

# EFEITO DA CULTIVAR, ESTIRPE DE *RHIZOBIUM* E NITROGÊNIO MINERAL NA PRODUÇÃO DE UREÍDOS EM SOJA, FEIJÃO E LEUCENA<sup>1</sup>

SILVIA REGINA GOI<sup>2</sup> e MARIA CRISTINA PRATA NEVES<sup>3</sup>

RESUMO - Foram estudados os efeitos da cultivar e estirpe de *Rhizobium* no transporte de ureídeos em soja bem como os efeitos do nitrogênio mineral na produção e transporte de ureídeos por soja (*Glycine max* (L.) Merrill), feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e leucena (*Leucaena leucocephala* Lam.). Não houve diferenças significativas no teor de ureídeos na seiva xilemática da cultivar de soja PI 240-663 crescida no campo e inoculada com diferentes estirpes de *Rhizobium*. Foram observadas, porém, diferenças significativas entre as cinco cultivares, apresentando a cultivar IAC-5 maior percentagem do N total da seiva sob a forma de ureídeos. Em casa de vegetação, foi observada uma diminuição considerável na percentagem do nitrogênio sob a forma de ureídeos na seiva de soja e feijão que receberam nitrogênio na forma nítrica. A aplicação de nitrogênio amoniacal 24 horas antes da colheita só diminuiu a produção de ureídeos quando a inibição da atividade da nitrogenase foi mais pronunciada. As variações no teor de ureídeos nos tecidos de raiz e caule refletiram as variações na produção de ureídeos pelos nódulos de soja e feijão, o mesmo não acontecendo com a leucena.

Termos para indexação: fixação de nitrogênio, nodulação, *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Leucaena leucocephala*.

## EFFECT OF PLANT CULTIVAR, *RHIZOBIUM* STRAIN AND MINERAL NITROGEN ON UREIDE PRODUCTION IN SOYBEANS, COMMON BEANS AND LEUCENA

ABSTRACT - The effects of plant cultivars and strain of *Rhizobium* on ureide transport in soybean and mineral nitrogen on ureide production and transport in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill), common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and leucena (*Leucaena leucocephala* Lam.) were studied. No significant differences were found in the percentage of ureides in xylem sap of field grown soybean cv. PI 240-663 which was inoculated with various *Rhizobium* strains. Significant differences were however observed between different plant cultivars. Cultivar IAC-5 had the greatest proportion of sap nitrogen as ureides. In the glasshouse, a significant decrease was found in the ureide percentage in the xylem sap of soybean and common bean supplied with nitrate-nitrogen. Applying ammonium-nitrogen 24 hours before harvesting decreased ureide production only when nitrogenase activity was significantly inhibited. Changes in ureide concentration in root and leaf extracts reflected the changes in nodulation and ureide production of nodulated soybean and common bean but not in leucaena.

Index terms: nitrogen fixation, nodulation.

## INTRODUÇÃO

A forma sob a qual o nitrogênio assimilado na raiz é transportado para a parte aérea, varia amplamente entre as plantas superiores (Pate 1971). Os ureídeos, alantoína e ácido alantóico, são alguns dos compostos envolvidos neste transporte de nitrogênio e desempenham um papel particularmente importante em diversas leguminosas, principalmente naquelas pertencentes à tribo *Phaseoleae*

(Sprent 1980, Goi & Neves 1982). A baixa relação C:N destes compostos confere às plantas considerável economia em relação à quantidade de carbono que deve ser reciclado através das raízes (Neves 1982), aliada à vantagem de menor gasto de energia para serem produzidos (Minchin et al. 1981), fatores estes importantes, principalmente em sistemas dependentes da fixação biológica do nitrogênio (Pate & Minchin 1980). Em *Glycine max*, os ureídeos aparecem em maior concentração no xilema de plantas noduladas que em plantas crescidas com nitrogênio mineral (Yamamoto & Yatazawa 1975, Matsumoto et al. 1977, McClure & Israel 1979). Isto acontece porque o principal local de síntese dos ureídeos nas leguminosas são os nódulos (Tagima & Yamamoto 1975, Matsumoto et al. 1977, Hanks et al. 1981).

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 20 de junho de 1986.

<sup>2</sup> Biól., Prof.-Adjunto, M.Sc., UFRRJ, Dep. Ciências Ambientais, Inst. de Floresta, kg 47 antiga Rio-São Paulo, CEP 23851 Seropédica, Itaguaí, RJ, Bolsista do CNPq.

<sup>3</sup> Biól., Ph.D., EMBRAPA/Unidade de Apoio ao Programa Nacional de Pesquisa em Biologia do Solo (UAPNPBS), km 47, Bolsista do CNPq.

Neste trabalho foram estudados os efeitos da cultivar da planta e da estirpe de *Rhizobium japonicum* na produção de ureídeos em plantas de *Glycine max*, bem como a influência do nitrogênio mineral sobre a produção de ureídeos em plantas de *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris* e *Leucaena leucocephala*.

### MATERIAL E MÉTODOS

Dois experimentos de campo foram instalados, simultaneamente, em uma área de solo Podzólico Vermelho-Amarelo (série Itaguaí). Foi feita uma adubação básica de 160 kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 160 kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O e 1.240 kg ha<sup>-1</sup> de calcário dolomítico. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com quatro repetições. Em um experimento, foram plantadas quatro cultivares de soja (IAC-2, IAC-5, UFV-1, Santa Rosa e PI 240-663) inoculadas com uma mistura das estirpes de *Rhizobium* 29 W, CB 1809 e 965. No outro, sementes da cultivar PI 240-663 foram previamente esterilizadas (Vincent 1970) e em seguida inoculadas separadamente com uma das três estirpes de *Rhizobium* (29 W, 965 e CB 1809).

As colheitas foram feitas no início do enchimento das vagens, quando se estimou a atividade de redução de acetileno (ARA) da nitrogenase (Dart et al. 1972), e foram coletados o exsudato do xilema e a parte aérea das plantas. A produção de sementes foi estimada quando da maturação plena das vagens, exceto na PI 240-663, que por ser uma cultivar de ciclo longo, teve de ser colhida antes da maturação total, em consequência de problemas fitossanitários.

Na casa de vegetação foram plantados soja (cv UFV-1), feijão (cv Rico 23) e leucena em potes plásticos de quatro litros de capacidade, contendo uma mistura de vermiculita: areia: turfa na proporção de 8:12:1, respectivamente, intensivamente lavada para eliminar resíduos de nitrogênio. O delineamento experimental foi de blocos ao acaso, com cinco repetições. As sementes foram esterilizadas e inoculadas com uma mistura das estirpes R 54 e CV 1809 para soja; F 413 para feijão e NGR-8 para leucena.

Foram deixadas crescer duas plantas por vaso, sendo uma utilizada para coleta de seiva e a outra para determinação da ARA e análise de ureídeos nos tecidos. Após a germinação, as plantas receberam ou solução nutritiva isenta de nitrogênio ou contendo 200 ppm de N na forma nítrica (KNO<sub>3</sub>) (Summerfield et al. 1977). A solução nutritiva foi aplicada duas vezes por semana (500 ml/vaso) em volume suficiente para que ocorresse drenagem abundante em cada vaso e com isso evitar a acumulação de sais. Quando necessário, as plantas foram suplementadas com água destilada em quantidade suficiente apenas para manter a umidade ideal. No tratamento em que houve aplicação de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, as plantas cresceram completamente dependentes da fixação biológica do nitrogênio e receberam solução nutritiva contendo 200 ppm de N na forma

amoniacoal, somente 24 horas antes da colheita, com o objetivo de bloquear a atividade da nitrogenase e observar as modificações na produção de ureídeos decorrentes de uma mudança brusca na assimilação do nitrogênio, passando da fixação do nitrogênio do ar para a assimilação de nitrogênio mineral. Na solução nutritiva contendo amônia, foi adicionado 20 ppm de nitrapyrin (2-cloro-6-triclorometil piridina) para inibir a nitrificação e manter o nitrogênio na forma amoniacoal.

A coleta dos exsudatos foi feita sempre à mesma hora do dia para evitar variações diurnas no transporte de nitrogênio (Pabon et al. 1982). No experimento em casa de vegetação, os vasos além de possuírem drenagem livre, recebiam diariamente quantidade igual de água, volume este que foi aumentado de acordo com as necessidades das plantas. A casa de vegetação apresentava controle de refrigeração, mantendo a temperatura e umidade relativa do ar média de 33°C e 58% durante o dia e 22°C e 91% durante a noite. Os exsudatos foram coletados em plantas decaptadas na altura da cicatriz cotiledonal. A epiderme e a córtex foram removidas para inserção de um tubo de látex e a superfície do corte foi seca com papel absorvente. Após trinta minutos, coletou-se os exsudatos acumulados dentro dos tubos, os quais foram guardados a -18°C até o momento das análises.

O nitrogênio total foi analisado segundo Bremner (1965) tanto para a parte aérea das plantas como para o exsudato do xilema. Para a determinação de ureídeos em tecidos vegetais e exsudato do xilema, alíquotas do material fresco de raízes e caule (primeiro entrenó), foram trituradas em solução de NaOH (0,02 N) e colocadas em tubos de ensaio com tampa, para ferver por quinze minutos. Em seguida, o material foi centrifugado a 3500 rpm durante vinte minutos e o sobrenadante usado na análise de ureído segundo o método de Young & Conway (1942). Os exsudatos foram analisados diretamente ou após diluição em NaOH (0,02N). O caule foi escolhido por conter concentrações altas de ureídeos, maiores do que nos demais órgãos da planta (Matsumoto et al. 1977, Herridge et al. 1978).

### RESULTADOS

Com relação aos resultados obtidos no campo, entre as cultivares de soja estudadas foi observada grande variação na proporção do nitrogênio total sob a forma de ureídeos (percentagem de N-ureído) presente no exsudato do xilema das plantas colhidas na época do início do enchimento das vagens. A cultivar UFV-1 foi a que apresentou menor percentagem de N-ureído enquanto que as cultivares PI 240-663 e IAC-5 apresentaram as maiores percentagens. De modo geral, as variações no peso seco dos nódulos se refletiram na percentagem de N-ureído do xilema no momento da colheita, in-

dicando a estreita relação entre os dois parâmetros (Tabela 1). A ARA determinada no estágio de floração plena foi bastante baixa nos dois experimentos de campo (Tabelas 1 e 2) com pequenas diferenças significativas. De um modo geral os maiores valores de ARA, se relacionaram com os maiores valores da percentagem de N-ureído, tanto entre cultivares como entre estirpes.

A produção de sementes nos dois experimentos de campo ficou mais relacionada com as diferenças no peso de nódulos e percentagem de N-ureído do que com o nitrogênio total acumulado na parte aérea por época da floração plena (Tabelas 1 e 2). A colheita para a estimativa da produção de sementes foi feita quando as plantas atingiram total amadurecimento, entretanto, a cultivar

TABELA 1. Variação na percentagem de nitrogênio sob a forma de ureídeos (percentagem de N-ureídeos) no exsudato do xilema, atividade de redução de acetileno (ARA) da nitrogenase, peso seco de nódulos e nitrogênio total da parte aérea determinados no estágio de floração plena e produção final de sementes de cinco cultivares de soja. Médias de quatro repetições.

	Cultivar				
	IAC-2	PI 240-663	Santa Rosa	UFV-1	IAC-5
Percentagem de N-ureído*	26,3 b	66,0 a	28,7 b	22,5 b	59,8 a
N total do exsudato (mg.ml <sup>-1</sup> )	1,12 ab	0,89 ab	1,65 ab	2,35 a	0,64 b
ARA (μmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> .planta <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	1,8 b	4,7 a	1,8 b	3,3 ab	5,9 a
Peso seco de nódulos (g.planta <sup>-1</sup> )	0,08 b	0,09 b	0,08 b	0,07 b	0,14 a
N total parte aérea (mg.planta <sup>-1</sup> )	134 b	146 b	114 b	67 c	188 a
Peso seco de sementes	39 b	34 b	47 ab	29 b	61 a

\* Em cada linha, as médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

TABELA 2. Variação na percentagem de nitrogênio sob a forma de ureídeos (percentagem de N-ureído) no exsudato do xilema, atividade de redução de acetileno (ARA) da nitrogenase, peso seco de nódulos, nitrogênio total da parte aérea determinados no estágio de floração plena e produção final de sementes de soja (cultivar PI 240-663) inoculada com diferentes estirpes de *Rhizobium*. Médias de quatro repetições.

	Estirpe		
	965	29W	CB 1809 + R54a
Percentagem de N-ureído*	75,0 a	59,1 b	55,3 b
N total do exsudato (mg.ml <sup>-1</sup> )	0,25 a	0,18 a	0,15 a
ARA (μmol C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> .planta <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	2,9 a	1,4 a	1,7 a
Peso seco de nódulos (g.planta <sup>-1</sup> )	0,15 a	0,06 b	0,06 b
N total parte aérea (mg.planta <sup>-1</sup> )	50 a	39 a	40 a
Peso seco de sementes	35,50 a	35,25 a	47 a

\* Em cada linha, as médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

Com relação à cultivar PI 240-663 inoculada com diferentes estirpes de *Rhizobium japonicum* (Tabela 2), as diferenças na percentagem de N-ureído foi observada nas plantas inoculadas com a estirpe 965, sendo este o maior valor para percentagem de N-ureído registrado nos dois experimentos de campo (Tabelas 1 e 2).

PI 240-663, que é uma cultivar tardia em relação às demais, teve que ser colhida antes de completar o ciclo, em consequência de problemas de fitossanidade. Considerando-se todos os tratamentos dos dois experimentos foi obtida uma correlação significativa ( $r^2 = 0,663$ ) entre a percentagem de N-ureído e a produção de sementes. Porém, isolando-se a

cultivar que não completou o ciclo, chega-se a um valor de  $r^2$  um pouco mais expressivo ( $r^2 = 0,754$ ,  $p = 0,01$ ).

No experimento conduzido em casa de vegetação, a aplicação contínua de solução nutritiva contendo N-nítrico, diminuiu a nodulação de todas as espécies estudadas (Tabela 3) enquanto que a aplicação de N amoniacal 24 horas antes da colheita não foi suficiente para diminuir significativamente a atividade da nitrogenase dos nódulos da soja, embora tenha afetado significativamente a ARA do feijão e da leucena (Fig. 1a, b, c).

Como conseqüência da inibição da fixação de  $N_2$  pelo nitrogênio aplicado, baixíssimas concentrações de ureídeos no exsudato do xilema foram observadas nas plantas de soja e feijão supridas com nitrato, valores estes quatro a 26 vezes menores do que os registrados para plantas totalmente dependentes da fixação biológica do nitrogênio (Tabela 4). A aplicação de solução nutritiva contendo nitrogênio amoniacal 24 horas antes da colheita, também diminuiu a concentração de ureídeos no exsudato do xilema de plantas de feijão, porém na soja, o efeito só foi significativo na épo-

TABELA 3. Variação no peso seco de nódulos ( $g.planta^{-1}$ ) de soja, feijão e leucena em três épocas de colheita.

Tratamentos	Soja			Feijão			Leucena		
	15(V)*	40(F)	68(MEG)	Dias após plantio			15	59	73
				15(V)	38(F)	59(MEG)			
Controle-plantas inoculadas com <i>Rhizobium</i>	0,01	0,19	0,67	0,03	0,11	0,03	0,04	0,06	0,05
Plantas inoculadas com <i>Rhizobium</i> + Nitrato (200 ppm N)	0	0	0,08	0,01	0	0	0	0	0
Plantas inoculadas com <i>Rhizobium</i> + Amônia (200 ppm N) 24 h, antes da colheita	0,02	0,18	0,77	0,06	0,09	0,03	0,08	0,03	0,05

\* V = vegetativo.

F = floração.

MEG = metade do enchimento de grãos.

TABELA 4. Concentração de ureídeos ( $mg.N.ml^{-1}$ ) no exsudato do xilema de soja e feijão.

Tratamentos	Colheitas			
	Soja		Feijão	
	Floração*	Enchimento do grão**	Floração*	Enchimento do grão**
Plantas inoculadas	1,02	0,69	0,57	0,39
Plantas inoculadas + $N-NO_3$ (200 ppm N) continuamente	0,04	0,13	0,14	0,10
Plantas inoculadas + $N-NH_4^+$ (200 ppm N) 24 h antes da colheita	0,58	0,55	0,33	0,13
DMS ( $p = 0,05$ )	0,16	0,24	0,21	0,15

\* Média de três repetições.

\*\* Média de cinco repetições.

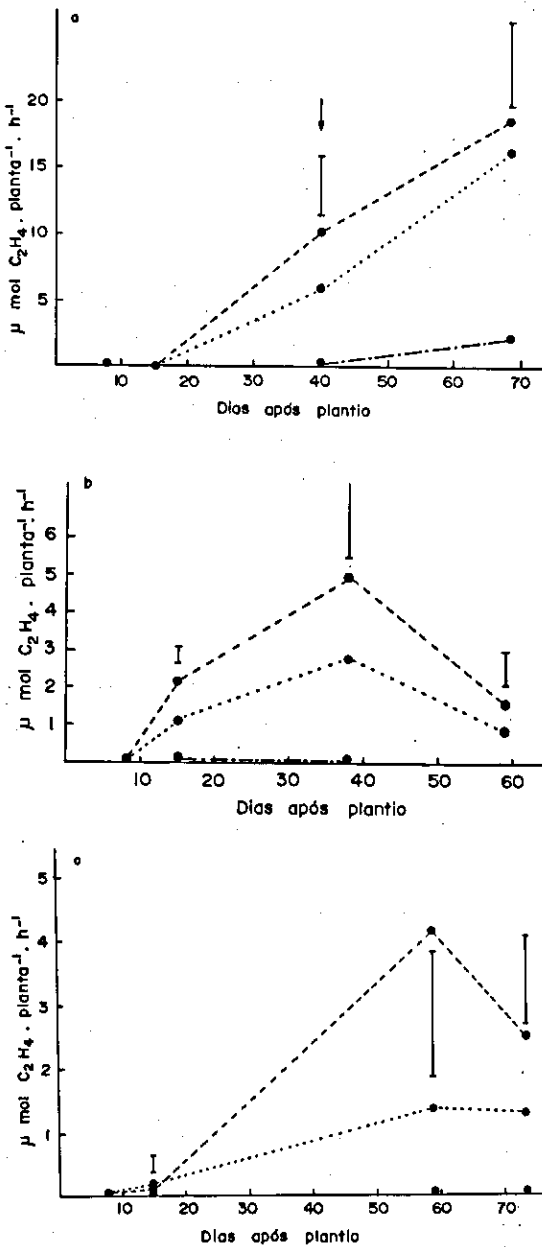
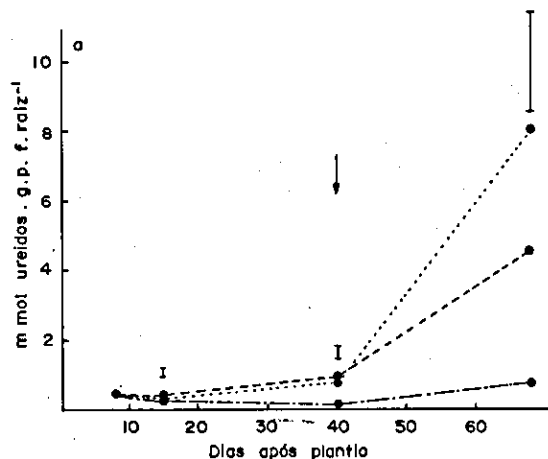


FIG. 1. Atividade de redução do acetileno (ARA) em soja (a), feijão (b) e leucena (c). I - representa o DMS (Tukey) entre os tratamentos ( $p = 0,05$ ). ↓ indica o início da floração. (o—o) controle-plantas inoculadas com *Rhizobium*; (o—.—o) plantas inoculadas com *Rhizobium* + nitrato durante todo o ciclo de desenvolvimento; (o . . o) plantas inoculadas com *Rhizobium* + amônia aplicada 24 horas antes da colheita.

ca da floração (Tabela 4), quando a inibição da ARA pela aplicação de amônia foi mais pronunciada.

Ocorreram variações significativas nas concentrações de ureídeos de tecidos de raiz e caule durante o desenvolvimento das plantas de soja e feijão crescidas sem N mineral (Fig. 2a, b, e 3a, b), sendo que a soja apresentou os mais altos teores de ureídeos nos tecidos dentre as espécies estudadas. As variações no teor de ureídeos dos tecidos, refletiram as variações no peso de nódulos e ARA no feijão e na soja, porém o mesmo não aconteceu com a leucena (Fig. 2c, 3c). Nesta espécie, altos teores de ureídeos na raiz e caule foram observados logo após a germinação, sugerindo remobilização de ureídeos provenientes das reservas da semente que apresentou  $0,44 \text{ nmol N-ureído g}^{-1}$  peso fresco de tecido.

A aplicação de N-amoniacal, resultou em um acúmulo de ureído nas raízes de soja coletada aos 69 dias após o plantio (Fig. 2a). Este efeito não foi significativo nas demais espécies. Para soja e feijão, a aplicação contínua de N-nítrico causou uma diminuição significativa dos teores de ureídeos nas raízes e caule que se mantiveram praticamente inalterados durante o desenvolvimento das plantas (Fig. 2a, b e 3a, b). Para a leucena, a aplicação de nitrato, pouco afetou as concentrações de ureídeos nos tecidos, indicando que a produção de ureídeos nesta espécie, não reflete a atividade dos nódulos.



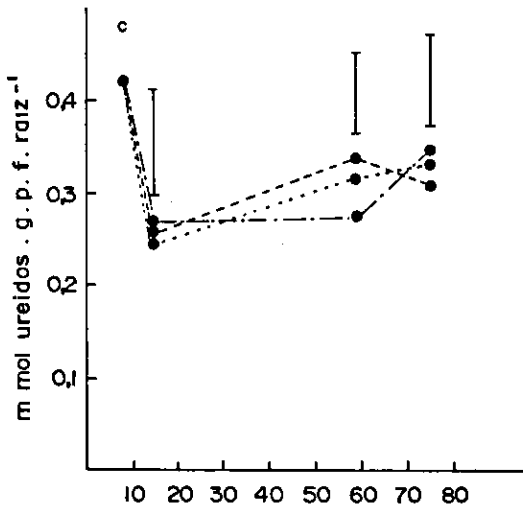
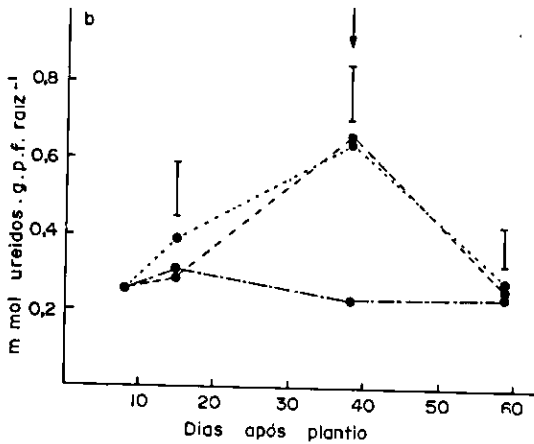


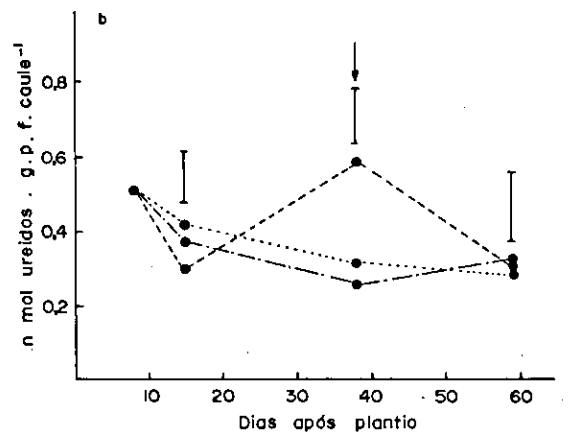
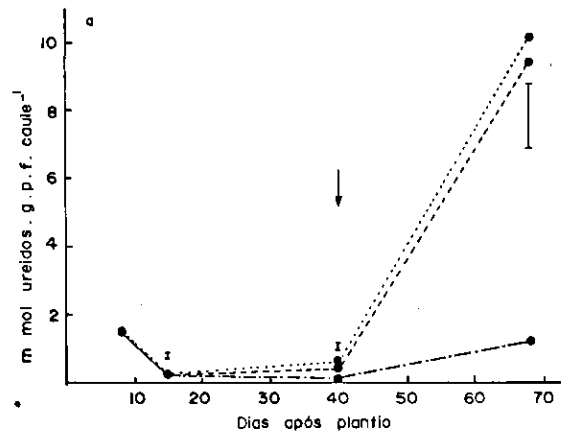
FIG. 2. Variação sazonal na concentração de ureídios na raiz de soja (a), feijão (b) e leucena (c). I - representa o DMS (Tukey) entre os tratamentos ( $p = 0,05$ ). ↓ indica o início da floração. (o---o) controle-plantas inoculadas com *Rhizobium*; (o—o) plantas inoculadas com *Rhizobium* + nitrato durante todo o ciclo de desenvolvimento; (o..o) plantas inoculadas com *Rhizobium* + amônia aplicada 24 horas antes da colheita.

#### DISCUSSÃO

Os processos metabólicos que conduzem à produção de ureídios nos nódulos envolvem não só as células infectadas como também as células intersticiais não infectadas (Hanks et al. 1981, Newcomb

& Tandon 1981, Schubert & Boland 1984). Portanto, é de se esperar que a produção final dos ureídios esteja sob a influência tanto da cultivar da planta como da estirpe de *Rhizobium*. Efeitos da estirpe de *Rhizobium* na percentagem do nitrogênio transportado sob a forma de ureídios já foram observados em caupi (Neves 1978), soja (Neves et al. 1985) e feijão (Hungria et al. 1984), porém McClure et al. (1980) não encontraram variações com relação à estirpe e com relação às cultivares de soja. Contudo, os valores de nitrogênio total do exsudato relatado por esses autores foram muito baixos em comparação com valores normalmente obtidos com plantas de soja (Streeter 1979, Neves et al. 1985), o que deve ter minimizado possíveis diferenças entre os tratamentos.

É possível que os ureídios sejam seletivamente transportados para as sementes em crescimento. O transporte seletivo de aminoácidos já foi observa-



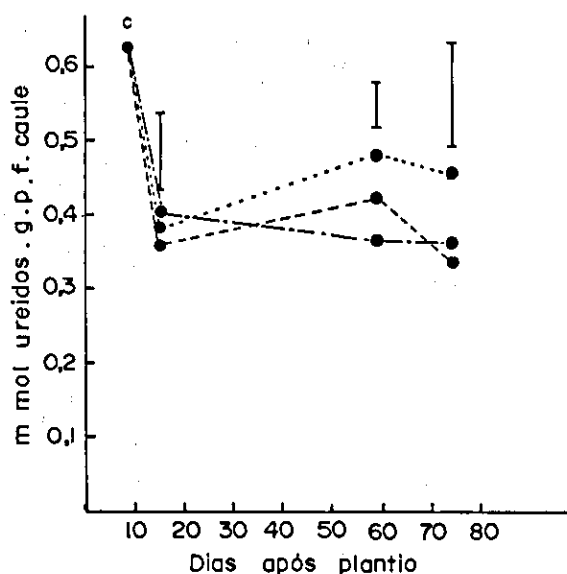


FIG. 3. Variação sazonal na concentração de ureídeos no caule de soja (a), feijão (b) e leucena (c). I - representa o DMS (Tukey) entre os tratamentos ( $p = 0,05$ ). ↓ indica o início da floração (o—o) controle-plantas inoculadas com *Rhizobium*; (o—o) plantas inoculadas com *Rhizobium* + nitrato durante todo o ciclo de desenvolvimento; (o . o) plantas inoculadas com *Rhizobium* + amônia aplicada 24 horas antes da colheita.

do por McNeil et al. (1979). Tal processo explicaria muito mais a ocorrência de uma estreita relação entre a produção e a percentagem de N-ureído transportado na seiva durante o início do enchimento dos grãos, do que entre a produção e o nitrogênio total da parte aérea neste mesmo período. Estas relações já foram observadas em soja sob condições de campo e casa de vegetação (Neves et al. 1985) e em feijão (Hungria & Neves 1984, Hungria & Neves 1986). A possibilidade de tal transporte preferencial é fortalecida pelo fato de as lâminas foliares acumularem pouca quantidade de ureído, menos de 1,5% do seu nitrogênio total (Streeter 1979) e de já ter sido demonstrada a existência de um "by-pass" com relação às folhas de certos aminoácidos (Sharkey & Pate 1975).

Com relação ao fornecimento de nitrato para as plantas, Matsumoto et al. (1977) também obser-

varam uma diminuição na acumulação de ureídeos nos tecidos da parte aérea. A presença de nitrato diminui a produção de ureídeos, paralelamente com a inibição da formação dos nódulos (Yamamoto & Yatazawa 1975) e da atividade da nitrógenase (Gibson & Pagan 1977).

As observações de correlações entre produção de grão e percentagem de ureídeos na seiva, abrem possibilidades de selecionar combinações simbióticas mais produtivas através da análise da seiva. Porém, em decorrência das dificuldades de se coletar seiva em quantidades mensuráveis, é possível que a análise do teor de ureídeos nos tecidos do caule possa ser usada mais convenientemente em programas de seleção.

Nem todas as leguminosas, como por exemplo a leucena, utilizam os ureídeos no transporte dos produtos provenientes da fixação de nitrogênio. Esta parece ser uma característica das espécies da tribo *Phaseoleae* (Sprent 1980, Goi & Neves 1982), que formam nódulos do tipo Aeschynomenoide.

#### REFERÊNCIAS

- BREMNER, J.M. Total nitrogen. In: BLACK, C.A.; EVANS, D.D.; WHITE, J.L.; ENSMINGER, L.E.; CLARK, F.E., ed. Methods of soil analysis; chemical and microbiological properties. Madison, Wis., American Society of Agronomy, 1965. parte 2, p.1149-78.
- DART, P.J.; DAY, J.M.; HARRIS, D. Assay of nitrogenase activity by acetylene reduction. In: USE of isotopes for study of fertilizer utilization by legume crops. Viena, FAO/IAEA, 1972. p.85-100.
- GIBSON, A.H. & PAGAN, J.D. Nitrate effects on the nodulation of legumes inoculated with nitrate-reductase deficient mutants of *Rhizobium*. *Planta*, 134: 17-22, 1977.
- GOI, S.R. & NEVES, M.C.P. Teor de ureídeos, tipo de nódulos e atividade da nitrogenase de leguminosas forrageiras florestais e de grão. *Pesq. agropec. bras.*, 17(1):43-50, 1982.
- HANKS, J.F.; TOLBERT, N.E.; SCHUBERT, K.R. Localization of enzymes of ureide biosynthesis in peroxisomes and microsomes of nodules. *Plant Physiol.*, 68:65-9, 1981.
- HERRIDGE, D.F.; ATKINS, C.A.; PATE, J.S.; RAINBIRD, R.M. Allantoin and allantoic acid in the nitrogen economy of the cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Plant Physiol.*, 62:495-8, 1978.
- HUNGRIA, M. & NEVES, M.C.P. Interação entre cultivares de *Phaseolus vulgaris* e estirpes de *Rhizobium* na fixação e transporte do nitrogênio. *Pesq. agropec. bras.*, 21(2):127-40, 1986.

- HUNGRIA, M. & NEVES, M.C.P. Seasonal variations on nodule metabolism of *Phaseolus vulgaris*. In: VEEGER, C. & NEWTON, W.E. Advances in nitrogen fixation research. The Hague, M. Nijhoff/W. Junk, 1984. p.505.
- MCCLURE, P.R. & ISRAEL, D.W. Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants. *Plant Physiol.*, 64: 411-6, 1979.
- MCCLURE, P.R.; ISRAEL, D.W.; VOLK, R.J. Evaluation of the relative ureide content of xylem sap as an indicator of N<sub>2</sub> fixation in soybeans. *Plant Physiol.*, 66:720-5, 1980.
- MCNEIL, D.L.; ATKINS, C.A.; PATE, J.S. Uptake and utilization of xylem-borne amino compounds by shoot organs of a legume. *Plant Physiol.*, 63:1076-81, 1979.
- MATSUMOTO, T.; YATAZAWA, M.; YAMAMOTO, Y. Effects of exogenous nitrogen-compounds on the concentration of allantoin and various constituents in several organs of soybean plants. *Plant Cell Physiol.*, 18:613-24, 1977.
- MINCHIN, F.R.; SUMMERFIELD, R.J.; HADLEY, P.; ROBERTS, E.H.; RAWSTHORNE, S. Carbon and nitrogen nutrition of nodulated roots of grain legumes. *Plant Cell Environ.*, 4:5-26, 1981.
- NEVES, M.C.P. Carbon and nitrogen nutrition of cowpea (*Vigna unguiculata*). Reading, University of Reading, 1978. 229p. Tese Doutorado.
- NEVES, M.C.P. Energy cost of biological nitrogen fixation. In: GRAHAM, P.H. & HARRIS, S.C. Biological nitrogen fixation technology for tropical agriculture. Cali, CIAT, 1982. p.77-92.
- NEVES, M.C.P.; DIDONET, A.D.; DUQUE, F.F.; DÓBREINER, J. *Rhizobium* strain effects on nitrogen transport and distribution in soybeans. *J. Exp. Bot.*, 36(169):1-14, 1985.
- NEWCOMB, E.H. & TANDON, S.R. Uninfected cells of soybean root nodules; ultrastructure suggests key role in ureide production. *Science*, 212:1394-6, 1981.
- PABON, M.D.C.L.; NEVES, M.C.P.; BODDEY, R.M. Variação diurna no funcionamento dos nódulos de *Phaseolus vulgaris*. *An. Acad. Bras. Ci.*, 54:760, 1982.
- PATE, J.S. Movement of nitrogenous solutes in plants. In: NITROGEN 15 in soil plant studies. Viena, IAEA, 1971. p.165-87.
- PATE, J.S. & MINCHIN, F.R. Comparative studies of carbon and nitrogen nutrition of selected grain legumes. In: SUMMERFIELD, R.J. & BUNTING, A. H. Advances in legume science. London, Royal Botanic Gardens, 1980. p.105-14.
- SCHUBERT, K.R. & BOLAND, M.J. The cellular and intracellular organization of the reactions of ureide biogenesis in nodules of tropical legumes. In: VEEGER, C. & NEWTON, W.E. Advances in nitrogen fixation research. The Hague, M. Nijhoff/W. Junk, 1984. p.445-51.
- SHARKEY, P.J. & PATE, J.S. Selectivity in xylem to phloem transfer of amino acids in fruiting shoots of white lupin (*Lupinus albus* L.). *Planta*, 127:251-62, 1975.
- SPRENT, J.I. Most nodule anatomy, type of export product and evolutionary origin in some leguminosae. *Plant Cell Environ.*, 3:35-43, 1980.
- STREETER, J.G. Allantoin and allantoinic acid in tissues and stem exudate from field-grown soybean plants. *Plant Physiol.*, 63:478-80, 1979.
- SUMMERFIELD, R.J.; HUXLEY, P.A.; MINCHIN, F.R. Plant husbandry and management techniques for growing grain legumes under simulated tropical conditions in controlled environments. *Exp. Agric.*, 13: 81-92, 1977.
- TAJIMA, S. & YAMAMOTO, Y. Enzymes of purine catabolism in soybean plants. *Plant Cell Physiol.*, 16: 271-82, 1975.
- VINCENT, J.M. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. Oxford, Blackwell Scientific, 1970. p.5-6. (IBP handbook, 15)
- YAMAMOTO, Y. & YATAZAWA, M. Formation and functions of nitrogen fixing nodule in soybean; allantoin formation in the symbiotic condition. In: TAKAHASHI, H. Nitrogen fixation and nitrogen cycle. Tokio, University of Tokio Press, 1975. p.25-34.
- YOUNG, E.G. & CONWAY, C.P. On the estimation of allantoin by the Rimini-Schryver reaction. *J. Biol. Chem.*, 142:839-53, 1942.