

EFEITO DA MANIPULAÇÃO DE FOTOSINTATOS NA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO EM FEIJOEIRO¹

MARIANGELA HUNGRIA² e MARIA CRISTINA P. NEVES³

RESUMO - Em dois experimentos, conduzidos em casa de vegetação, procurou-se verificar o efeito da disponibilidade de carbono para os nódulos na fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). A retirada das flores aumentou, inicialmente, a atividade da nitrogenase, a eficiência relativa dos elétrons destinados à nitrogenase (ER) e a taxa de translocação dos compostos nitrogenados na seiva do xilema, mas dentro de dez dias houve uma queda drástica nesses parâmetros, em virtude da aceleração no processo de senescência dos nódulos. A retirada de 50% das folhas no florescimento provocou um declínio na atividade da nitrogenase, na ER e no transporte de N na seiva do xilema, mas, após dez dias, iniciou-se uma recuperação, atribuída à produção de folhas novas, o que não ocorreu quando a retirada das folhas foi realizada no período médio de enchimento dos grãos. O anelamento do caule do feijão, impedindo a translocação de fotossintatos para os nódulos, provocou uma queda na atividade da nitrogenase, na ER e no transporte de N na seiva, mas o decréscimo na atividade da nitrogenase só ocorreu 24 horas após o anelamento, indicando que no sistema radicular de feijão há uma quantidade considerável de substratos de reserva para a fixação de nitrogênio.

Termos para indexação: *Rhizobium*, atividade da nitrogenase, liberação do hidrogênio, assimilação de nitrogênio, ureídeos.

EFFECTS OF PHOTOSYNTHATE MANIPULATION ON BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION IN COMMON BEAN PLANTS

ABSTRACT - Two experiments were performed, under greenhouse conditions, to investigate the effect of availability of carbon to the nodules on biological nitrogen fixation in common bean plants. Removal of flowers initially increased nitrogenase activity, relative efficiency of electrons for nitrogenase (RE) and rate of nitrogen translocation in the xylem sap, but within ten days all these parameters decreased due to an acceleration of nodule senescence. The removal of 50% of the leaves at flowering decreased nitrogenase activity, RE and N translocation in the xylem sap, but after ten days the plants began recover in these parameters due to the production of new leaves, which did not happen when the leaves were removed at mid-pod filling stage. The stem ringing, hampering translocation of photosynthates to the nodules, decreased nitrogenase activity, RE, and N transport in xylem sap, but the decrease in nitrogenase activity occurred 24 hours after ringing, indicating that in bean roots there is a considerable quantity of stored substrates for N₂ fixation.

Index terms: *Rhizobium*, nitrogenase activity, hydrogen release, nitrogen assimilation, ureides.

INTRODUÇÃO

A fixação biológica do nitrogênio é um processo que se caracteriza por uma alta demanda de energia, obtida do metabolismo de carboidratos supridos pela planta hospedeira. Os fotossintatos fornecidos aos nódulos são usados para gerar ATP e poder redutor necessários à redução de nitrogênio atmosférico a amônia e ainda para a manutenção do metabolismo do citossol da planta hospedeira

e suprimento de esqueletos de carbono necessários para a síntese dos compostos nitrogenados (Rawsthorne et al. 1980). Conseqüentemente, pode haver um consumo, pelos nódulos, de até 30% dos fotossintatos produzidos pela planta e, se a simbiose não for eficiente, haverá uma redução do potencial de produção das leguminosas (Schubert & Ryle 1980).

A disponibilidade de carbono pode ser um fator limitante no controle da fixação de N₂. Desse modo, manipulações das condições que conduzem ao aumento do fornecimento de fotossintatos também levam ao aumento da fixação do N₂. Isso foi verificado com aplicação de CO₂ (Hardy & Havelka 1973), suprimento de carbono para os nódulos (Schreven 1959), abaixamento da pressão de oxigênio, diminuindo a fotorrespiração (Quebedeaux

¹ Aceito para publicação em 21 de junho de 1985. Parte da tese de Doutorado da primeira autora. Apresentado na XII Reunião Latino-Americana sobre *Rhizobium*, Campinas, 21 a 26 de outubro de 1984.

² Enga. - Agra., Dra. EMBRAPA/Unidade de Apoio ao Programa Nacional de Pesquisa em Biologia do Solo (UAPNPBS), km 47, CEP 23460 Seropédica, RJ.

³ Bióloga, Ph.D., EMBRAPA/UAPNPBS.

& Hardy 1975), e enxertia de uma segunda parte aérea no mesmo sistema radicular (Streeter 1974).

A redução parcial ou total do nível de luminosidade reduz, por exemplo, o peso de nódulos, atividade da nitrogenase, nitrogênio total da planta, teor de sacarose e nível de ATP nos nódulos (Rocha et al. 1970, Ching et al. 1975, Bethlenfalvay & Phillips 1977, Antoniw & Sprent 1978). A retirada das folhas tem efeito semelhante ao da redução da luminosidade (Moustaffa et al. 1969, Pandey 1983, Patterson & La Rue 1983).

Por outro lado, a retirada das flores e vagens diminui a competição por carbono entre o tecido nodular e os órgãos reprodutivos da planta, prolongando a atividade da nitrogenase (Lawn & Brun 1974, Ham et al. 1976, Bethlenfalvay et al. 1978).

Da mesma forma, quando a translocação de fotossintatos para os nódulos é impedida pelo anelamento (Lawn & Brun 1974) ou diminuída, através de um estresse hídrico (Sprent 1972), há um decréscimo substancial na fixação de N_2 . Lawn & Brun (1974) constataram um decréscimo superior a 50% na atividade da nitrogenase da soja, em apenas duas horas após o anelamento.

Por outro lado, há experimentos em que a fixação biológica de nitrogênio não foi prejudicada pela redução do nível de luminosidade (Sprent & Bradford 1976, Wahua & Miller 1978, Schweitzer & Harper 1980) ou pela retirada parcial das folhas (Chu & Robertson 1974, Teigen & Vorst 1975, Sheldrake & Narayanan 1976). Do mesmo modo, a retirada das flores e vagens pode não levar necessariamente ao incremento na atividade da nitrogenase e N total das plantas (Brun 1976, Ndunguru et al. 1976, Wilson et al. 1978, Malik 1983, Riggle et al. 1984).

No presente trabalho, procurou-se verificar o efeito que a alteração dos níveis de fotossintatos tem na fixação biológica de N_2 em feijão.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram conduzidos dois experimentos, em casa de vegetação, na Unidade de Apoio ao Programa Nacional de Pesquisa em Biologia do Solo (UAPNPBS), da EMBRAPA, km 47, Seropédica, RJ.

No primeiro experimento, instalado em setembro de 1982, procurou-se verificar o efeito da retirada de folhas e vagens na fixação do N_2 . Sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivar Carioca foram inoculadas com a estir-

pe C-05 (CENA, Piracicaba) de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. As bactérias cresceram em meio definido de Vincent (1970), colocando-se, então, 1 ml de inoculante (com cerca de 10^8 células/ml) para cada 15 sementes esterilizadas com $HgCl_2$ 0,2% (Vincent 1970).

Foram usados vasos de metal com capacidade de 6 l contendo uma mistura de areia e vermiculita (1/2, v/v), lavadas por sete dias e esterilizadas a seco, a $120^\circ C$, por 36 horas.

Na semeadura, colocaram-se cinco sementes por vaso, cobrindo-se, então, com uma camada de areia esterilizada de, aproximadamente, 3 cm. Aos sete dias após a germinação (DAG), procedeu-se ao desbaste, deixando-se duas plantas por vaso.

A cada quatro dias, forneceu-se às plantas solução nutritiva isenta de nitrogênio e contendo: NaH_2PO_4 (0,725 mM); KH_2PO_4 (0,725 mM); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (3,1 mM); $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ (2,9 mM); K_2SO_4 (1,5 mM); $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ (1 μM); $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,1 μM); $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,1 μM); H_3BO_3 (5 μM); $NaCl$ (10 μM); $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ (0,5 μM); $CaSO_4 \cdot 6H_2O$ (0,02 μM) e $FeEDTA$ (5 μM), pH 6.0 a 6.2.

As adições de água foram feitas uma ou duas vezes por dia, baseando-se no peso de cinco vasos de cada tratamento, sorteados ao acaso.

O experimento constou de quatro tratamentos: (1) controle (plantas sem nenhuma manipulação); (2) retirada de 50% das folhas no florescimento (35 DAG); (3) retirada de 50% das folhas no período médio de enchimento dos grãos (50 DAG); e (4) retirada das flores.

Foram realizadas oito coletas dos seguintes tratamentos e nas seguintes épocas: 35 DAG (tratamento 1); 40-45-50 DAG (tratamentos 1, 2 e 3); 55-60-70 DAG (tratamentos 1, 2, 3 e 4).

O delineamento experimental usado foi em blocos ao acaso, com quatro repetições.

No segundo experimento, instalado em abril de 1982, realizou-se o anelamento do caule das plantas de feijão, com a finalidade de bloquear o transporte de fotossintatos para os nódulos.

Plantas de feijão cultivar Carioca inoculadas com a estirpe C-05 foram crescidas em vasos de plástico, de 3,5 l, deixando-se duas plantas por vaso. A condução do experimento foi como a do primeiro experimento.

O anelamento foi realizado logo acima do nó cotiledonar às 7 h ou às 14 h em plantas com 35 dias. Foram realizadas quatro coletas no primeiro dia e duas, no segundo dia após o anelamento. O delineamento experimental usado foi em blocos ao acaso, com quatro repetições.

Nos dois experimentos, das duas plantas de cada vaso, uma foi usada para a determinação da atividade da nitrogenase e a outra, para a determinação da liberação de H_2 . Depois, retiraram-se os nódulos das raízes e levaram-se as folhas, caules, cascas das vagens, sementes, raízes e nódulos para secagem em estufa a $60^\circ C$ - $70^\circ C$, até atingirem peso constante.

Para a determinação da atividade da nitrogenase, utilizou-se o método de redução de C_2H_2 em raízes destaca-

das (Mague & Burris 1972). Após o corte da parte aérea na altura do nó cotiledonar, as raízes foram colocadas em vidros de 250 ml que foram fechados hermeticamente com rolha do tipo "Suba-Seal", injetando-se, então, acetileno equivalente à concentração de 12%.

Após a condução do experimento, Minchin et al. (1983) verificaram que a atividade da nitrogenase poderia declinar rapidamente em presença do acetileno. Essa inibição não seria constante, podendo variar com a espécie da planta, estirpe de bactéria e condições ambientais. Desse modo, realizou-se um experimento adicional para verificar se a cultivar e estirpe utilizadas apresentavam queda na atividade da nitrogenase. Utilizou-se um sistema de fluxo contínuo em tubos de vidro abertos, de 100 ml, que foram fechados com rolhas de borracha. Manteve-se a taxa de fluxo de 100 ml.min.⁻¹ tubo⁻¹ contendo 12% de acetileno. As leituras foram realizadas a 1, 3, 4, 5, 7, 10, 15 e 30 minutos após o início da incubação. Verificou-se que a inibição da nitrogenase foi somente de 4,1% para 'Carioca'/CO₂. Desse modo, os resultados encontrados nos sistemas fechados que foram utilizados parecem não ter as restrições sugeridas por Minchin et al. (1983).

O etileno foi determinado em um cromatógrafo Perkin Elmer FII, com detector por ionização de chama, usando-se uma coluna de aço inoxidável com 0,32 cm (diâmetro interno) por 50 cm de comprimento, contendo Poropak N (80 - 100 mesh) e operada a 40°C, utilizando N₂ como gás carregador ao fluxo de 40 ml.min.⁻¹.

A liberação de H₂ foi determinada em nódulos destacados com pequenos segmentos radiculares, ± 0,5 cm, para impedir injúrias mecânicas e permitir um suprimento de carbono (Schubert & Evans 1976). Os nódulos destacados foram colocados em vidros de 30 ml, contendo um pedaço de papel absorvente para evitar o dessecamento. Os frascos foram fechados hermeticamente com rolhas do tipo "Suba-Seal" e incubados em ar, por 30 minutos, em temperatura ambiente, retirando-se, então, 0,5 ml de amostra para leitura no cromatógrafo. Minchin et al. (1983) verificaram que não há queda na liberação de H₂ quando a incubação é feita sob ar.

As leituras foram feitas em cromatógrafo Varian modelo 1420, usando detector de condutividade térmica. Utilizou-se uma coluna de aço inoxidável, com 0,32 cm (diâmetro externo) por 100 cm de comprimento, contendo peneira molecular 5Å (80 a 100 mesh) e operada a 40°C, usando-se argônio como gás de arraste ao fluxo de 25 ml.min.⁻¹.

A eficiência relativa foi calculada pelo parâmetro de Schubert & Evans (1976), ou seja,

$$ER = 1 - \left(\frac{C_2H_2 \text{ reduzido}}{H_2 \text{ evoluído (ar)}} \right)$$

Para a coleta e análise da seiva do xilema, as plantas foram cortadas com gilete na altura do nó cotiledonar, procedendo-se à lavagem do corte com água destilada e secagem com lenço de papel. A seiva exsudada foi então coletada em pipetas microcapilares calibradas (20 µl e 50 µl), durante 15 minutos, calculando-se, então, a taxa de exsudação. A seiva foi mantida a -20°C, até o momento das

análises. Os compostos nitrogenados foram determinados em alíquotas de 5 µl.

N-ureído - Analisado pelo método colorimétrico de Vogels & Drift (1970), baseado na hidrólise da alantoína e ácido alantóico a glioxalato.

N-α-amino - Analisado pelo método de Matheson et al. (1961). O reagente ninidrina - hidridantina foi preparado de acordo com a descrição feita por esses autores. A hidridantina foi preparada segundo Connel et al. (1955).

N - NH₄ + - Determinado pelo método de Mitchell (1972), substituindo-se a solução de hipoclorito de sódio por dicloroisocianurato de sódio (Felker 1977).

N-amina - A hidrólise ácida de N-amina para N-NH₄⁺ foi feita segundo Thomas et al. (1979) e a amônia foi determinada tal como descrito acima.

N total - Utilizou-se o método micro-Kjeldahl segundo Bohley (1967), e a amônia foi determinada segundo descrição acima.

O N total das folhas, caule, sementes e casca da vagem foi determinado pelo método semimicro-Kjeldahl segundo Liao (1981); a destilação e titulação foram feitas segundo Bremner & Edwards (1965).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 estão os dados do primeiro experimento referentes aos pesos de matéria seca nas diversas partes da planta de feijão, e nas Fig. 1, 2 e 3, os resultados referentes ao acúmulo de nitrogênio nas folhas, caule, vagens e em toda a planta.

A retirada das flores, que começou entre 33 e 35 dias após a germinação (DAG) provocou, em relação ao tratamento controle, um incremento no peso de matéria seca e nitrogênio total das folhas aos 40 DAG. Esse comportamento se efetivou até o final do ciclo (Tabela 1 e Fig. 1). Na maioria das coletas isso também foi verificado nos dados referentes ao peso de matéria seca e nitrogênio total do caule, porém nenhum efeito foi notado sobre o peso dos nódulos e das raízes, conforme foi observado também por Wilson et al. (1978).

Entretanto, quando se adicionou o peso das vagens ao peso dos órgãos vegetativos do tratamento controle, verificou-se que o peso seco total dessas plantas superou em 145% o peso seco total das plantas sem flores (Tabela 1). Essa observação está de acordo com os resultados obtidos em soja que constataram que as vagens estimularam a atividade fotossintética (Clough et al. 1981). Do mesmo modo, adicionando-se o nitrogênio total das vagens (Fig. 2) ao nitrogênio das folhas e caules do tratamento controle (Fig. 1), observou-se uma superior-

ridade de 125% em relação às plantas sem flores (Fig. 3).

Vários autores, como Lawn & Brun (1974), Ham et al. (1976), Bethlenfalvay et al. (1978) e Patterson & La Rue (1983), têm sugerido que a retirada das flores diminui a competição por carbono entre o tecido nodular e os órgãos reprodutivos, prolongando a fixação de N₂ e, conseqüentemente, aumentando o nitrogênio total da planta.

Em outros experimentos, porém, foi demons-

trado que as plantas com flores e vagens podem apresentar taxas mais elevadas de fixação de N₂ do que as plantas controle (Mague & Burris 1972, Brun 1976). Isso foi atribuído ao consumo de nitrogênio pelas vagens, estimulando a continuação do processo de fixação de N₂ (efeito "sink"). Os resultados encontrados neste experimento com o feijão indicam que a menor demanda de nitrogênio pelas plantas sem flores leva ao decréscimo progressivo da fixação de N₂.

TABELA 1. Efeito da retirada das flores e da retirada de 50% das folhas no acúmulo de matéria seca em feijão. Médias de oito repetições.

Tratamentos	Peso de matéria seca (g.pl ⁻¹)							
	Folha	Caule	Raiz	Nódulos	Casca da vagem	Semente	Folha senescente	Total
	35 dias após a germinação							
Controle	1,72	1,42	0,43	0,160				3,73
	40 dias após a germinação							
Controle	2,28b*	1,87b	0,49	0,203				4,84b
Desfolhado F**	1,26c	1,74b	0,50	0,158				3,66c
Sem flores	2,91a	2,44a	0,50	0,207				6,06a
	45 dias após a germinação							
Controle	2,51b	3,22	0,58	0,173				6,48b
Desfolhado F	1,68c	2,69	0,58	0,133				5,08c
Sem flores	3,12a	3,24	0,59	0,164				7,11a
	50 dias após a germinação							
Controle	3,52a	4,12a	0,76	0,190	1,02a	1,36a		10,97a
Desfolhado F	1,68b	2,49b	0,74	0,184	0,48b	0,66b		6,23b
Sem flores	3,73a	4,06a	0,76	0,158				8,71ab
	55 dias após a germinação							
Controle	3,73b	3,45b	1,18	0,140	1,26ab	2,37a		12,13a
Desfolhado F**	2,36c	2,24c	1,16	0,141	1,38a	2,29ab		9,57b
Desfolhado MEG***	1,82c	3,31b	1,20	0,112	1,08b	1,80b		9,32b
Sem flores	4,78a	4,49a	1,14	0,144				10,55ab
	60 dias após a germinação							
Controle	4,43a	4,46b	1,26	0,151	2,57a	4,08a		16,95a
Desfolhado F	2,15b	2,99c	1,19	0,146	1,65b	3,36b		11,49bc
Desfolhado MEG	1,45c	3,24c	1,25	0,127	1,57b	2,88b		10,52c
Sem flores	4,84a	6,02a	1,24	0,130				12,23b
	70 dias após a germinação							
Controle	1,84b	4,20b	1,17	0,144	2,58	10,47a	2,36a	22,76a
Desfolhado F	1,06c	2,71c	1,13	0,138	2,43	9,25b	1,09b	17,81b
Desfolhado MEG	0,84d	2,51c	1,12	0,138	2,33	8,15c	0,58b	15,67b
Sem flores	2,86a	5,14a	1,16	0,139			3,10a	12,40c

* Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, ao nível de 1%.

** Desfolhamento aos 35 dias após a germinação (florescimento).

*** Desfolhamento aos 50 dias após a germinação (metade do período de enchimento dos grãos).

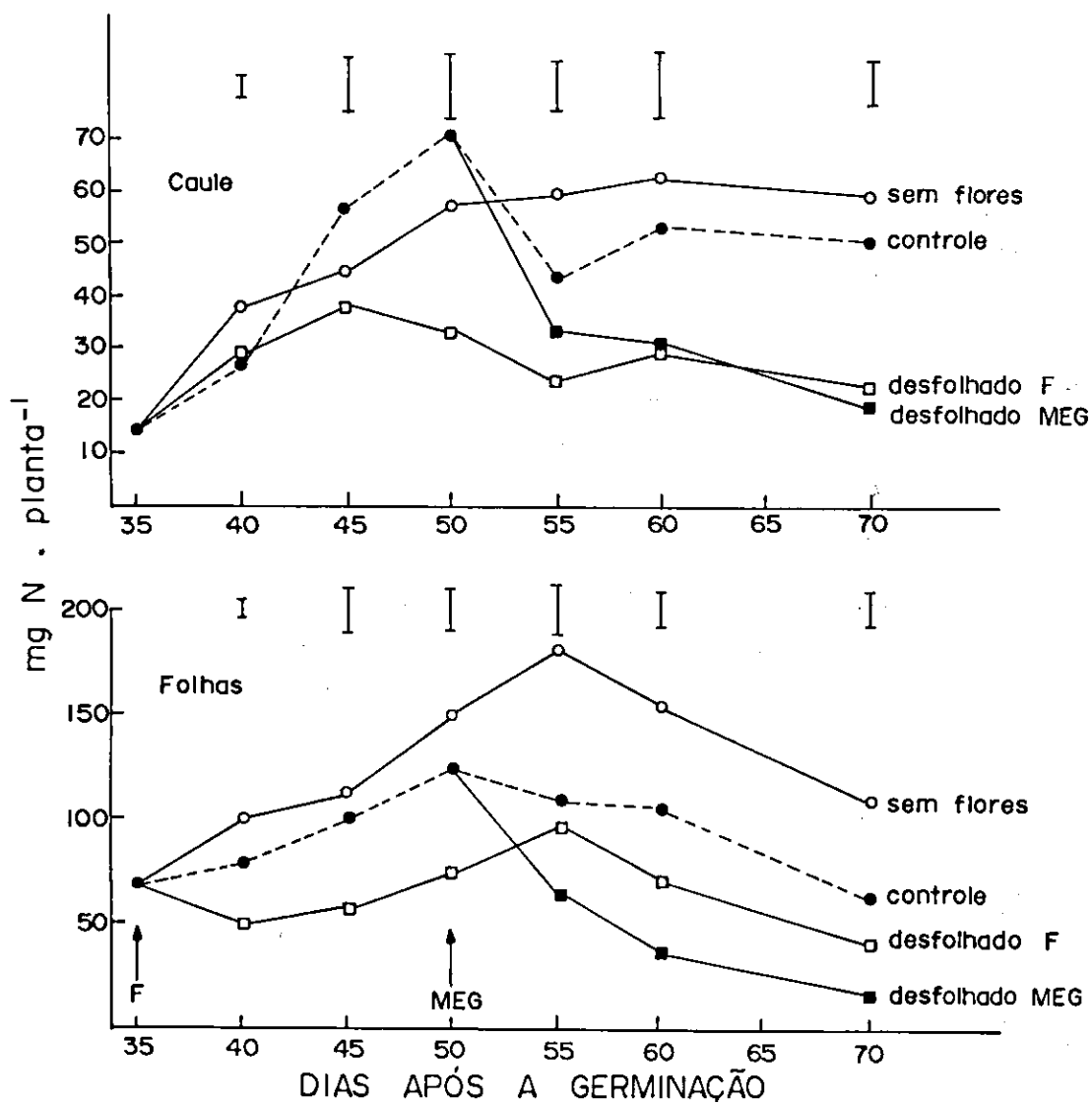


FIG. 1. Nitrogênio total acumulado durante o ciclo do feijão submetido à retirada das flores e de 50% das folhas no florescimento (F) ou no período médio de enchimento dos grãos (MEG). Médias de oito repetições. As barras verticais indicam dms ao nível de 1%.

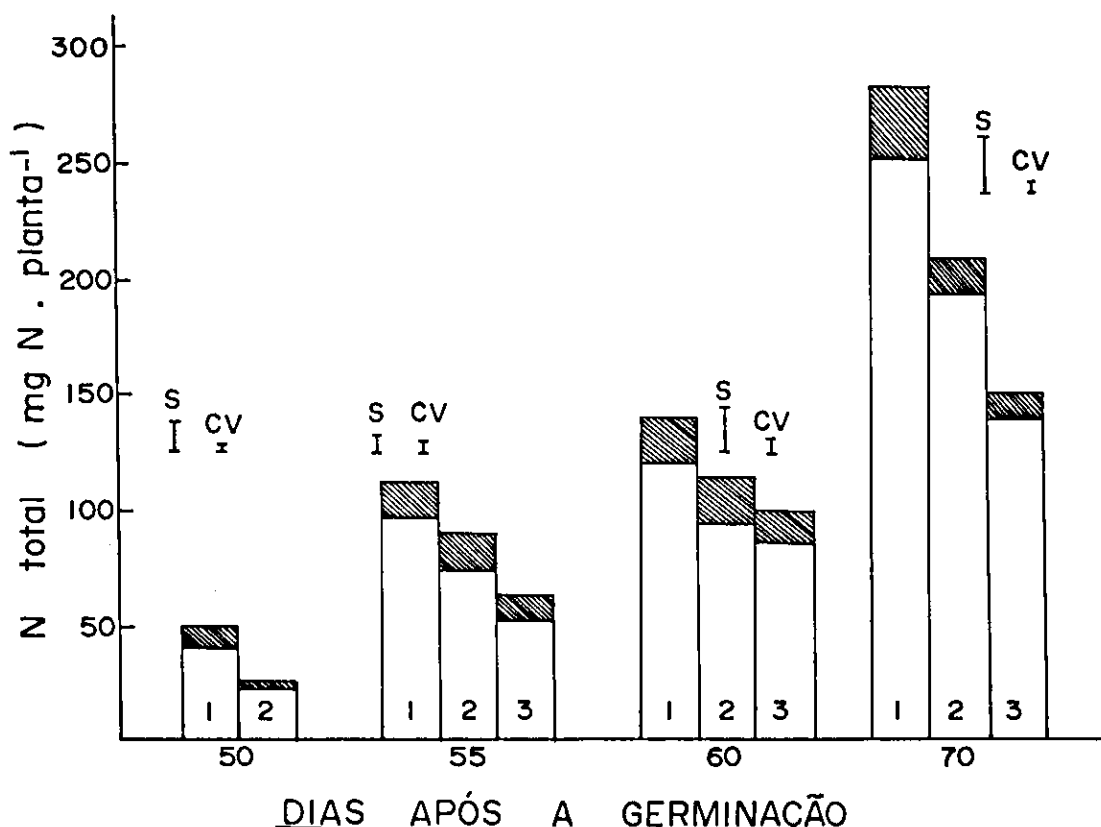


FIG. 2. Nitrogênio total na casca da vagem (CV) e na semente (S) de feijão. Os tratamentos são representados por 1 - controle; 2 - retirada de 50% das folhas no florescimento (35 dias após a germinação); 3 - retirada de 50% das folhas no período médio de enchimento dos grãos (50 dias); □ sementes; ▨ casca de vagem. Médias de oito repetições. As barras verticais representam dms ao nível de 1%.

Ainda se pode observar, na Tabela 1, os dados relativos ao peso de matéria seca nas diversas partes das plantas submetidas à retirada de 50% das folhas (novas e velhas), no florescimento (35 DAG) ou no período médio de enchimento dos grãos (50 DAG).

Logicamente, o menor peso seco de folhas e caule foi obtido nos tratamentos nos quais se fez o desfolhamento, mas, quando este foi realizado no florescimento, houve uma recuperação parcial das plantas devido à produção de folhas novas. A mesma tendência de recuperação ocorreu no acúmulo de nitrogênio nas folhas e caule. Quando o desfolhamento foi realizado no período médio de enchimento dos grãos, porém, não houve mais tempo para recuperação (Tabela 1 e Fig. 1).

Quando se retiraram 50% das folhas aos 35 DAG

e aos 50 DAG, obteve-se uma redução de 11,6% e 22,2% na produtividade das sementes (Tabela 1). Teigen & Vorst (1975) e Sheldrake & Narayanan (1976) também verificaram que, em soja e guandu, a queda da produtividade não era proporcional à retirada das folhas, ocorrendo um decréscimo máximo de 23% na produtividade da soja com a retirada de 50% das folhas. Recuperação semelhante foi observada em relação ao nitrogênio acumulado nas vagens (Fig. 2), nos quais a retirada das folhas no florescimento e no período médio de enchimento dos grãos resultou em um decréscimo de 23% e 45%, respectivamente. Também não foi observado nenhum efeito do desfolhamento no peso dos nódulos (Tabela 1), ao contrário dos resultados obtidos por Moustaffa et al. (1969), Chu & Robertson (1974) e Chen & Sung (1982).

A análise estatística do peso dos nódulos duran-

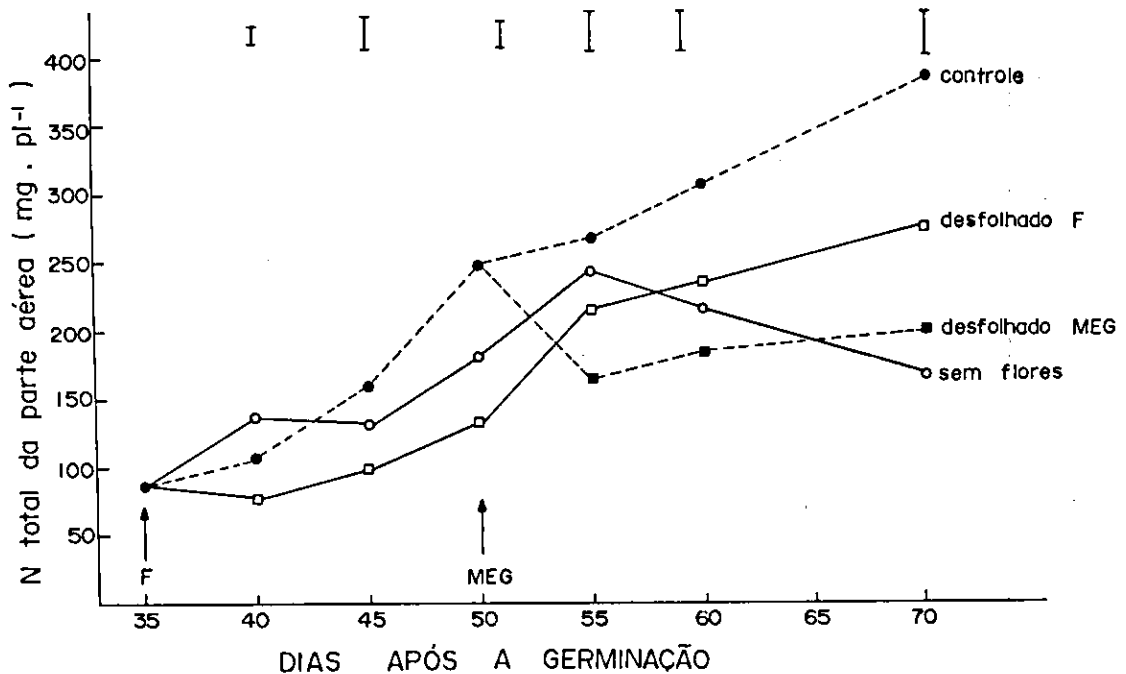


FIG. 3. Nitrogênio total da parte aérea (folha + caule + vagem) durante o ciclo de feijão submetido à retirada das flores e de 50% das folhas no florescimento (F) ou no período médio de enchimento dos grãos (MEG). Médias de oito repetições. As barras verticais indicam dms ao nível de 1%.

te o ciclo do feijão, porém, mostrou que, a partir dos 35 DAG, não houve mais incremento no peso dos nódulos das plantas controle e, provavelmente por isso, a manipulação de fotossintatos a partir dessa época não provocou nenhuma alteração.

Os dados relativos à redução do acetileno podem ser vistos na Fig. 4. Nas duas coletas que seguiram o florescimento, a maior atividade da nitrogenase ocorreu nas plantas sem flores, conforme foi também verificado por Lawrie & Wheeler (1974) em ervilha, Ndunguru et al. (1976) e Chen & Sung (1982) em caupi e Patterson & La Rue (1983) em soja. A partir dos 45 dias após a germinação, iniciou-se um período de acentuado declínio da atividade da nitrogenase, decorrente da senescência dos nódulos, que passaram a apresentar escurecimento interno mais acentuado do que nos outros tratamentos. Roponen & Virtanen (1968) observaram que a retirada das flores das plantas de ervilha atrasava a senescência dos nódulos, o que foi atribuído à maior disponibilidade de carbono para os nódulos. Segundo Malik (1983), porém, a senescência não seria uma consequência do estresse nu-

tricional causado pelos frutos, mas estaria relacionada a fatores fisiológicos ou nutricionais que ocorrem na fase de desenvolvimento reprodutivo. Peat et al. (1981) também observaram que as estruturas reprodutivas poderiam promover a fixação de N₂ na primeira fase de enchimento dos grãos.

Como pode ser visto na Fig. 4, a retirada de 50% das folhas provocou, de imediato, uma redução drástica na atividade da nitrogenase. Quando o desfolhamento foi realizado no florescimento, porém, houve a produção de novas folhas e, logo aos 40 DAG, já teve início um período de recuperação da atividade da nitrogenase atingindo, nas duas últimas coletas, valores idênticos aos das plantas controle. Malik (1983) observou que a enxertia de uma parte aérea com folhas novas induzia a mudanças fisiológicas ou hormonais que prolongavam a atividade da nitrogenase. Desse modo, as folhas novas podem estar relacionadas ao incremento observado nas plantas desfolhadas no florescimento.

Quando o desfolhamento foi realizado aos 50 DAG, porém, houve um declínio drástico na

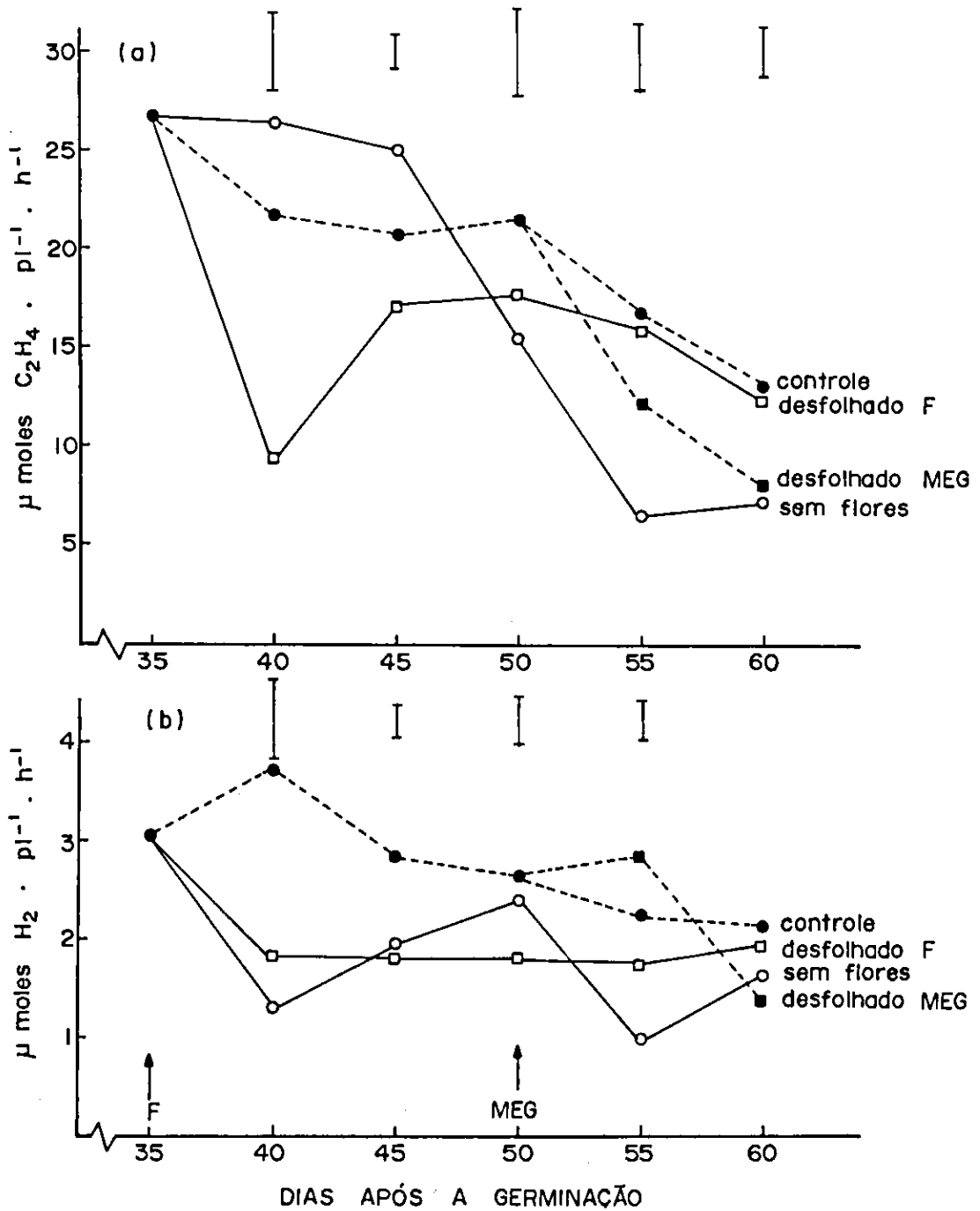


FIG. 4. Efeito da retirada das flores e da retirada de 50% das folhas no florescimento (F) ou no período médio de enchimento dos grãos (MEG) na atividade da nitrogenase (a) e na liberação de H_2 (b) em feijão. Médias de quatro repetições. As barras verticais indicam dms ao nível de 1%.

atividade da nitrogenase, sem recuperação posterior, o que poderia ser explicado pelo fato de que não houve produção de folhas novas.

Os dados relativos à liberação de H_2 pelos nódulos também podem ser vistos na Fig. 4. A redução de H_3O^+ a H_2 , catalizada pela nitrogenase, ocorre simultânea e obrigatoriamente com a redução do N_2 a NH_3 , consumindo elétrons e ATP que, de outro modo, seriam utilizados para incrementar a fixação de N_2 . A liberação de H_2 varia com a espécie da planta, estirpe de bactéria e condições ambientais, diminuindo a eficiência dos sistemas simbióticos (Schubert & Evans 1976, Hungria & Ruschel 1982, Hungria & Neves 1984).

Até os 50 DAG, verificou-se diminuição na liberação de H_2 nos tratamentos desfolhados e sem flores. Quando as folhas foram retiradas, o decréscimo na perda de H_2 esteve associado à menor atividade total da nitrogenase, o que também ocorreu em caupi (Chen & Sung 1982). Ao contrário dos resultados obtidos por Bethlenfalvai et al. (1978), a menor perda de H_2 ocorreu no tratamento sem flores, embora essas plantas apresentassem atividade da nitrogenase mais elevada, indicando maior eficiência do sistema simbiótico.

De acordo com Bethlenfalvai & Phillips (1977), e McCrae et al. (1978), com limitação de carbono há diminuição na evolução de H_2 . Os resultados obtidos neste experimento, porém, mostraram-se contrários a isso, uma vez que o aumento da disponibilidade de carbono para os nódulos, devido à retirada das flores, não implicou em maior liberação de H_2 . Isso pode indicar que outros fatores, além do suprimento de carbono, estariam regulando a liberação de H_2 .

Os dados referentes à eficiência relativa (ER) dos elétrons destinados à nitrogenase podem ser vistos na Fig. 5. Bethlenfalvai et al. (1978) e Chen & Sung (1982) verificaram que, quando se retiravam as folhas e vagens, embora as taxas de redução do acetileno e evolução de H_2 fossem alteradas, a eficiência relativa não variava. Entretanto, verificou-se que, logo após a retirada das folhas, em qualquer uma das duas épocas, houve queda na ER. Por outro lado, a retirada das flores resultou em aumento da ER aos 45 DAG seguindo-se, então, um decréscimo.

Os resultados relativos ao transporte e composi-

ção da seiva do xilema podem ser vistos na Fig. 6. A taxa de transporte de nitrogênio dos nódulos para a parte aérea refletiu diretamente as variações na atividade da nitrogenase, conforme foi verificado também por Patterson & La Rue (1983) em soja.

A maior parte do nitrogênio foi transportada sob a forma de ureídeos (alantoína e ácido alantóico), que representaram de 67% a 89% da fração total de nitrogênio, o que também foi observado por Pate (1973) e Cookson et al. (1980) em feijão nodulado. O transporte do nitrogênio sob a forma de ureídeos pode representar uma vantagem energética para o sistema simbiótico devido à baixa relação C/N desses compostos e às indicações de que há menor gasto energético para a sua síntese (Pate 1973, Layzell et al. 1979, Thomas & Schrader 1981).

Já foi observado que a composição da seiva do xilema pode variar com a cultivar de feijão, com a estirpe de bactéria (Hungria & Neves 1984) e com as condições ambientais, como a temperatura (Thomas & Sprent 1984), mas neste experimento não se constataram alterações devido à manipulação de fotossintatos.

Os ureídeos apresentam menor relação C/N e, com limitação de carbono, foi observado que a amônia passa a ser transportada sob a forma desses compostos (Mothes 1961). Hungria (1985) observou que, quando feijões nodulados cresciam com um sombreamento de 25%, havia diminuição na disponibilidade de carbono para os nódulos, mas um aumento na atividade da nitrogenase, devido à redução da temperatura na zona radicular ocorrendo, então, aumento na percentagem de N transportado sob a forma de ureídeos. Neste experimento, porém, a diminuição na disponibilidade de carbono, quando as folhas foram retiradas, correspondeu a uma diminuição na atividade da nitrogenase. Por outro lado, quando mais fotossintatos ficaram disponíveis aos nódulos pela retirada das flores, aumentou a atividade da nitrogenase, até ter início um processo de aceleração na senescência dos nódulos. Deste modo, em qualquer uma dessas situações, provavelmente, foi mantida a mesma relação C/N, motivo pelo qual não se verificaram mudanças no tipo de composto nitrogenado transportado.

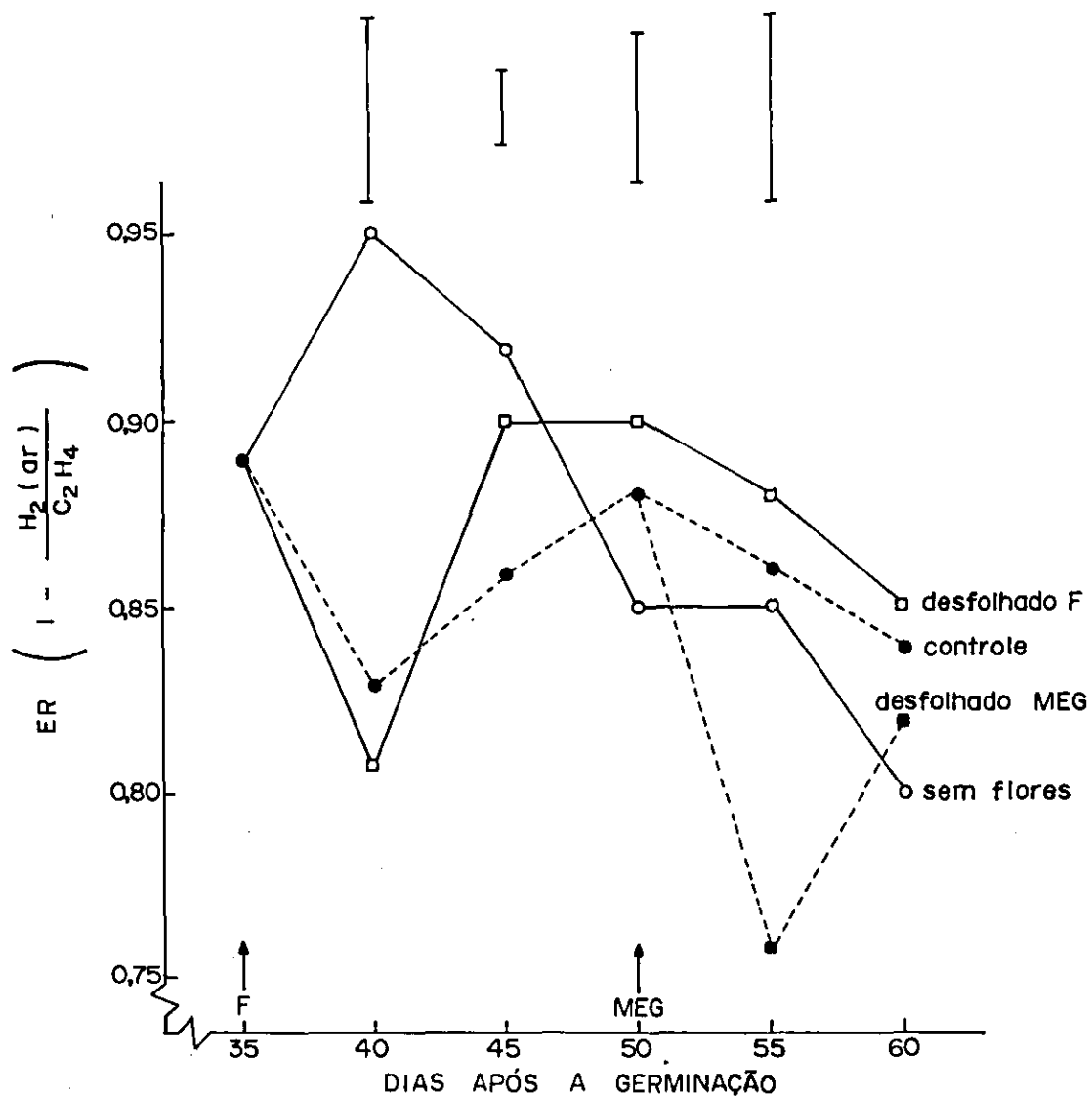


FIG. 5. Efeito da retirada das flores e da retirada de 50% das folhas no florescimento (F) ou no período médio de enchimento dos grãos (MEG) na eficiência relativa dos elétrons destinados à nitrogenase em feijão. Médias de quatro repetições. As barras verticais indicam dms ao nível de 1%.

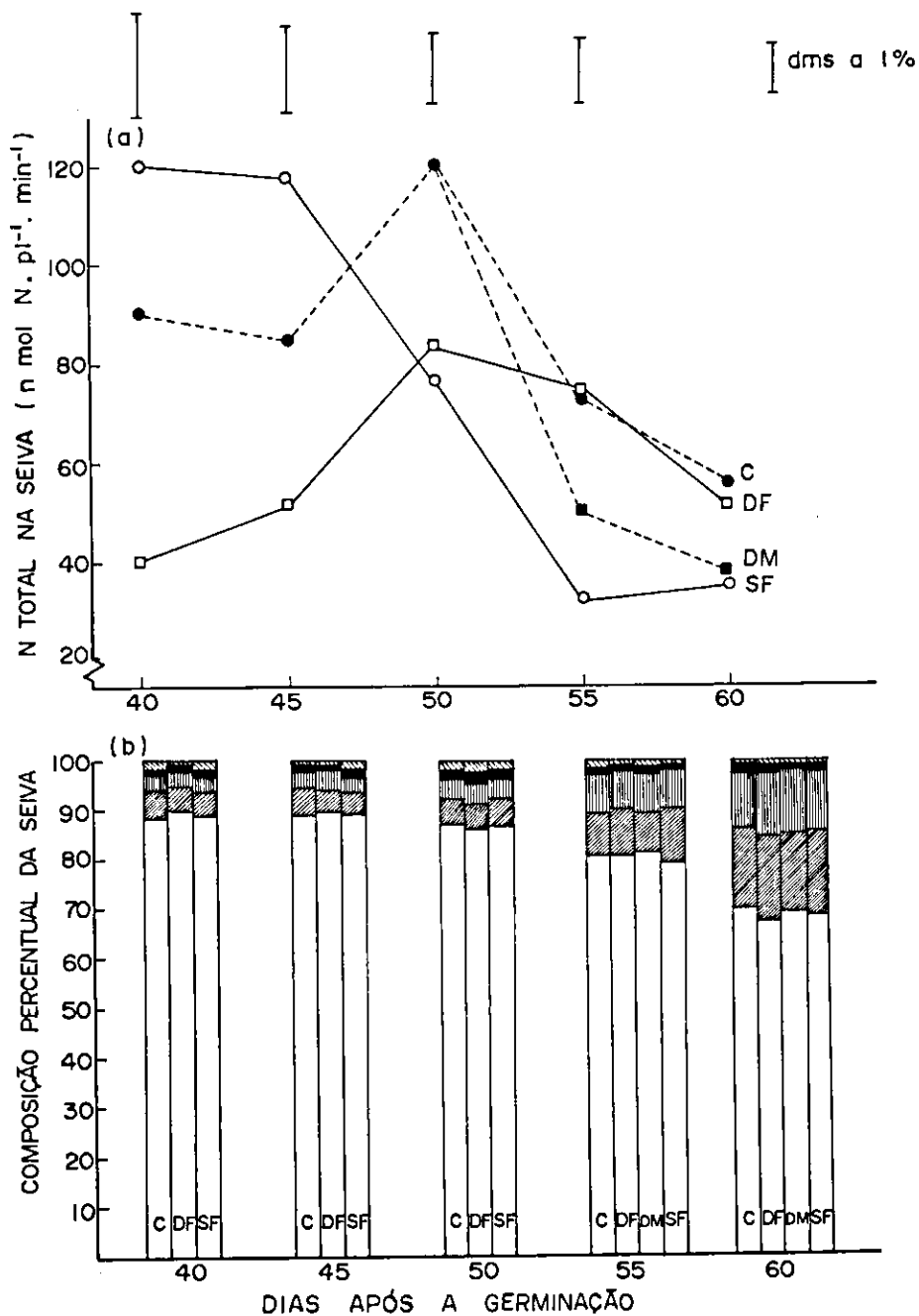


FIG. 6. (a) Transporte de N total e (b) composição da seiva do xilema em feijão. Os tratamentos são representados por: C - controle; DF - retirada de 50% das folhas no florescimento; DM - retirada de 50% das folhas no período médio de enchimento dos grãos; SF - sem flores; □ N ureídico; ■ N amina; ▨ amida; ▩ N amônia; ▪ outros. Médias de quatro repetições.

A análise estatística da variação na composição da seiva do xilema, durante o ciclo das plantas, mostrou que, a partir dos 55 DAG, houve queda na percentagem de N-ureído, que ocorreu concomitantemente com o declínio na atividade da ni-

trogenase.

Em relação ao segundo experimento, pode-se ver, na Fig. 7, os dados relativos à atividade da nitrogenase e à liberação de H_2 nas plantas do tratamento controle e nas plantas aneladas.

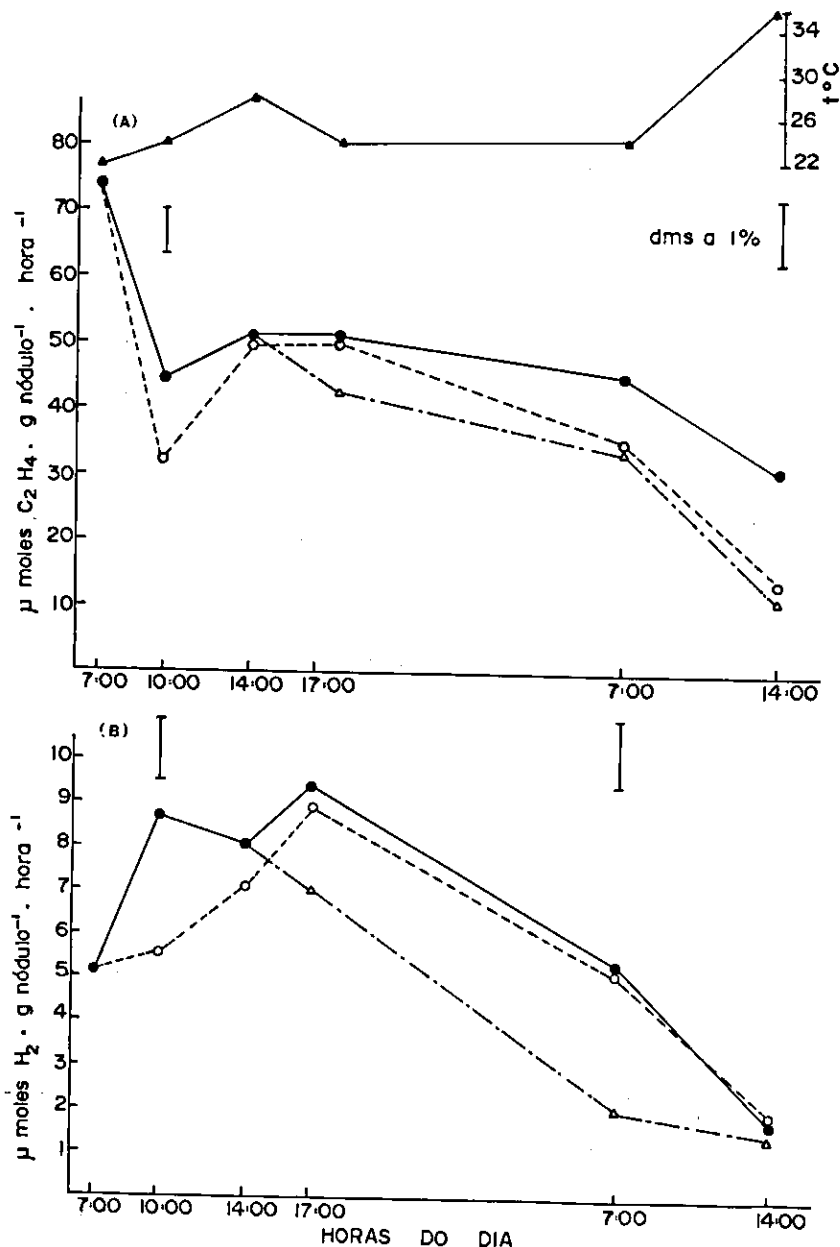


FIG. 7. Efeito do anelamento na (a) redução do acetileno e (b) liberação de H_2 em feijão. Os tratamentos são representados por: ● controle; ○ anelamento realizado às 7h e Δ anelamento realizado às 10h. Médias de quatro repetições.

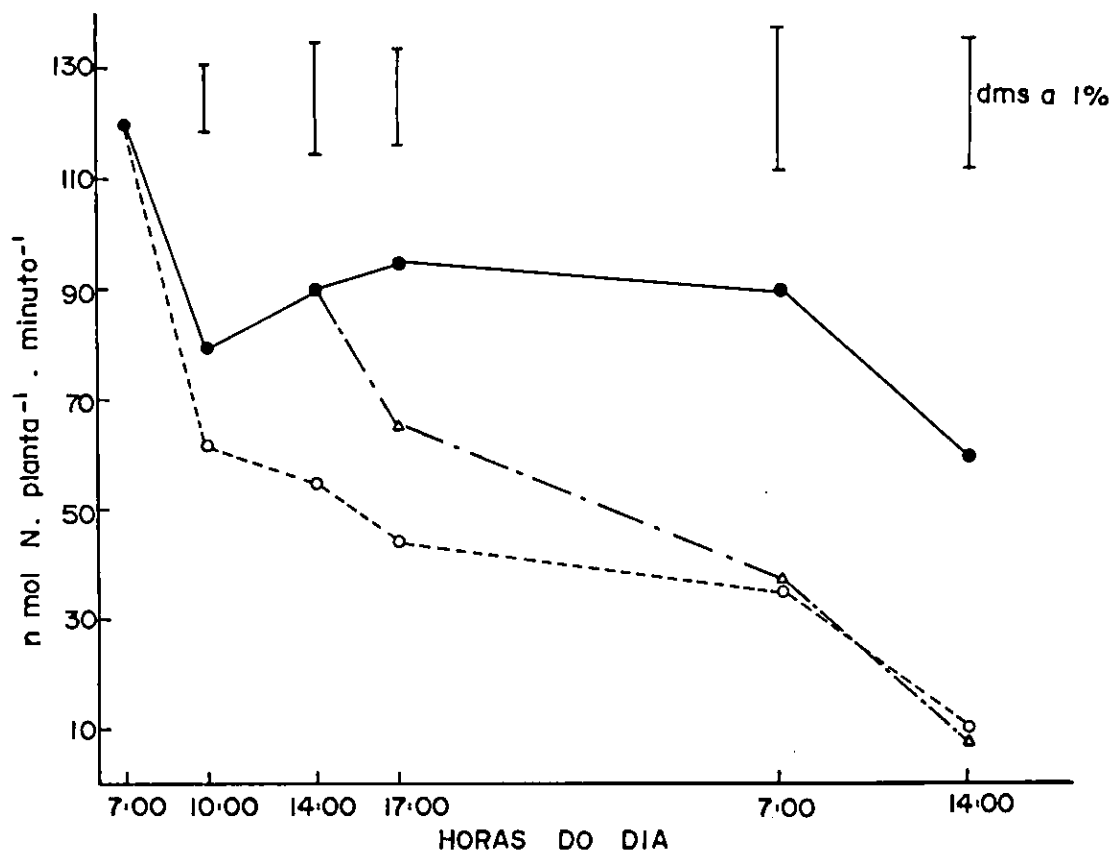


FIG. 8. Efeito do anelamento no transporte de nitrogênio na seiva do xilema em feijão. Os tratamentos são representados por: ● controle; ○ anelamento realizado às 7h e △ anelamento realizado às 10h. Médias de quatro repetições.

Quando o anelamento foi realizado às 7 h, verificou-se que, após um período de três horas, houve queda de 26% na redução do acetileno e de 37% na liberação de H_2 .

Embora tenha havido redução na atividade da nitrogenase, ela não foi tão acentuada como a observada por Lawn & Brun (1974) em soja na qual, após duas horas, a redução do acetileno apresentou decréscimo superior a 50%.

Após essa queda inicial na atividade da nitrogenase, porém, não se verificaram diferenças entre as plantas controle e as plantas aneladas até às 7 h do dia seguinte, quando iniciou um novo fotoperíodo.

Quando o anelamento foi realizado às 14 h, a queda na atividade da nitrogenase foi menor; so-

mente às 14 h do outro dia, é que se verificou uma queda média de 50% na atividade de nitrogenase nas plantas aneladas, em qualquer um dos dois tempos. A menor atividade da nitrogenase nas plantas controle, no segundo dia do experimento, pode ser explicada pelas temperaturas mais elevadas desse dia, como pode ser visto na Fig. 7, pois, segundo Graham (1979), acima de $30^\circ C$ há queda na atividade da nitrogenase em feijão.

Os fotossintatos precisam ser fornecidos continuamente para os nódulos e Wong & Evans (1971) constataram que o principal polímero de carbono acumulado pelos bacteróides de leguminosas, Poli- β -hidroxibutirato, não é capaz de manter níveis elevados da atividade da nitrogenase, quando o suprimento de açúcares para as raízes é interrompido.

Existem diferenças entre as espécies na percentagem de substâncias de reserva, mas, mesmo quando elas representam 50% do peso dos nódulos, como ocorre em ervilha, quando a planta é submetida a condições de estresse, a atividade da nitrogenase só continua em níveis normais por um ou dois dias (Wong & Evans 1971).

Desse modo, embora Lawrie & Wheeler (1973) tenham sugerido que a atividade da nitrogenase é sustentada principalmente por um fluxo rápido de fotossintatos, os dados encontrados neste experimento levam à suposição de que no sistema radicular de feijão deve haver uma quantidade considerável de reserva de carbono, uma vez que a atividade da nitrogenase foi mantida no mesmo nível das plantas controle durante 24 horas.

Não houve diferença entre os tratamentos na eficiência relativa dos elétrons destinados à nitrogenase. Os valores estiveram entre 0,80 e 0,94 nas diversas coletas.

Os dados relativos ao transporte de nitrogênio total na seiva do xilema podem ser vistos na Fig. 8. Pode-se observar que, embora a atividade da nitrogenase nas plantas aneladas tenha sido semelhante à das plantas do tratamento controle durante várias horas, logo na primeira coleta houve queda no transporte de nitrogênio, independente da hora em que o anelamento foi realizado. Desse modo, o declínio na redução do acetileno devido ao anelamento pode ter resultado da falta de substratos oxidáveis para a produção de elétrons e ATP e também de esqueletos de carbono para o transporte da amônia produzida, cujo acúmulo nos nódulos inibiu a atividade da nitrogenase.

CONCLUSÕES

1. A retirada das flores provocou acréscimo no N total das folhas e caules. Houve, inicialmente, incremento na atividade da nitrogenase, na eficiência relativa dos elétrons destinados à nitrogenase (ER) e na taxa de translocação de N na seiva, mas, logo após dez dias, ocorreu uma queda drástica nesses parâmetros, bem como uma aceleração no processo de senescência dos nódulos. Não houve alteração nas proporções dos compostos nitrogenados da seiva do xilema. A presença das vagens estimulou o processo de fixação de N_2 em feijão; no final

do ciclo, N total da parte aérea (folha + caule + vagem) dessas plantas superou em 125% o N total acumulado pelas plantas sem flores.

2. A retirada de 50% das folhas no florescimento provocou declínio na atividade da nitrogenase, ER e N translocado na seiva do xilema, mas logo iniciou-se uma recuperação, atribuída à produção de folhas novas, que chegou a se equiparar, na época de enchimento dos grãos, à das plantas do tratamento controle. Houve decréscimo de 12% na produtividade das sementes.

3. Quando a retirada de 50% das folhas foi feita no período médio de enchimento dos grãos, houve um declínio, sem recuperação, na atividade da nitrogenase, ER e N total transportado na seiva do xilema, talvez porque não ocorreu a produção de folhas novas. Houve decréscimo de 22% na produção de sementes. O desfolhamento em qualquer uma das duas épocas estudadas não alterou a composição da seiva do xilema.

4. O anelamento do caule do feijão provocou queda na atividade da nitrogenase, na ER e no transporte de N total na seiva. O decréscimo na atividade da nitrogenase, porém, só ocorreu 24 horas após o anelamento, indicando haver uma quantidade considerável de substratos de carbono nos nódulos de feijão.

5. Os resultados encontrados nesses experimentos levam à indicação de que existem outros fatores, além do suprimento de fotossintatos para os nódulos, que influenciam a queda na fixação de N_2 em feijão, logo após o florescimento.

REFERÊNCIAS

- ANTONIOW, L.D. & SPRENT, J.I. Growth and nitrogen fixation of *Phaseolus vulgaris* L. at two irradiances. *Ann. Bot.*, 43:399-410, 1978.
- BETHLENFALVAY, G.J.; ABUGHAKRA, S.S.; FISHBECK, K. & PHILLIPS, D.A. The effect of source-sink manipulation on nitrogen fixation in peas. *Plant Physiol.*, 43:31-4, 1978.
- BETHLENFALVAY, G.J. & PHILLIPS, D.A. Effect of light intensity on the efficiency of carbon dioxide and nitrogen reduction in *Pisum sativum* L. *Plant Physiol.*, 60:871-8, 1977.
- BOHLEY, P. von. Reihenbestimmungen von Stickstoff in Ultramikromassstab; Kjeldahlverraschung und Phenol-Hypochlorite Reaktion. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 348:100-10, 1967.

- BREMNER, J.M. & EDWARDS, A.P. Determination and isotope ratio analysis of different forms of nitrogen in soils. I. Apparatus and procedures for distillation and determination for ammonium. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 29:504-7, 1965.
- BRUN, W.A. The relation of N₂ fixation to photosynthesis. In: HILL, L.D., ed. *World soybean research*. s.l., Interstate, 1976. p. 135-43.
- CHEN, C.L. & SUNG, F.J.M. Effect of source-sink manipulation on nitrogen fixation in mung beans. *Field Crops Res.*, 5:225-31, 1982.
- CHING, T.M.; HEDTKEI, S.; RUSSELL, S.A. & EVANS, H.J. Energy state and dinitrogen fixation in soybean nodules of dark-grown plants. *Plant Physiol.*, 55:796-8, 1975.
- CHU, A.C.P. & ROBERTSON, A.G. The effects of shading and defoliation on nodulation and nitrogen fixation by white clover. *Plant Soil*, 41:509-19, 1974.
- CLOUGH, J.M.; PEET, M.M. & KRAMER, P.J. Effects of high atmospheric CO₂ and sink size in rates of photosynthesis of a soybean cultivar. *Plant Physiol.*, 67:1007-10, 1981.
- CONNEL, G.E.; DIXON, G.H. & HANES, C.S. Quantitative chromatographic methods for the study of enzymic transpeptidation reactions. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 33:416-27, 1955.
- COOKSON, C.; HUGHES, H. & COOMBS, J. Effects of combined nitrogen on anapleurotic carbon assimilation and bleeding sap composition in *Phaseolus vulgaris* L. *Planta*, 148:338-45, 1980.
- FELKER, P. Microdetermination of nitrogen in seed protein extracts with the salicylate-dichlorocyanurate color reaction. *Anal. Chem.*, 49:1080, 1977.
- GRAHAM, P.H. Influence of temperature on growth and nitrogen fixation in cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. inoculated with *Rhizobium*. *J. Agric. Sci.*, 93:365-70, 1979.
- HAM, G.E.; LAWN, R.J. & BRUN, W.A. Influence of inoculation, nitrogen fertilizers and photosynthetic source-sink manipulations on field-grown soybeans. In: NUTMAN, P.S., ed. *Symbiotic nitrogen in plants*. Cambridge, Cambridge Univ. Press, 1976. p.239-54.
- HARDY, R.W.F. & HAVELKA, U.D. Symbiotic N₂ fixation; multifold enhancement by CO₂ enrichment of field-grown soybeans. *Plant Physiol.*, 48:35-8, 1973. Suplemento.
- HUNGRIA, M. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em *Phaseolus vulgaris* L. Itaguaí, UFRRJ, 1985. Tese Doutorado - Ciência Solo.
- HUNGRIA, M. & NEVES, M.C.P. Seasonal variations on nodule metabolism of *Phaseolus vulgaris* L. In: VEEGER, C. & NEWTON, W.E., ed. *Advances in nitrogen fixation research*. The Hague, M. Nijhoff, 1984. p.505.
- HUNGRIA, M. & RUSCHEL, A.P. Eficiência da fixação biológica do nitrogênio em *Phaseolus vulgaris* L.I. Efeito da cultivar de feijão e da estirpe de bactéria. In: REUNIÃO LATINOAMERICANA DE RHIZOBIUM, 11., Lima, Peru, 1982. Memórias . . . Lima, ALAR, 1982. p.60.
- LAWN, R.J. & BRUN, W.A. Symbiotic nitrogen fixation in soybeans. I. Effect of photosynthetic source-sink manipulations. *Crop Sci.*, 14:11-6, 1974.
- LAWRIE, A.C. & WHEELER, C.T. The effects of flowering and fruit formation on the supply of photosynthetic assimilates to the nodules of *Pisum sativum* L. in relation to fixation of nitrogen. *New Phytol.*, 73:1119-27, 1974.
- LAWRIE, A.C. & WHEELER, C.T. The supply of photosynthetic assimilates to nodules of *Pisum sativum* L. in relation to the fixation of nitrogen. *New Phytol.*, 72:1341-8, 1973.
- LAYZELL, D.B.; RAINBIRD, R.M.; ATKINS, C.A. & PATE, J.S. Economy of photosynthate use in nitrogen-fixing legume nodules; observations on two contrasting symbioses. *Plant Physiol.*, 64:888-91, 1979.
- LIAO, C.F.H. Devarda's alloy method for total nitrogen determination. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 45:852-5, 1981.
- MCCRAE, R.E.; HANUS, F.J. & EVANS, H.J. Properties of hydrogenase system in *Rhizobium japonicum* bacteroids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 80:384-94, 1978.
- MAGUE, T.H. & BURRIS, R.H. Reduction of acetylene and nitrogen by field grown soybeans. *New Phytol.*, 71:275-86, 1972.
- MALIK, N.S.A. Grafting experiments on the nature of the decline in N₂ fixation during fruit development in soybeans. *Physiol. Plant.*, 57:561-4, 1983.
- MATHESON, A.T.; TIGANE, E. & HANES, C.S. Quantitative chromatographic methods; an improved ninhydrin-hydrindantin reagent. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 39:417-25, 1961.
- MINCHIN, F.R.; WITTY, J.F.; SHEEHY, J.E. & MULLER, M. A major error in the acetylene reduction assay; decreases in nodular nitrogenase activity under assay conditions. *J. Exp. Bot.*, 34(142):641-9, 1983.
- MITCHELL, H.L. Microdetermination of nitrogen in plant tissues. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, 55:1-2, 1972.
- MOTHES, K. The metabolism of urea and ureides. *Can. J. Bot.*, 39:1785-807, 1961.
- MOUSTAFFA, E.; BALL, R. & FIELD, T.R.O. The use of acetylene reduction to study the effect of nitrogen fertilizer and defoliation on nitrogen fixation by field-grown white clover. *J. Agric. Res.*, 12:691-6, 1969.
- NDUNGURU, B.J.; SUMMERFIELD, R.J. & STEWART, K.A. Effects of source-sink manipulation on seed yield of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). I. Depodding. *Trop. Agric.*, 55(4):297-305, 1976.
- PANDEY, R.K. Influence of defoliation on seed yield in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) in a subtropical environment. *Field Crops Res.*, 7:249-56, 1983.

- PATE, J.S. Uptake, assimilation and transport of nitrogen compounds by plants. *Soil Biol. Biochem.*, 5:109-19, 1973.
- PATTERSON, T.G. & LA RUE, T.A. Nitrogen fixation (C_2H_2) and ureide content of soybeans; environmental effects and source-sink manipulations. *Crop Sci.*, 23:819-24, 1983.
- PEAT, J.R.; MINCHIN, F.R.; JEFFCOAT, B. & SUMMERFIELD, R.J. Young reproductive structures promote nitrogen fixation in soya bean. *Ann. Bot.*, 48:177-82, 1981.
- QUEBEDEAUX, B. & HARDY, R.W.F. Reproductive growth and dry matter production of *Glycine max* (L.) Merr. in response to oxygen concentration. *Plant Physiol.*, 55:102-7, 1975.
- RAWSTHORNE, S.; MINCHIN, F.R.; SUMMERFIELD, R.J.; COOKSON, C. & COOMBS, J. Carbon and nitrogen metabolism in legume root nodules. *Phytochemistry*, 19:341-55, 1980.
- RIGGLE, B.D.; WIEBOLD, W.J. & KENWORTHY, W.J. Effect of photosynthate source-sink manipulation on dinitrogen fixation of male-fertile and male-sterile soybean isolines. *Crop Sci.*, 24:5-8, 1984.
- ROCHA, H.M.; ALVIM, P.T. & DÖBEREINER, J. Influência da intensidade da radiação solar sobre o crescimento e a fixação simbiótica do nitrogênio pela soja. *Turrialba*, 20(3):293-8, 1970.
- ROPONEN, I.E. & VIRTANEN, A.E. The effect of the prevention of flowering on the vegetative growth of inoculated pea plants. *Physiol. Plant.*, 21:655-67, 1968.
- SCHREVEN, D.A. van. Effects of added sugars and nitrogen on nodulation of legumes. *Plant Soil*, 11: 93-112, 1959.
- SCHUBERT, K.R. & EVANS, H.J. Hydrogen evolution; a major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 73(4):1207-11, 1976.
- SCHUBERT, K.R. & RYLE, G.J.A. The energy requirements for nitrogen fixation in nodulated leguminous. In: SUMMERFIELD, R.J. & BUNTING, A.H., ed. *Advances in legume science*. London, H.M.S.O., 1980. p.85-96.
- SCHWEITZER, L.E. & HARPER, J.E. Effect of light dark and temperature on root nodule activity (acetylene reduction) of soybeans. *Plant Physiol.*, 65: 51-6, 1980.
- SHELDRAKE, A.R. & NARAYANAN, A. Report; pulse physiology. s.l., ICRISAT, 1976. pt. 1, p.43-56.5.
- SPRENT, J.I. The effects of water stress on nitrogen fixing roots nodules; effect on whole plants of *Vicia faba* and *Glycine max*. *New Phytol.*, 71:603-11, 1972.
- SPRENT, J.I. & BRADFORD, A.M. Nitrogen fixation in field beans (*Vicia faba*) as affected by population density, shading and its relationship with soil moisture. *J. Agric. Sci.*, 88:303-13, 1976.
- STREETER, J.G. Growth of two soybean shoots on a single root. *J. Exp. Bot.*, 25:189-98, 1974.
- TEIGEN, J.B. & VORST, J.J. Soybean response to stand reduction and defoliation. *Agron. J.*, 67:813-6, 1975.
- THOMAS, R.J.; FELLER, U. & ERISMANN, K.H. The effects of different inorganic nitrogen sources and plant age on the composition of bleeding sap of *Phaseolus vulgaris*. *New Phytol.*, 82:657-69, 1979.
- THOMAS, R.J. & SCHRADER, L.E. Review; ureide metabolism in higher plants. *Phytochemistry*, 20:361-71, 1981.
- THOMAS, R.J. & SPRENT, J.I. The effects of temperature on vegetative and early reproductive growth of a cold-tolerant and a cold line of *Phaseolus vulgaris* L. 2. Nodular uricase, allantoinase, xylem transport of N and assimilation in shoot tissues. *Ann. Bot.*, 55:589-98, 1984.
- VINCENT, J.M. *Manual for the practical study of root nodule bacteria*. Oxford, Blackwell, 1970. 164p. (Int. Biol. Programme Handb., 15).
- VOGELS, G.D. & DRIFT, C. van der. Differential analysis of glyoxylate derivatives. *Anal. Biochem.*, 33: 143-57, 1970.
- WAHUA, T.A.T. & MILLER, D.A. Effects of shading on the N_2 -fixation, yield and plant composition of field grown soybeans. *Agron. J.*, 70:387-92, 1978.
- WILSON, R.F.; BURTON, J.W.; BUCK, J.A. & BRIM, C. A. Studies on genetic male-sterile soybeans. I. Distribution of plant carbohydrate and nitrogen development. *Plant Physiol.*, 61:838-84, 1978.
- WONG, P.P. & EVANS, H.J. Poly-B-hidroxybutyrate utilization by soybean nodules and assessment of its role in maintenance of nitrogenase activity. *Plant Physiol.*, 47:750-4, 1971.