídas sendo que no primeiro experimento a parte aérea e raízes de cada vaso, após homogeneizadas, representavam uma amostra. No segundo experimento, raízes e parte aérea foram moídas separadamente e analisados os seus teores de nitrogênio total das raízes e parte aérea. Neste tipo de análise, os valores de N total obtidos foram pouco mais baixos do que no primeiro experimento, possivelmente devido ao fato de que, na hora da pesagem de amostras contendo folhas e raízes, as folhas, mais leves e que contêm mais N, tendem a sair mais facilmente do saquinho do que as raízes, mais pesadas.

O nitrogênio foi determinado pelo método de Kjeldahl (semi-micro), usando-se HgO como catalisador para a digestão.

Dosagem do molibdênio

O método usado é devido a Johnson e Ulrich (1959) com algumas modificações. Baseia-se na colorimetria e nas seguintes reações: O Mo reage com o tiocianato em solução ácida na presença de agentes redutores tais como o SnCl₂ dando coloração "âmbar". O complexo formado [Mo(NCS)₃] é extraído da fase aquosa com uma mistura de tetracloreto de carbono e álcool isoamílico (1:1 vol.) que possui uma densidade aproximada de 1,19.

Digestão úmida. Em frascos de Kjeldahl foram colocados 300-400 mg de amostra com 2 ml de HNO₃ (densidade 1,42) misturando-se durante 10 minutos. Aqueceu-se brandamente até uniformizar o material (15 a 30 minutos). Após o resfriamento, adicionaram-se 3 ml de HClO₄ (70-72%), gôta a gôta, agitando-se após cada adição; reaqueceu-se brandamente até saírem fumos brancos e manteve-se o aquecimento até o líquido tornar-se límpido e incolor.

Desenvolvimento da cor. O material digerido foi transferido para funil de separação completando-se o volume para 45 ml com H₂O destilada. A seguir a amostra foi saturada com a solução extratora (tetracloreto de carbono-álcool isoamílico 1:1). Deixou-se repousar por 15 minutos e eliminou-se a solução extratora; acrescentou-se 1,0 ml de tiocianato de sódio (30%), 1,0 ml de cloreto estano (40%) e 3,0 ml

da solução extratora, homogeneizando-se após cada adição. Agitou-se vigorosamente durante 2 minutos, relaxando a pressão quando necessário; após 15 minutos de repouso o material foi transferido para tubo de espectrofotômetro e medida a absorção com comprimento de onda de 470 m μ usando água destilada como referência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das diversas determinações do primeiro experimento podem ser apreciados no Quadro 1 e as suas análises de variâncias no Quadro 2, e as do segundo, nos Quadros 3 e 4. Nos Quadros 1 e 3 verifica-se, em primeiro lugar, maior peso de nódulos nas plantas inoculadas com a estirpe SM1b, tendo sido altamente significativa esta diferença em relação à estirpe R54a nos dois experimentos (Quadros 2 e 4). Quanto ao número de nódulos, não houve diferença significativa, indicando com isto, não haver diferenças quanto à capacidade de induzir a

nodulação, mas sim no que se refere ao desenvolvimento dos mesmos.

Nos resultados relativos ao nitrogênio total nas plantas, que representa uma medida do nitrogênio fixado, verificamos que as duas estirpes novamente se diferenciaram, com a estirpe R54a fixando significativamente mais nitrogênio que a SM1b. Estamos novamente frente ao fenômeno destacado em trabalho recente (Döbereiner *et al.* 1968), de uma estirpe excepcional, que demonstrou maior fixação de N em menor quantidade de tecido nodular. Naquele trabalho, além da R54a, apenas duas outras estirpes se apresentaram como excepcionais numa coleção de 24. O menor peso de nódulos nas plantas inoculadas com a estirpe R54a poderia ser conseqüência da maior eficiência do tecido nodular desta estirpe, uma vez que, segundo Nutman (1965), a planta controla o desenvolvimento do tecido nodular de acôrdo com suas necessidades de nitrogênio. Em favor desta hipótese pode-se ainda citar que, quanto ao peso de

QUADRO 1. Efeito da inoculação de duas estirpes de *Rhizobium japonicum* em quatro variedades de soja em duas épocas de colheita (1.º experimento)

Variedades de soja	<i>Rhizobium japonicum</i>	Épocas de colheita (dias)	Número de nódulos por vaso*	Peso seco de nódulos (mg/vaso)	Peso fresco de nódulos (mg/vaso)	Teor de LHB (% em nódulos secos)	Teor de Mo nos nódulos secos ^b (ppm)	Teor de N na planta (%)	N total (mg/vaso)
Majos	SM1b	50	84	345	2 285	6,2	19,44	2,75	133
	SM1b	60	92	1 049	3 605	3,3	—	2,49	246
	R54a	50	104	287	1 862	6,3	32,70	3,24	185
	R54a	60	115	618	2 572	4,0	—	2,44	244
Pelicano	SM1b	50	133	336	2 132	6,7	18,79	2,95	119
	SM1b	60	80	870	3 550	4,3	—	2,35	173
	R54a	50	113	294	1 942	7,0	41,77	2,90	150
	R54a	60	122	565	2 665	5,9	—	2,30	215
L-652	SM1b	50	85	353	2 195	5,7	22,67	2,84	128
	SM1b	60	100	1 137	3 984	3,4	—	2,37	223
	R54a	50	139	263	2 050	7,1	47,10	2,81	141
	R54a	60	111	688	3 180	5,0	—	2,75	275
N 45-2094	SM1b	50	93	331	2 139	7,4	24,73	2,77	118
	SM1b	60	131	1 140	4 410	3,6	—	2,61	234
	R54a	50	90	215	1 505	9,6	47,93	2,65	156
	R54a	60	107	560	2 327	5,6	—	2,84	299

* Cada valor do quadro acima é média de 4 vasos (3 plantas).

^b Não foi determinado o teor de Mo na 2.ª época.

QUADRO 2. Análise de variância dos dados apresentados no Quadro 1 (valores F)

F. Variação	GL	Número de nódulos	Peso seco dos nódulos	% N	N total	Teor de LHB	Teor de Mo
Variedades	3	1,21	1,55	1,16	3,06*	6,63**	4,18*
<i>Rhizobium</i>	1	2,00	96,90**	3,10	12,26**	20,59**	82,27**
Idade	1	—	286,21**	28,91**	79,76**	915,45**	—
Var. x idade	3	1,41	2,07	3,51*	1,93	2,92*	—
<i>Rhizobium</i> x var.	3	—	1,34	—	—	1,82	—
<i>Rhizobium</i> x idade	1	—	34,54**	2,29	—	—	—
Resíduo	48						

QUADRO 3. Efeito da inoculação de duas estirpes de *Rhizobium japonicum* na variedade de soja Majos em duas épocas de colheita (2.º Experimento)

<i>Rhizobium japonicum</i>	Época de colheita (dias)	Peso seco de nódulos (mg/vaso)	Peso fresco de nódulos (g/vaso)	Nitrogênio total (mg/vaso)	% Nitrogênio		Teor de LHb (% em nódulos secos)
					Parte aérea	Raízes	
SM1b	34	330	1,741	56,3	2,36	1,48	3,50
	42	787	2,689	104,7	2,12	1,58	2,94
R54a	34	223	1,204	66,7	2,92	1,61	4,30
	42	534	2,068	155,7	2,62	1,73	3,88

Observação: Cada valor acima é média de seis vasos (12 plantas).

QUADRO 4. Análise de variância dos dados apresentados no Quadro 3 (Valores F)

F. de variação	GL	Peso seco dos nódulos	Nitrogênio total	Teor de LHb
<i>Rhizobium</i>	1	33,49**	13,80**	50,67**
Épocas	1	151,90**	69,03**	22,30**
Resíduo	21	—	—	—

nódulos, a diferença entre as duas estirpes se acentuou com o tempo.

Como se verifica na Fig. 1, os coeficientes das regressões do N total sobre o peso seco de nódulos que medem a eficiência nodular são significativamente diferentes nos dois experimentos ($t = 4,92^{**}$ e $t = 6,35^{**}$ respectivamente), confirmando o caráter excepcional da estirpe R54a que fixou aproximadamente o dobro de N por unidade de tecido nodular com a estirpe normal SM1b.

A diferença entre os dois experimentos no que se refere ao ponto "a", isto é, altura em que a linha de regressão corta o eixo y, independentemente da sua inclinação, pode ser atribuída a diferenças na amostragem para a análise do nitrogênio como foi citado em Material e Métodos.

Quanto ao teor de leg-hemoglobina nos nódulos (Quadros 1 e 3), verifica-se uma maior concentração desta substância nos nódulos formados pela estirpe R54a, não havendo, porém, proporcionalidade entre este pequeno aumento e a maior fixação de N por esta estirpe. Virtanen *et al.* (1947) observaram uma correlação entre a concentração de LHb nos nódulos e a quantidade de N fixado, porém, Bergersen (1961), trabalhando com trevo, sugeriu que esta correlação se deve ao volume de tecido bacteróide em funcionamento no nódulo e não à concentração de LHb em si. Neste caso, a concentração de hematina (componente da LHb) seria um índice do volume nodular em funcionamento. Dêsse modo, a percentagem em volume de bacteróides no tecido nodular determinaria a sua eficiência.

Se procurarmos na Fig. 2 a correlação da concentração de leg-hemoglobina nos nódulos com a eficiência do tecido nodular, nas duas estirpes de *Rhizobium*, verificamos que a estirpe R54a, com a mesma concentração de leg-hemoglobina fixou maior quantidade de nitrogênio que a estirpe SM1b. Um aumento de 27%, em média, da concentração de leg-hemoglobina na estirpe R54a correspondeu a um aumento de 136% na quantidade de nitrogênio fixado por g de nódulos secos. Por outro lado, observa-se ainda na Fig. 2 que a concentração da leg-hemoglobina não mostrou correlação com a eficiência nodular quando cada estirpe foi observada separadamente ($r = 0,29$ e $r = 0,06$ para as estirpes SM1b e R54a, respectivamente). Estas observações estão de acordo com trabalhos mais recentes de Bergersen e Turner (1967), pelos quais a adição de leg-hemoglobina a bacteróides lavados não teve efeito algum sobre a taxa da fixação de N, afastando-se assim a hipótese de que a leg-hemoglobina seja diretamente envolvida na fixação do N_2 em NH_3 . Os mesmos autores atribuem-lhe, porém, uma função essencial, mas complementar, de transportar O_2 com uma velocidade oito vezes superior àquela que se verifica por simples difusão (Scholander 1960), fornecendo assim o oxigênio necessário à respiração dos bacteróides sem elevar a pressão parcial de O_2 no interior do envelope membranoso a níveis incompatíveis com o funcionamento da nitrogenase. Bergersen e Turner (1967) observaram que um aumento de 10 a 15 vezes da taxa de fixação de nitrogênio, provocado pela adição de succinato a uma suspensão de bacteróides lavados, foi acompanhado de um aumento de 40 a 50% na absorção de O_2 . Um aumento médio de 136% como o observado na eficiência nodular de estirpe excepcional (Fig. 1) acarretaria, por um cálculo aproximado, um aumento da ordem de 9 a 13% da necessidade de oxigênio. Nos dois experimentos realizados a concentração de LHb nos nódulos da estirpe excepcional R54a, foi em média, 27% maior que a da estirpe normal.

Este valor, apesar de mais alto, também não corresponde ao aumento na eficiência dos nódulos. Com isto e admitindo que o aumento da taxa de consumo de oxigênio seja dependente de um aumento equivalente da concentração de Lhb, os resultados do presente trabalho vêm, de certo modo, ao encontro da hipótese de Bergersen e Turner (1967) de que a função da Lhb seria a de transportar oxigênio necessário à respiração do bacteróide.

As diferenças altamente significativas no teor de Mo dos nódulos formados pelas duas estirpes (Quadros 1 e 2) fornecem outra informação complementar para a compreensão das diferenças entre estirpes normais e excepcionais. A nitrogenase se compõe, como já foi dito, de duas proteínas, uma contendo ferro e a outra molibdênio e ferro na relação 1:6 (Mortenson 1966). A eficiência nodular duas vezes maior da estirpe R54a poderia ser consequência da maior quantidade de nitrogenase ou então pela maior velocidade do seu funcionamento. A concentração de Mo dos nódulos produzidos pela estirpe R54a foi aproximadamente duas vezes maior que a dos nódulos da estirpe SM1b falando a favor da maior quantidade de nitrogenase nos nódulos daquela estirpe ou então de uma outra enzima adicional também contendo Mo. A falta de uma correlação positiva entre eficiência nodular e o teor de Mo nos nódulos, quando cada estirpe é observada separadamente (Fig. 3), confirma a existência de dois grupos bem distintos de eficiência nodular correspondentes às duas estirpes de *Rhizobium* como foi observado também no teor de Lhb (Fig. 2).

AGRADECIMENTOS

Os nossos mais sinceros agradecimentos aos Professores F.B. Ubatuba e J. Guimarães tanto pelas valiosas sugestões como pela aparelhagem colocada à nossa disposição, sem o que teria sido impossível a realização deste trabalho.

LEGHEMOGLOBIN AND MOLYBDENUM CONTENT IN SOYBEAN (*Glycine max*) NODULES INOCULATED WITH *Rhizobium* STRAINS OF NORMAL AND EXCEPTIONAL EFFICIENCY

Abstract

Two greenhouse experiments were carried out in sterilized Leonard jars with four soybean varieties inoculated with a *Rhizobium* strain considered normal (SM1b) and another with exceptional efficiency (R54a), to study the correlation of leghemoglobin and molybdenum content of the nodules and nitrogen fixation.

Nitrogen fixation per unit nodule weight as evaluated by the regression of total plant nitrogen with nodule weight (Fig. 1) was about twice as high with the exceptional strain. The increase in molybdenum content was correspondent to the higher nodule efficiency being twice as high in nodules formed by the exceptional strain. It was thus suggested these nodules having doubled nitrogenase content.

REFERÊNCIAS

- Bergersen, F.J. 1965. Biochemical pathways in legume root nodule nitrogen fixation. *Bacteriol. Rev.* 24:246-250.
- Bergersen, F.J. 1961. Haemoglobin content of legume root nodules. *Biochim. biophys. Acta* 50:576-578.
- Bergersen, F.J. & Turner, G.L. 1967. Nitrogen fixation by the bacteroid fraction of breis of soybean root nodules. *Biochim. biophys. Acta* 141:507-515.
- Bortels, H. 1930. *Arch. Mikrobiol.* 1:333-342. (Citado por Van Schreven 1958)
- Burris, R.H. 1966. Biological nitrogen fixation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 17:155-184.
- Connerty, H. V. & Briggs, A. R. 1952. New methods for the determination of whole-blood iron and hemoglobin. *Clin. Chem* 8:151-157.
- Döbereiner, J., Arruda, N.B. & Penteado, A.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.
- Döbereiner, J., Franco, A.F., Guzmán, I. 1968. Estirpes de *Rhizobium japonicum* de excepcional eficiência. *Pesq. agropec. bras.* 5: 155-161.
- Hardy, R.W.F. & Burns, R.C. 1968. Biological nitrogen fixation. *Ann. Rev. Biochem.* 37:331-358.
- Johnson, C.M. & Ulrich, A. 1959. Analytical methods for use in plant analysis. *California Agric. Exp. Stn Bull.* 766, p. 26-78.
- Koch, B., Evans, H.S. & Russel, S. 1967. Properties of the nitrogenase system in cell-free extracts of bacteroids from soybean root nodules. *Proc. natn. Acad. Sci. USA* 58: 1343-1350.
- Mortenson, L.E. 1965. Non-heme iron protein: role in energy conversion, p. 243-259. A. San Pietro (ed.), *Antioch Press, Yellow Springs, Ohio.* (Citado por Hardy & Burns 1968)
- Mortenson, L.E. 1966. Components of cell-free extracts of *Clostridium pasteurianum* required for ATP dependent H_2 evolution from dithionite and for Na fixation. *Biochim. biophys. Acta* 127:18-25.
- Mulder, E.G. 1954. Molybdenum in relation to growth of higher plants and microorganisms. *Plant and Soil* 5: 368-415.
- Norris, D.O. 1964. Techniques used in work with *Rhizobium*, p. 186-198. *In* Commonw. Bur. Past. Field Crops (ed.), *Some concepts and methods in sub-tropical pasture research.* Bull. 47.
- Nutman, P.S. 1965. Symbiotic nitrogen fixation, p. 360-383. *In* Bartholomew, W.V. & Clark, F.E. (ed.), *Soil nitrogen.* Agron. Ser. no. 10, American Society of Agronomy.
- Scholander, P.F. 1960. Oxygen transport through hemoglobin solutions. *Science* 131:585. (Citado por Bergersen & Turner 1967)
- Van Schreven, D.A. 1958. Some factors affecting the uptake of nitrogen by legumes, p. 137-164. *In* Hallsworth, E.G. (ed.), *Nutrition of the legumes.* Academic Press, New York.
- Virtanen, A.I., Erkama, J. & Linkola, H. 1947. On the relation between nitrogen fixation and leghaemoglobin content of leguminous root nodules II. *Acta. chem. scand.* 1: 861-870.
- Wilson, D.O. & Reisenauer, H.M. 1963. Determination of leghemoglobin in legume nodules. *Analyt. Biochem.* 6:27-30.

The increase in leghemoglobin content, however, was not correspondent to the increase in nodule efficiency. An increase of 136% in average of the nodule efficiency was accompanied by an increase of only 27% of the leghemoglobin content (Table 1, Fig. 2).

Within strains there was no correlation of either molybdenum or leghemoglobin content with nodule efficiency. It was therefore suggested that for each group of strains nitrogenase and hemoglobin content in nodules and nodule efficiency are theoretically constant, variations being due to the experimental error. The difference between normal and exceptional strains of *Rhizobium japonicum* would then be due to a difference in the nitrogen fixing system or in the mechanism of incorporation of NH_4 .