

ONTOGENIA DA FIXAÇÃO BIOLÓGICA DO NITROGÊNIO EM *PHASEOLUS VULGARIS*¹

MARIANGELA HUNGRIA² e MARIA CRISTINA P. NEVES³

RESUMO - Em experimento conduzido sob condições de casa de vegetação, com duas cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. (Negro Argel e Venezuela-350) inoculadas com duas estirpes de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* (C05 e 127 K-17), verificou-se que o maior acúmulo de nitrogênio esteve relacionado com: taxas mais elevadas de atividade da nitrogenase entre o florescimento e o período médio de enchimento dos grãos; menor perda de ATP pela evolução do hidrogênio nos nódulos; maior taxa de transporte de nitrogênio total na seiva do xilema; maior percentagem do nitrogênio da seiva do xilema sob a forma de ureídeos; e maior remobilização do nitrogênio das folhas e caules para as sementes. Detectou-se efeito da cultivar de feijão, da estirpe de *Rhizobium* e da interação entre cultivares e estirpes em todos os parâmetros mencionados. A simbiose de Negro Argel com C05 superou a combinação simbiótica de Venezuela-350 com 127 K-17 em 88% quanto ao nitrogênio total das sementes, em 20% quanto ao índice de colheita para o nitrogênio (N semente/N planta) e perdeu menos nitrogênio nas folhas senescentes (N folhas senescente/N planta).

Termos para indexação: *Rhizobium*, atividade da nitrogenase, evolução do H₂, transporte de N na seiva do xilema, ureídeos, assimilação de N.

ONTOGENY OF BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION IN *PHASEOLUS VULGARIS*

ABSTRACT - An experiment was performed, under greenhouse conditions, with two cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. (Negro Argel and Venezuela-350) inoculated with either the strain C05 or 127 K-17 of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. Plants having the greatest nitrogen accumulation showed: the highest rates of nitrogenase activity between flowering and mid-pod filling stage; lower loss of ATP via the evolution of hydrogen in the nodules; higher rates of nitrogen transport in the xylem sap; higher percentage of nitrogen as ureides in the xylem sap; and higher nitrogen remobilization from the leaves and stems to the seeds. There was an effect of the bean cultivar, of the *Rhizobium* strain and of the interaction between cultivars and strains in all the parameters mentioned. The symbiosis of Negro Argel with C05 accumulated 88% more nitrogen in seeds, lost less nitrogen in senescent leaves (N in senescent leaves/N in plants) and had a nitrogen harvest index (N in seeds/N in plants) 20% greater than the cultivar Venezuela-350 inoculated with strain 127 K-17.

Index terms: *Rhizobium*, nitrogenase activity, hydrogen evolution, transport of N in the xylem sap, ureides, nitrogen assimilation.

INTRODUÇÃO

No processo de fixação biológica do nitrogênio há um considerável gasto de energia e poder redutor que são fornecidos pelo catabolismo respiratório dos fotossintatos da planta hospedeira (Schubert & Ryle 1980). Como as leguminosas são plantas do ciclo C₃ e se caracterizam por apresentarem baixa taxa de fotossíntese líquida, há

evidências de que o suprimento de fotossintatos freqüentemente limita o processo de fixação do nitrogênio (Hardy & Havelka 1976).

Desse modo, o fato de que há uma queda na atividade da nitrogenase no período de estabelecimento das vagens, ou seja, justamente na época de maior necessidade de nitrogênio para os grãos, tem sido atribuído à competição pelos fotossintatos disponíveis entre os tecidos reprodutivos e os nódulos (Lawn & Brun 1974, Bethlenfalvay & Phillips 1977, Herridge & Pate 1977), limitando a produtividade potencial das leguminosas noduladas.

Outros experimentos, porém, têm indicado que não ocorre, necessariamente, um declínio na atividade da nitrogenase logo após o florescimento (Hardy et al. 1968, Mague & Burris 1972, Brun

¹ Aceito para publicação em 21 de março de 1986. Parte da tese de doutorado da primeira autora.

² Eng.^a - Agr.^a, 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.

1976), e que o processo de fixação do nitrogênio pode ser suficiente para atender à demanda de nitrogênio no período reprodutivo (Nelson & Weaver 1980, Israel 1981). Adicionando-se a isso as observações de que a retirada das flores e frutos pode provocar uma queda na atividade da nitrogenase (Peat et al. 1981, Riggie et al. 1984, Hungria s.d.), conclui-se que a fixação do nitrogênio pode estar sendo controlada por fatores hormonais ou fisiológicos relacionados com os frutos ou, então, simplesmente pelo aumento na demanda de nitrogênio durante o enchimento dos grãos.

Na simbiose *Phaseolus vulgaris* L. - *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*, tanto a cultivar de feijão quanto a estirpe de *Rhizobium* podem afetar a nodulação, a atividade da nitrogenase e o acúmulo de nitrogênio nas partes vegetativas e reprodutivas (Franco & Dobereiner 1967, Ruschel & Saito 1977, Ruschel et al. 1979), a taxa de translocação de nitrogênio na seiva (Hungria s.d., Thomas et al. 1984) e a assimilação do nitrogênio fixado (Ruschel & Saito 1977, Ruschel et al. 1979).

Desse modo, na seleção genética visando o incremento na produtividade através da maximização da fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro, é necessário estudar os fatores ligados à planta ou a estirpe de *Rhizobium* que controlam a expressão estacional da fixação do nitrogênio. Com esse objetivo, procurou-se estudar a ontogenia da fixação do nitrogênio em duas cultivares de feijão inoculadas com duas estirpes de *Rhizobium*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado em casa de vegetação na EMBRAPA-UAPNPBS, km 47, Rio de Janeiro, em maio de 1982.

Utilizaram-se vasos de metal com capacidade de seis litros contendo uma mistura de areia e vermiculita (1/2, v/v) previamente lavadas por sete dias: os vasos foram esterilizados a seco, a 120°C, por 36 horas. As estirpes de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* CO5 (CENA, Piracicaba, SP) e 127 K-17 (Nitragin Co., EUA) cresceram em meio definido de Vincent (1970), por quatro dias, a 28°C, com agitação. As sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) das cultivares Negro Argel e Venezuela-350 foram esterilizadas com HgCl₂ 0,2% (Vincent 1970) colocando-se, então, 1 ml de inoculante (com cerca de 10⁸ células/ml) para cada 15 sementes. Após a incubação por uma hora, procedeu-se à semeadura, colocando-se

cinco sementes por vaso e cobrindo-se, em seguida, 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 dez dias forneceram-se a cada vaso 250 ml de solução nutritiva modificada de McKnight (1949), isenta de nitrogênio e contendo: CaSO₄ . 2H₂O (58,08 mM); MgSO₄ . 7H₂O (8,11 mM); KH₂PO₄ (14,70 mM); KCl (40,24 mM); H₃BO₃ (462 μM); MnSO₄ . 4H₂O (9,10 μM); ZnSO₄ . 7H₂O (7,65 μM); CuSO₄ . 5H₂O (3,20 μM); H₂MoO₄ . 4H₂O (5,0 μM) e Fe Cl₃ (82,86 μM); pH 6,0 a 6,2.

As adições de água foram feitas diariamente baseando-se no peso de cinco vasos sorteados de cada tratamento.

O delineamento experimental usado foi em blocos ao acaso com oito repetições, quatro tratamentos e onze coletas, totalizando 352 vasos, e foram realizadas coletas semanais a partir dos sete DAG.

Em cada coleta, quatro vasos (cada um com duas plantas) foram usados para a determinação da atividade da nitrogenase e quatro vasos foram usados para a determinação da evolução do H₂. 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 60-70°C até atingirem peso constante.

Para a determinação da atividade da nitrogenase utilizou-se o método de redução do C₂H₂ em raízes destacadas (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 rolhas do tipo "Suba Seal", injetando-se, então, acetileno equivalente a uma concentração de 12%. Para verificar se a atividade da nitrogenase era afetada pelo acetileno (Minchin et al. 1983), realizou-se um experimento adicional com as mesmas cultivares e estirpes. Utilizando-se um sistema de fluxo contínuo em tubos de vidro, manteve-se uma taxa de fluxo de ar (contendo 12% de acetileno) de 100 ml . tubo⁻¹ . minuto⁻¹. As amostragens foram realizadas aos 1, 3, 4, 5, 7, 10, 15 e 30 minutos após o início da incubação. Verificou-se que o declínio na atividade da nitrogenase para os sistemas simbióticos Negro Argel/CO5, Negro Argel/127 K-17, Venezuela-350/CO5 e Venezuela-350/127 K-17 foi, respectivamente, de 4,2%, 4,7%, 4,3% e 0%, mostrando que estas associações simbióticas parecem não ter as restrições sugeridas por Minchin et al. (1983).

O etileno foi determinado em um cromatógrafo Perkin Elmer F 11 com detector de 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, com N₂ como gás carregador, a um fluxo de 40 ml . minuto⁻¹.

A evolução do H₂ foi determinada em nódulos destacados com pequenos segmentos radiculares, ± 0,5 cm, para impedir danos mecânicos 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 umedecido, para evitar o dessecamento. Os frascos foram fechados hermeticamente com rolhas do tipo "Suba Seal" e incubados por 30 minutos na temperatura ambiente, retirando-se, então, 0,5 ml de amostra para leitura no cromatógrafo. Minchin et al. (1983) observaram que não há declínio na evolução do H₂ quando a incubação é feita sob ar.

As leituras foram realizadas em cromatógrafo Varian modelo 1420 usando-se 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 5 Å (80 a 100 mesh) e operada a 40°C, usando-se argônio como gás de arraste a um fluxo de 25 ml . minuto⁻¹.

A eficiência relativa (ER) dos elétrons destinados à nitrogenase foi calculada pela equação:

$$ER = 1 - \frac{H_2 \text{ (ar)}}{C_2H_2 \text{ reduzido}}, \text{ segundo Schubert \& Evans (1976).}$$

Para a coleta da seiva do xilema, as plantas foram cortadas com gilete na altura do nó cotiledonar, procedendo-se à lavagem e secagem do corte com papel absorvente. A seiva exsudada foi então coletada em pipetas microcapilares calibradas (20 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, e os compostos nitrogenados foram determinados em alíquotas de 5 µl.

O N-uréido foi analisado pelo método colorimétrico de Vogels & Drift (1970), baseado na hidrólise da alantoina e ácido alantóico a glioxalato.

O N-α-amino foi determinado pelo método de Matheson et al. (1961). O reagente ninidrina-hidridantina foi preparado segundo Connel et al. (1955).

O N-amônia foi determinado pelo método de Mitchel (1972), substituindo-se a solução de hipoclorito de sódio por dicloroisocianurato de sódio (Felker 1977).

Para determinar o N-amida, realizou-se a hidrólise ácida do N-amida para N-amônia segundo Thomas et al. (1979) e a amônia foi determinada tal como descrito acima.

Para a determinação do N total, utilizou-se o método microkjeldahl segundo Bohley (1967), e a amônia foi determinada segundo descrição acima.

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

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Fig. 1, podem ser vistos os dados referentes ao peso seco da parte vegetativa, da parte reprodutiva e da planta inteira. Houve efeito da interação entre cultivares e estirpes nos parâmetros acima citados, confirmando resultados encontrados ante-

riormente em feijão (Hungria & Ruschel 1982), caupi (Minchin et al. 1978) e amendoim (Elkan et al. 1981) e salientando a importância de se considerar tanto as cultivares hospedeiras quanto as estirpes de *Rhizobium* nos programas de seleção.

A simbiose da cultivar Negro Argel com a estirpe CO5 se destacou das demais desde os 28 dias após a germinação (DAG) (Fig. 1), com maior peso seco das partes vegetativas e reprodutivas. Embora o menor peso seco da parte vegetativa tenha sido observado na simbiose de Negro Argel com 127 K-17, o menor peso de vagens, entretanto, ocorreu na cultivar Venezuela-350 em associação com essa mesma estirpe. De um modo geral, não se constatou o efeito da interação entre cultivares e estirpes no peso seco de raízes.

O pico de produção de massa nodular foi atingido aos 42 DAG (Fig. 1), logo após o florescimento, com uma pequena produção secundária de nódulos no período de enchimento dos grãos (63 DAG). Os nódulos da população secundária foram menores e localizados nas extremidades das raízes laterais.

As análises da coleta final (77 DAG) mostraram que houve efeito da interação entre cultivares e estirpes no peso seco das sementes e no índice de colheita (peso semente/peso total da planta) (Tabela 1). Verificou-se que a combinação simbiótica da cultivar Negro Argel com a estirpe CO5 apresentou não só a maior produtividade de sementes mas também um índice de colheita mais elevado, o que indica um efeito favorável da simbiose na partição de fotossintatos destinados à produção de grãos.

Quanto ao efeito da estirpe de *Rhizobium*, verificou-se que as plantas inoculadas com a estirpe CO5 apresentaram, no período compreendido entre 21 e 63 DAG, maior peso seco de folhas e caule, sem, contudo, alterar o peso das raízes. A produção final de sementes das plantas que receberam inoculação com a estirpe CO5 foi de 8,41 g . planta⁻¹, contra 6,56 g . planta⁻¹ nos feijões submetidos a inoculação com a estirpe 127 K-17 (Fig. 1). A maior produtividade alcançada nas plantas inoculadas com a estirpe CO5, entretanto, não foi relacionada com uma maior produção de nódulos, o que concorda com resul-

tados obtidos por Rennie & Kemp (1981) e Hungria & Ruschel (1982). Como pode ocorrer um desvio, para os nódulos, de 10% a 30% dos fotossintatos da planta hospedeira (Schubert & Ryle 1980), os sistemas simbióticos que apresentam menor gasto de carbono e energia com a formação, crescimento e manutenção dos nódulos, podem favorecer diretamente o crescimento das plantas.

Na maioria das coletas não se verificaram diferenças significativas entre as cultivares no peso seco da parte vegetativa, mas a Venezuela-350 apresentou maior peso de raízes e de nódulos. A produção final de sementes, porém, foi de 8,34 g . planta⁻¹ na Negro Argel contra 6,68 g . planta⁻¹ na Venezuela-350. Houve, portanto, um efeito da cultivar no índice de colheita, o que já havia sido observado em feijão (Hungria & Ruschel 1982) e soja (Israel 1981).

De modo geral, o acúmulo de nitrogênio nas diversas partes da planta (Fig. 2) seguiu as mesmas tendências do acúmulo de matéria seca, com exceção da simbiose de Negro Argel com a estirpe 127 K-17, que, embora apresentasse menor peso da parte vegetativa do que a Venezuela-350 com essa mesma estirpe, apresentou maior percentagem de nitrogênio nos tecidos, acumulando, portanto, mais nitrogênio. Não houve correlação entre o peso de nódulos e o nitrogênio acumulado nas plantas.

O efeito da interação entre cultivares e estirpes foi observado não só no nitrogênio total da parte vegetativa e das sementes, mas também no índice de colheita para nitrogênio (N semente/N planta) (Tabela 1). O sistema simbiótico Negro Argel/CO5 superou o nitrogênio total das sementes de Venezuela-350/127 K-17 em 88%, e esse incremento esteve relacionado com uma superioridade de 60% no peso seco das sementes e de 17% na percentagem de nitrogênio das sementes. O índice de colheita para nitrogênio na simbiose Negro Argel/CO5 foi 16% superior ao da simbiose Venezuela-350/127 K-17. Desse modo, conforme foi também constatado em feijão por Ruschel & Saito (1977), Ruschel et al. (1979) e Hungria & Ruschel (1982), há diferenças entre os sistemas simbióticos não só na quantidade de nitrogênio fixado mas também na distribuição desse nitrogênio. Conse-

qüentemente, é importante que a seleção das melhores simbioses considere as diferenças no metabolismo assimilatório do nitrogênio, correlacionando-se o melhor desempenho com o nitrogênio total das sementes e não só com o nitrogênio total da planta.

Embora Negro Argel/CO5 e Negro Argel/127 K-17 tivessem acumulado mais nitrogênio total na casca da vagem (Tabela 1), a relação N semente/N semente + casca da vagem foi a mesma para todas as simbioses, não se observando, portanto, nenhum acúmulo preferencial do nitrogênio fixado na casca da vagem ou na semente, ao contrário do observado por Ruschel et al. (1982) em feijão.

Também se observou o efeito das cultivares e estirpes no nitrogênio total das partes vegetativas e reprodutivas, com as mesmas tendências do peso de matéria seca. Desde os 42 DAG já foi possível detectar diferenças no nitrogênio total das vagens (Fig. 3) e, aos 77 DAG, as plantas inoculadas com a estirpe CO5 superaram o nitrogênio total das plantas inoculadas com a estirpe 127 K-17 em 48%, enquanto a cultivar Negro Argel superou o nitrogênio das sementes da Venezuela-350 em 30%.

Após os 63 DAG, observou-se um efeito da cultivar, da estirpe e da interação entre cultivares e estirpes na percentagem de nitrogênio total das folhas senescentes. Desse modo, embora não houvesse diferença estatística no peso seco das folhas senescentes entre as cultivares aos 77 DAG, a percentagem de nitrogênio na Negro Argel foi de 0,91%, e na Venezuela-350, de 1,31%. Esse efeito também foi observado entre estirpes, com 0,88% de nitrogênio nas folhas senescentes das plantas inoculadas com CO5 contra 1,38% nas plantas inoculadas com 127 K-17. A remobilização de nitrogênio das folhas foi, portanto, afetada pelas cultivares e estirpes e o nitrogênio perdido nas folhas senescentes (N na folha senescente/N total da planta) na associação da cultivar Venezuela-350 com 127 K-17 superou em 193% o nitrogênio perdido pela simbiose de Negro Argel com CO5.

O maior índice de colheita para nitrogênio obtido pela estirpe CO5 pode ter sido relacionado não só com o efeito da estirpe na remobilização do nitrogênio mas também na partição direta de

nitrogênio para as sementes. Confirmam-se, desse modo, os relatos feitos anteriormente em soja por Neves et al. (1985) sobre o efeito da estirpe na

nutrição nitrogenada das sementes. Também se observou um efeito atribuído à cultivar no índice de colheita para o nitrogênio.

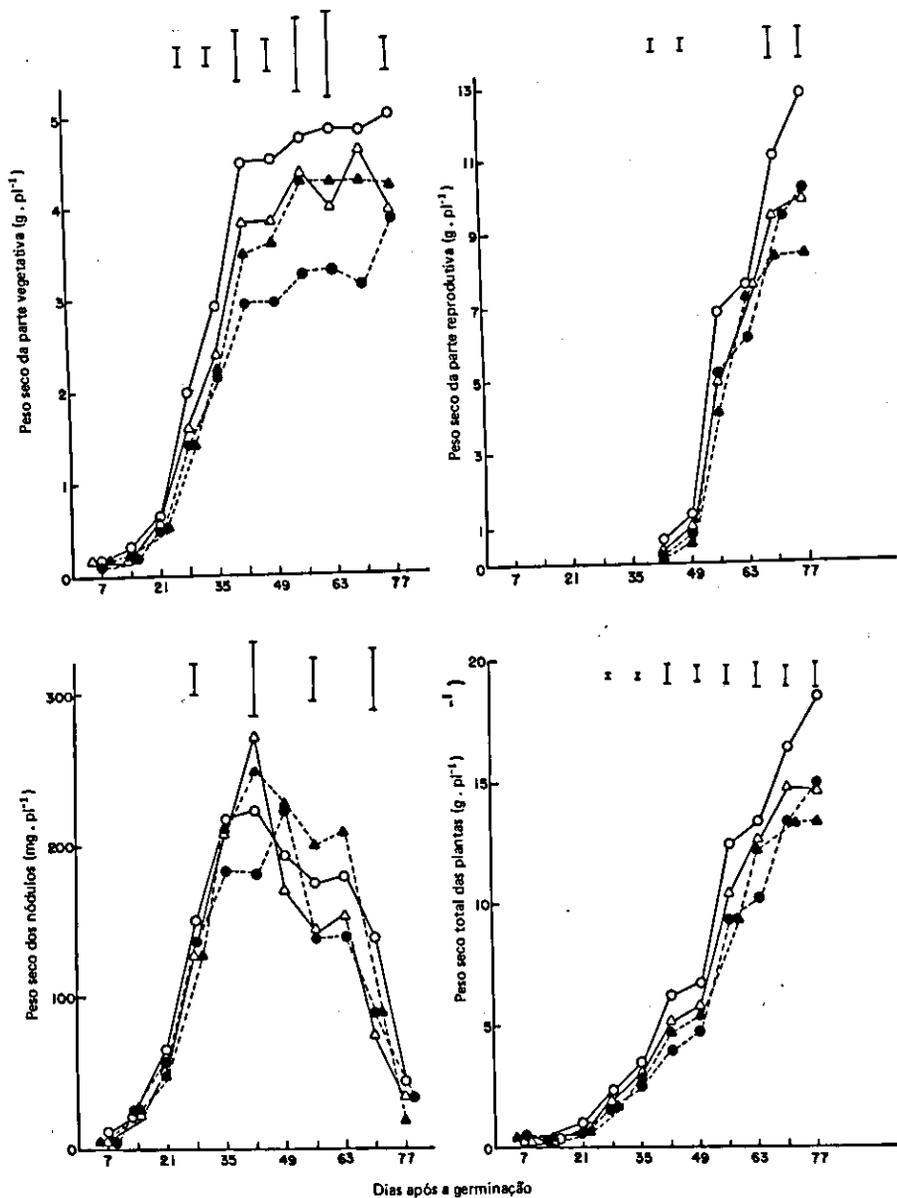


FIG. 1. Peso seco da parte vegetativa (folhas verdes+ caule+ folhas senescentes), da parte reprodutiva, dos nódulos e peso seco total (incluindo raízes) das cultivares Negro Argel (○) e Venezuela 350 (△) inoculadas com as estirpes CO5 (○△) e 127 K 17 (●▲) de *Rhizobium*. Médias de 8 repetições; as barras verticais representam o dms quando houver diferença estatística ao nível de 1%.

TABELA 1. Efeito da interação entre cultivares de feijão e estirpes de *Rhizobium* nos parâmetros relativos à produtividade das plantas, nitrogênio das sementes e nitrogênio perdido pelas folhas senescentes aos 77 dias após a germinação em feijão nodulado. Médias de 8 repetições.

Parâmetro	Negro Argel		Venezuela-350		C.V. (%)
	CO5	127 K-17	CO5	127 K-17	
Peso seco de sementes (g . pl ⁻¹)	9,47 ^a *	7,36 ^b	7,22 ^b	5,91 ^c	6,38
Peso seco total da planta (g . pl ⁻¹)	18,68 ^a	15,66 ^{a,b}	14,60 ^b	13,50 ^b	10,05
Peso semente: Peso total (índice de colheita)	0,51 ^a	0,47 ^b	0,49 ^b	0,44 ^c	3,08
N total da semente (mg N . pl ⁻¹)	310,59 ^a	225,72 ^b	197,00 ^b	165,45 ^c	14,12
% N na semente	3,28 ^a	3,07 ^{a,b}	2,73 ^c	2,80 ^{b,c}	5,02
N total da planta (mg N . pl ⁻¹)	375,15 ^a	307,85 ^b	262,04 ^{b,c}	238,95 ^c	19,57
N total semente/N total da planta (índice de colheita para N)	0,83 ^a	0,73 ^b	0,75 ^b	0,69 ^c	4,22
N total da casca da vagem (mg N . pl ⁻¹)	21,10 ^a	16,24 ^{a,b}	13,34 ^b	11,05 ^b	9,35
N semente/N (semente + casca da vagem)	0,94 ^a	0,94 ^a	0,93 ^a	0,94 ^a	3,78
% N perdido nas folhas senescentes (N folha senescente/N total da planta)	7,80 ^c	13,66 ^b	15,72 ^b	22,86 ^a	15,78

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

Na Fig. 4 estão representados os dados relativos à atividade da nitrogenase durante o ciclo das plantas. A cultivar Negro Argel e a estirpe CO5 apresentaram maior atividade da nitrogenase total ou específica (por grama de nódulo), particularmente no período entre 35 e 56 DAG).

A atividade total da nitrogenase aumentou consideravelmente logo após o florescimento (35 DAG), atingindo o pico no período médio de enchimento dos grãos (49 DAG). Desse modo, as maiores taxas de atividade da nitrogenase ocorreram num dos períodos de maior importância para a nutrição das plantas.

Muitos autores observaram um declínio na atividade da nitrogenase logo após o florescimento, o que foi atribuído à menor disponibilidade de carbono para os nódulos, em virtude da competição com as vagens (Lawn & Brun 1974, Bethlenfalvay & Phillips 1977, Herridge & Pate 1977). Entretanto, pode-se observar que, quatorze dias após o florescimento, as vagens representaram, em média, 21% do peso total das plantas e, portanto, não devem ter desempenhado um papel relevante na competição por carbono nesse período. Além disso, Peat et al. (1981) e Hungria (s.d.) observaram que as vagens podem estimular a fixação de nitro-

gênio, e Streeter (1981) constatou que o declínio na atividade da nitrogenase em soja ocorreu mesmo quando ainda podiam ser detectadas consideráveis quantidades de carbono nos nódulos.

Neste experimento, apesar do aumento na atividade da nitrogenase observado logo após o florescimento, houve uma queda acentuada após os 56 DAG. A explicação poderia, então, vir da sugestão de Peat et al. (1981), de que fatores associados com as estruturas reprodutivas, particularmente os botões florais, promoveriam a fixação do nitrogênio durante a primeira fase do período reprodutivo embora mais tarde, como o crescimento rápido das sementes, essas passem a competir com sucesso pelos fotossintatos, resultando em um declínio na fixação do nitrogênio.

Israel (1981) observou que o nitrogênio total das sementes de duas cultivares de soja foi obtido por duas estratégias: altas taxas de atividade da nitrogenase antes do período reprodutivo e taxas elevadas de remobilização ou, então, alta taxa de atividade da nitrogenase no período reprodutivo e baixa remobilização. Neste experimento, entretanto, observou-se que o maior acúmulo de nitrogênio nas sementes do feijão esteve associado a uma terceira estratégia: taxas elevadas de atividade

da nitrogenase no período de estabelecimento e início do enchimento das vagens e taxa elevada de remobilização.

A evolução do hidrogênio pelos nódulos (Fig. 5) durante o ciclo do feijão seguiu, em linhas gerais, a curva de atividade da nitrogenase, obtendo-se

uma alta correlação entre esses dois parâmetros, tanto nas avaliações por planta ($r = 0,810^{**}$), como nas avaliações por peso de nódulo ($r = 0,787^{**}$), contrariamente a Bethlenfalvay & Phillips (1977), que observaram que o pico da evolução do hidrogênio em ervilha precedeu o pico da atividade da nitrogenase.

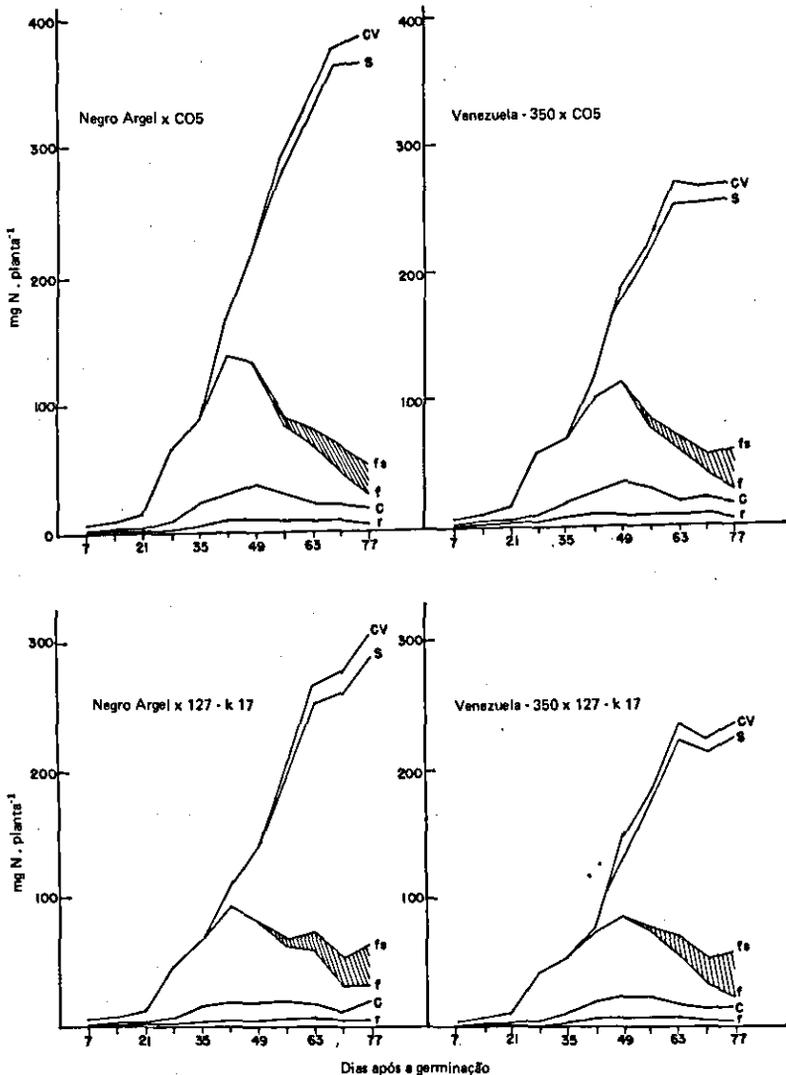


FIG. 2. Nitrogênio total acumulado nas raízes (r), caule (c), folhas (f), folhas senescentes (fs), sementes (s) e casca da vagem (cv) de duas cultivares de feijão inoculadas com as estirpes CO5 e 127 K-17 de *Rhizobium*. Médias de 8 repetições.

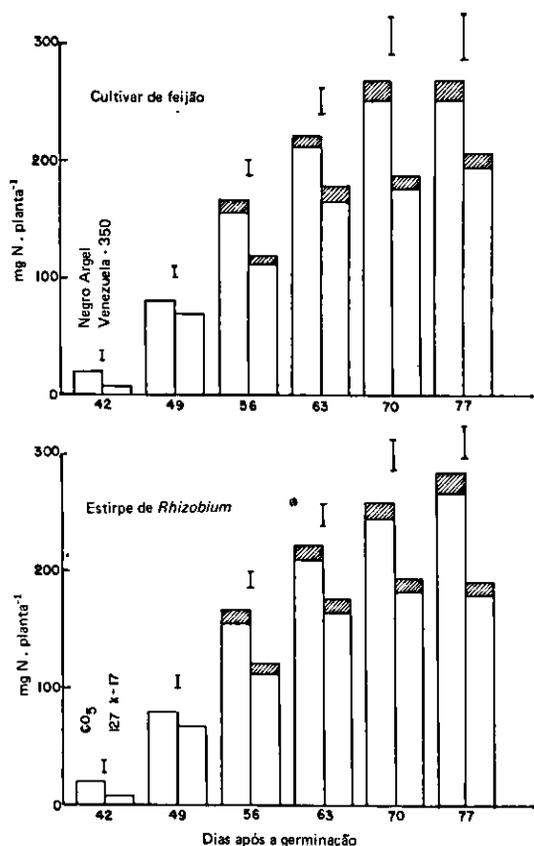


FIG. 3. Efeito da cultivar de feijão e da estirpe de *Rhizobium* no N acumulado nas partes reprodutivas. Médias de 8 repetições; aos 42 e 49 DAG, N das vagens; após os 56 DAG, N das sementes □ e da casca da vagem ▨; as barras verticais representam dms ao nível de 1%.

A evolução do hidrogênio é um processo que ocorre simultânea e obrigatoriamente com a redução do nitrogênio, havendo, teoricamente, o gasto de sete ATP equivalentes por hidrogênio produzido (Winter & Burris 1976), consumindo 25% a 50% dos elétrons destinados à nitrogenase e representando uma considerável perda de energia. Parte da energia perdida, porém, pode ser recuperada quando houver a ação da enzima hidrogenase, que recicla o hidrogênio (Schubert & Ryle 1980).

A evolução do hidrogênio foi maior nos sistemas simbióticos que acumularam menos nitrogênio,

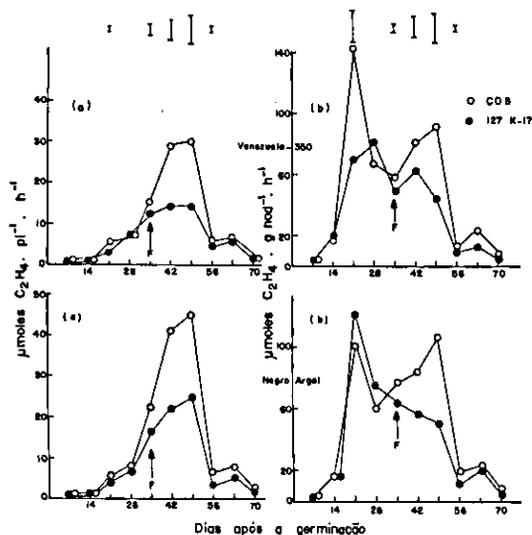


FIG. 4. Variação na atividade da nitrogenase total (a) e específica (b) durante o ciclo de duas cultivares de feijão inoculadas com as estirpes CO5 e 127 K-17 de *Rhizobium*. Médias de 4 repetições; as barras verticais representam dms quando houver diferença estatística ao nível de 1%; F indica a época do florescimento.

particularmente na fase de maior atividade (entre 35 e 56 DAG). Como a maior evolução do hidrogênio não esteve relacionada com a maior atividade da nitrogenase, pode-se deduzir que nas simbioses mais eficientes provavelmente houve a ação da enzima hidrogenase. Essa economia energética provavelmente desempenhou um papel relevante na produção de vagens, pois, como salientaram Pacoksky et al. (1984), a baixa reciclagem do hidrogênio observada em feijão provavelmente é um fator limitante nessa simbiose.

Houve efeito da cultivar de feijão e da estirpe de *Rhizobium* na evolução do hidrogênio. Inicialmente, acreditava-se que o metabolismo do hidrogênio era controlado unicamente pela estirpe de *Rhizobium*, uma vez que somente ela conteria as informações genéticas para a síntese da hidrogenase (Carter et al. 1978, Schubert & Ryle 1980). Posteriormente, porém, observaram que a planta hospedeira também poderia influenciar o metabolismo do hidrogênio (Gibson et al. 1981, Hungria

& Ruschel 1982), provavelmente pela indução da síntese da hidrogenase.

A variação na eficiência relativa (ER) dos elétrons destinados à nitrogenase está representada na Fig. 6, onde se observa que houve um declínio logo após o florescimento, o que concorda com resultados encontrados em feijão por Hungria & Ruschel (1982), porém não concorda com o observado em ervilha por Bethlenfalvai & Phillips (1977) e Edie & Phillips (1983), segundo os quais as maiores ER ocorrem sob condições de limitação de carbono, quando aumenta a atividade da hidrogenase. Também reforçam a hipótese de que, logo após o florescimento, os sistemas simbióticos não estavam limitados pelo carbono.

todos os sistemas simbióticos tiveram, pelo menos durante uma fase do ciclo da planta, a ação da hidrogenase.

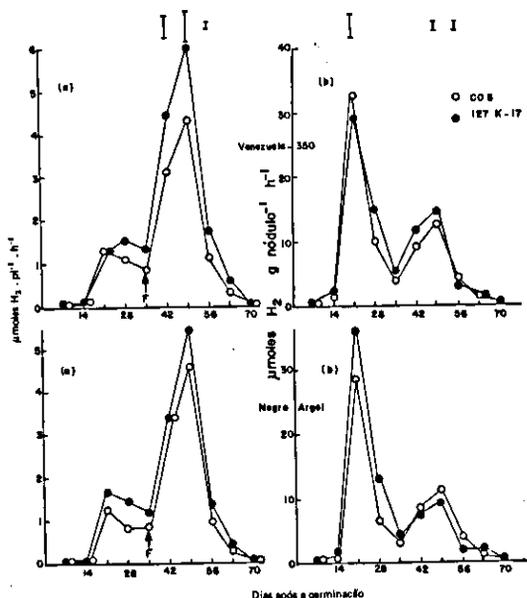


FIG. 5. Variação na evolução do H₂ total (a) e específica (b) durante o ciclo de duas cultivares inoculadas com as estirpes CO5 e 127 K-17. Médias de 4 repetições; barras verticais representam o dms ao nível de 1%; ↑F indicam o florescimento.

Foram constatadas diferenças entre os sistemas simbióticos quanto à ER (Fig. 6), e as simbioses mais eficientes apresentaram maior ER. Como há um desvio mínimo de 25% dos elétrons com a evolução do hidrogênio, pode-se concluir que os valores de ER acima de 0,75 estão relacionados com a atividade da hidrogenase. Desse modo,

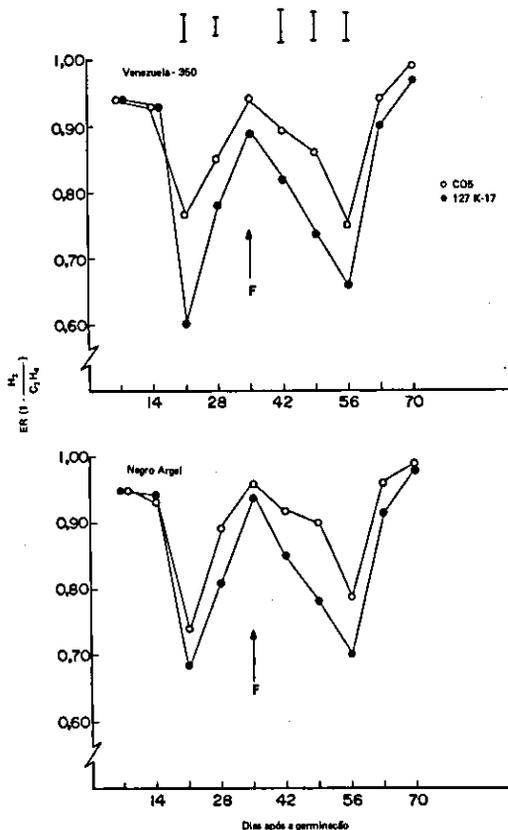


FIG. 6. Variação na eficiência relativa (ER) durante o ciclo de duas cultivares de feijão inoculadas com as estirpes CO5 e 127 K-17. Médias de 4 repetições; as barras verticais representam dms quando houver diferença estatística ao nível de 1%; ↑F indica a época de florescimento.

Houve uma alta correlação entre a ER (nas coletas entre 21 e 63 DAG) e o peso seco e nitrogênio total das sementes aos 77 DAG. Na Fig. 7, pode-se observar a correlação entre a ER aos 42 DAG e o nitrogênio total das sementes e o índice de colheita para o nitrogênio aos 77 DAG. Em soja, Carter et al. (1978) e Zablotowicz et al. (1980) também observaram que as estirpes que possuíam a enzima hidrogenase e, portanto, evoluíam menos hidrogênio, acumulavam mais nitrogênio nas sementes.

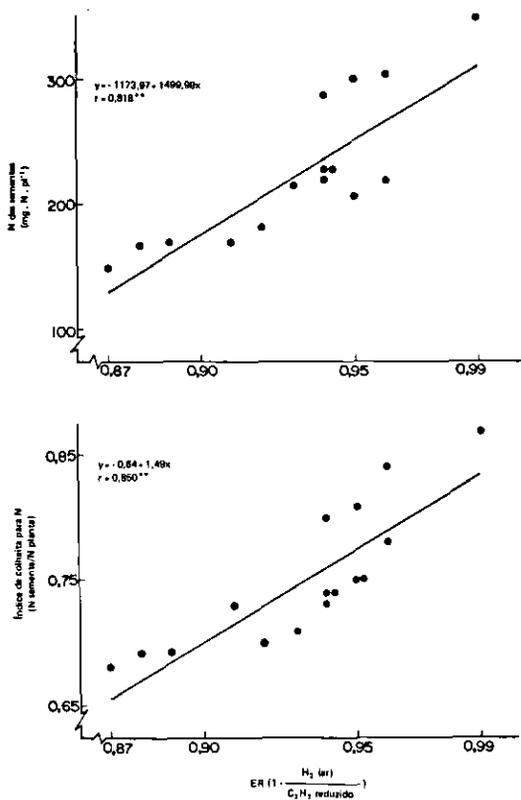


FIG. 7. Correlação entre a (X) eficiência relativa (ER) dos elétrons destinados à nitrogenase aos 35 DAG (florescimento) e (Y) o nitrogênio total das sementes e o índice de colheita para o nitrogênio aos 77 DAG em feijão nodulado.

Em relação ao transporte de nitrogênio na seiva do xilema, verificou-se que somente no início e no final do ciclo do feijão - fases de menor fixação de nitrogênio - foi possível detectar diferenças entre os sistemas simbióticos em relação à concentração de nitrogênio total na seiva (Fig. 8a). Mas, quando se considerou a taxa de transporte de nitrogênio (concentração de nitrogênio x taxa de exsudação da seiva), puderam ser detectadas diferenças entre os sistemas simbióticos, particularmente na fase de maior fixação de nitrogênio (Fig. 8b). Isso ocorreu porque houve um efeito, tanto da cultivar de feijão como da estirpe, na taxa de exsudação da seiva. O efeito da cultivar de feijão na taxa de exsudação já foi relatado por Thomas et al. (1984) e o efeito da estirpe de

Rhizobium em soja foi observado por Minamisawa et al. (1983).

A maior parte do nitrogênio na seiva foi transportada sob a forma de ureídios, alantoina e ácido alantóico (Fig. 9). O ácido alantóico, por sua vez, representou a maior fração dos ureídios, de 52% a 88%, concordando com resultados encontrados em soja por Zengbé & Salsac, (1983) e em feijão por Thomas et al. (1983), o que estaria relacionado com a atividade da alantoinase nas raízes e nódulos.

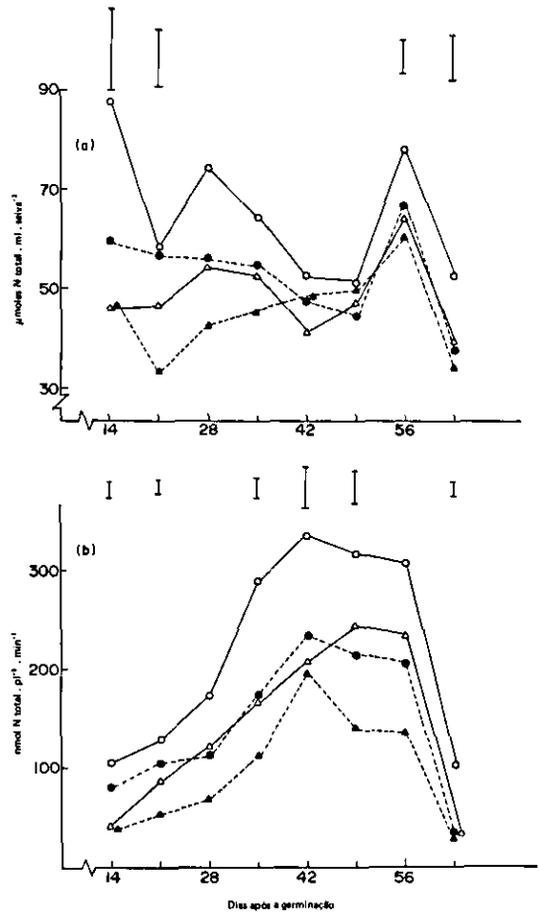


FIG. 8. Concentração (a) e taxa de transporte (b) de N total na seiva do xilema durante o ciclo de feijão das cultivares Negro Argel (O) e Venezuela - 350 (Δ) inoculadas com as estirpes CO5 (○ Δ) ou 127 K-17 (● ▲). Médias de 4 repetições e as barras verticais representam os dms quando houver diferença estatística ao nível de 1%.

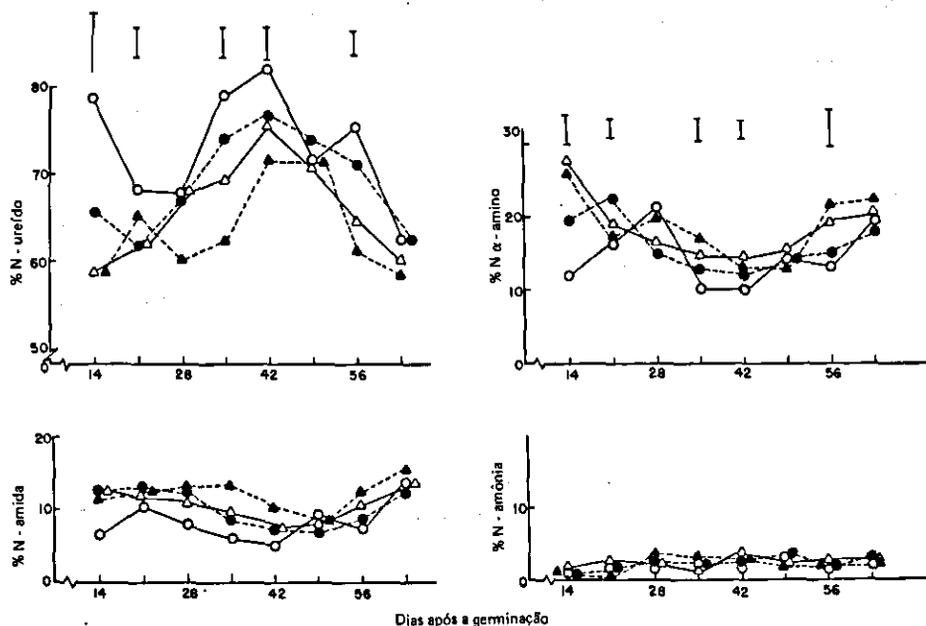


FIG. 9. Variação da % do N total da seiva do xilema como N-ureído, N- α -aminoácido, N-amida e N amônia durante o ciclo de feijão, cultivar Negro Argel (O) ou Venezuela-350 (Δ) inoculado com as estirpes CO5 (\triangle) ou 127 K-17 (\bullet , \blacktriangle) de *Rhizobium*. Médias de 4 repetições e as barras verticais indicam o dms quando houver diferença estatística ao nível de 1%.

Observou-se um aumento no transporte de ureídeos na época de maior atividade da nitrógenase, ou seja, entre 35 e 56 DAG (Fig. 9), conforme foi também observado em feijão nodulado por Cookson et al. (1980). Isso pode ter ocorrido porque nessa fase houve maior fixação de nitrogênio, sendo necessário incorporar a maior quantidade de amônia produzida em formas nitrogenadas caracterizadas por uma menor relação C/N, como os ureídeos, uma vez que não haveria, nessa mesma época, um aumento correspondente na quantidade de carbono disponível para os nódulos, o que concorda com a hipótese de Thomas & Schrader (1981b).

As combinações simbióticas mais eficientes, e que transportaram mais ureídeos, apresentaram menor transporte de N- α -amino, não havendo, porém, diferenças na % de nitrogênio sob a forma de amidas ou amônia (Fig. 9).

Houve efeito da cultivar de feijão (Tabela 2) na concentração e taxa de transporte de nitrogênio total na seiva do xilema, o que confirma resultados encontrados em feijão por Thomas et al. (1984).

Foi observado, também, um efeito na percentagem de N-ureídeos, e o melhor desempenho da cultivar Negro Argel foi relacionado com a maior produção de ureídeos, sendo que esta cultivar transportou, durante o ciclo, em média, 10% a mais de ureídeos do que a Venezuela-350.

O efeito da estirpe de *Rhizobium* no transporte de nitrogênio e teor de ureídeos pode ser visto na Tabela 3. A melhor estirpe, CO5, não só apresentou, em média, uma taxa de transporte de nitrogênio total 52% superior à da 127 K-17, como também transportou 10% a mais de nitrogênio sob a forma de ureídeos. O efeito da estirpe de *Rhizobium* na composição da seiva do xilema foi notado também em soja por Israel & McClure (1980) e Minamisawa et al. (1983), que constataram um aumento no teor de asparagina com as melhores estirpes. O melhor desempenho da estirpe também já foi relacionado com o maior teor de ureídeos em soja (Neves et al. 1985) e feijão (Hungria s.d.). Esses resultados levam à indicação de que a estirpe de *Rhizobium* pode afetar o metabolismo de assimilação e transporte de nitrogênio.

TABELA 2. Efeito da cultivar de feijão na concentração de N, taxa de transporte de N e percentagem de N-ureído na seiva do xilema durante o ciclo de feijão. Médias de 8 repetições.

Cultivar	Dias após a germinação							
	14	21	28	35	42	49	53	63
Negro Argel $\mu\text{mol N} \cdot \text{ml}^{-1}$ (a)	73.7	57.7	61.9	59.6	49.8	48.1	72.4	44.8
$\text{nmol N} \cdot \text{pl}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (b)	92.7	117.5	142.0	231.9	283.0	265.4	257.4	70.7
% N-ureído (c)	72.1	65.0	67.6	76.5	79.4	72.5	73.1	62.6
Venezuela-350 $\mu\text{mol N} \cdot \text{ml}^{-1}$ (a)	46.7	39.9	49.1	49.1	44.4	47.8	62.6	36.7
$\text{nmol N} \cdot \text{pl}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (b)	43.1	70.8	94.6	141.2	201.3	192.3	183.0	34.8
% N-ureído (c)	59.0	63.5	64.1	65.8	72.5	71.1	62.6	59.0
F (a)	**	**	**	**	ns	ns	**	**
F (b)	**	**	**	**	**	**	**	**
F (c)	**	ns	*	**	**	ns	**	*

* Significativo ao nível de 5%.

** Significativo ao nível de 1%.

ns = não-significativo.

TABELA 3. Efeito da estirpe de *Rhizobium* na concentração de N, na taxa de transporte de N e % N-ureído na seiva do xilema durante o ciclo do feijão. Médias de 8 repetições.

	Dias após a germinação							
	14	21	28	35	42	49	56	63
CO5 $\mu\text{mol N} \cdot \text{ml}^{-1}$ (a)	66.7	52.4	61.6	58.5	46.8	49.0	71.3	45.8
$\text{nmol N} \cdot \text{pl}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (b)	77.5	109.3	146.3	229.5	269.5	279.9	268.0	74.5
% N-ureído (c)	68.6	65.2	68.0	74.0	77.8	70.9	69.8	61.2
127 K-17 $\mu\text{mol N} \cdot \text{ml}^{-1}$ (a)	53.7	45.2	49.3	50.1	47.5	46.9	64.4	25.7
$\text{nmol N} \cdot \text{pl}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (b)	60.3	80.0	90.3	143.6	215.2	177.8	172.3	31.0
% N-ureído	62.3	63.3	63.7	68.2	74.1	72.7	65.9	60.4
F (a)	**	ns	**	**	ns	ns	**	**
F (b)	**	**	**	**	**	**	**	**
F (c)	ns	ns	**	**	**	ns	ns	ns

* Significativo ao nível de 5%.

** Significativo ao nível de 1%.

ns = não-significativo.

Observou-se uma alta correlação entre a percentagem de nitrogênio como ureídios (aos 28, 35, 42, 56 e 63 DAG) e o nitrogênio total das vagens ou o índice de colheita para nitrogênio aos 77 DAG. Na Fig. 10, estão representadas essas correlações com o teor de ureídios aos 35 DAG. Desse modo, pode-se concluir que os sistemas simbióticos mais eficientes em relação ao acúmulo de nitrogênio nas

sementes foram os que transportaram mais ureídios.

Recentemente, Rainbird et al. (1984) observaram que, embora os ureídios representassem a maior fração do nitrogênio transportado na seiva do xilema de soja, eles não desempenhavam o papel principal na nutrição do embrião. Entretanto, a atividade da alantoinase e alantoicase nas folhas e caules (Herridge et al. 1978, Thomas &

Schrader 1981a) permite a quebra e assimilação dos ureídeos em outros compostos, podendo ser responsável pela quebra de até 88% dos ureídeos, que podem ser então utilizados para a nutrição das sementes. Além disso, foi detectada alta atividade da alantoinase e alantoicase nos frutos em desenvolvimento (Thomas & Schrader 1981a), sendo que as sementes apresentam as maiores atividades da alantoinase (Herridge et al. 1978, Thomas & Schrader 1981a). Desse modo, os ureídeos podem ser degradados no caule, folha e vagens e assimilados em compostos como aminoácidos e amidas, que são utilizados pelas sementes, mas também podem ser transportados diretamente para as sementes, onde são degradados e então assimilados em aminoácidos e proteínas.

Encontrou-se uma correlação significativa entre a ER e a percentagem de nitrogênio sob a forma de ureídeos (Fig. 11) - o que concorda com resultados obtidos em soja (Neves et al. 1985) e em feijão (Hungria s.d.) -, e sugerindo uma possível relação entre o metabolismo dos ureídeos e o metabolismo do hidrogênio, o que poderia ser explicado pelo fato de que, quando há menor evolução do hidrogênio, fica disponível maior quantidade de ATP, e há maior produção de amônia, que deve então ser transportada sob formas nitrogenadas mais econômicas, como os ureídeos. Em resultados preliminares, essa hipótese está sendo confirmada em nossos laboratórios pela utilização de mutantes hup^+ , isto é, mutantes de estirpes nas quais originalmente não se detectou a atividade da hidrogenase.

Em relação à escolha de uma metodologia rápida para identificação dos sistemas simbióticos mais eficientes, pode-se ver, na Tabela 4, a comparação entre os métodos usados e o nitrogênio total das plantas (raiz + caule + folhas + vagens) durante o ciclo do feijão.

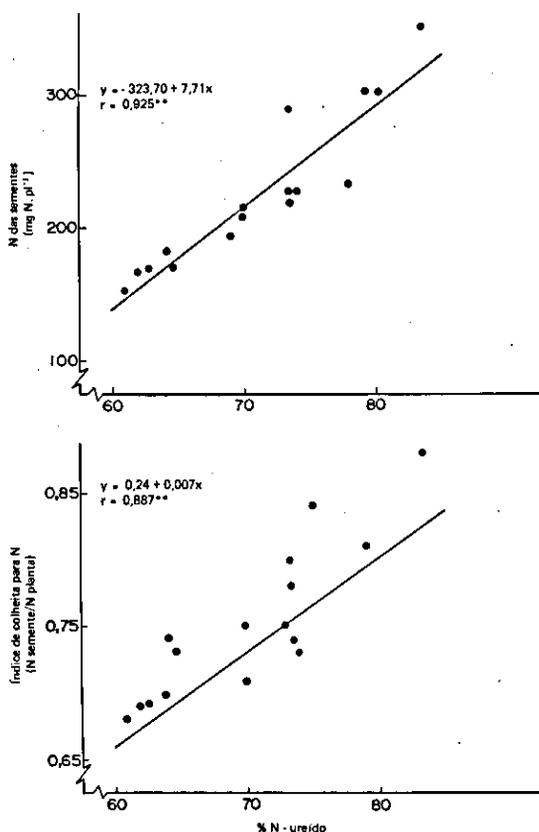


FIG. 10. Correlações entre (X) % N-ureído aos 35 DAG (florescimento) e (Y) N total das sementes e índice de colheita para o nitrogênio aos 77 DAG em feijão nodulado.

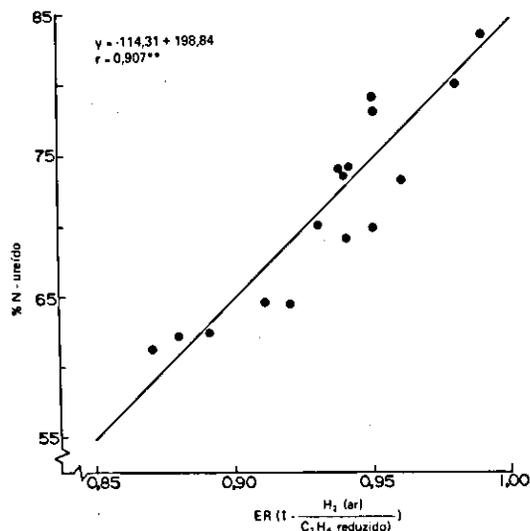


FIG. 11. Correlação entre a (X) eficiência relativa (ER) dos elétrons destinados à nitrogenase e (Y) a % N-ureído na seiva do xilema em feijão nodulado. Determinações aos 35 DAG.

TABELA 4. Correlações entre (X) redução do acetileno, ER e N na seiva do xilema e (Y) o N total acumulado nos tecidos do feijão durante o crescimento das plantas. Utilização de 16 pares de dados.

Parâmetro (X)	(Y) N total da planta							
	Dias após a germinação							
	14	21	28	35	42	49	56	63
Redução do acetileno ($\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g nod}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	n.s.	0,648**	-0,510**	0,855**	0,702**	0,900**	0,881**	n.s.
Redução do acetileno ($\mu\text{moles C}_2\text{H}_4 \cdot \text{pl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	n.s.	n.s.	n.s.	0,842**	0,809**	0,901**	0,600**	0,902**
ER ($1 - \frac{\text{H}_2}{\text{C}_2\text{H}_4}$)	n.s.	0,845**	0,894**	0,901**	0,841**	0,909**	0,900**	0,915**
Concentração de N na seiva do xilema ($\mu\text{mol N} \cdot \text{ml}^{-1}$)	0,635**	n.s.	n.s.	0,888**	0,540*	0,700**	0,760**	0,940**
Taxa de exsudação de N na seiva ($\text{nmol N} \cdot \text{pl}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	0,606**	n.s.	0,946**	0,926**	0,952**	0,928**	0,930**	0,950**
% N-ureído	0,510*	n.s.	0,700**	0,926**	0,946**	n.s.	0,935**	0,737**

* Significativo ao nível de 5%.

** Significativo ao nível de 1%.

ns = não-significativo.

Apesar das restrições que o método de redução do acetileno apresenta, encontrou-se uma boa correlação entre o etileno produzido e o nitrogênio acumulado nos tecidos, mas só a partir dos 35 DAG. Entretanto, a correlação com a ER foi mais elevada e foi significativa desde os 21 DAG.

A análise dos compostos nitrogenados na seiva do xilema vem sendo sugerida como um método prático e eficiente (Thomas et al. 1984) para a seleção dos melhores sistemas simbióticos. Pode-se constatar (Tabela 4) que a concentração de nitrogênio na seiva do xilema não foi um bom parâmetro, mas as correlações mais elevadas com o nitrogênio total da planta foram obtidas com a taxa de exsudação de nitrogênio na seiva do xilema, desde os 28 DAG, e com a percentagem de nitrogênio como ureídos aos 35 e 42 DAG.

Desse modo, pode-se concluir que outros métodos mais rápidos do que a análise de nitrogênio nos tecidos podem ser empregados na avaliação da eficiência dos sistemas simbióticos, tais como a taxa de translocação do nitrogênio na seiva do xilema, a percentagem de nitrogênio como ureídos, ou mesmo a ER. Neste caso, a época mais adequada para as avaliações foi aos 35 DAG (florescimento) e aos 42 DAG.

CONCLUSÕES

1. Foram observados efeitos da cultivar de feijão, da estirpe de *Rhizobium* e da interação entre cultivar e estirpe no peso seco e N total das partes vegetativas e reprodutivas, no índice de colheita (peso seco de sementes/peso seco total da planta), no índice de colheita para N (N semente/N planta) e no N perdido nas folhas senescentes.

2. O melhor desempenho simbiótico esteve associado com maiores taxas de redução do acetileno entre o florescimento (35 DAG) e o período médio de enchimento dos grãos (56 DAG) e alta remobilização do N das folhas para os grãos.

3. A evolução do H_2 pelos nódulos seguiu a atividade da nitrogenase, e os sistemas simbióticos que evoluíram mais H_2 acumularam menos N nos tecidos. Houve efeito da cultivar e da estirpe na eficiência relativa (ER) dos elétrons destinados à nitrogenase.

4. O melhor desempenho da cultivar Negro Argel e da estirpe CO5 esteve associado com taxas mais elevadas de transporte de N total na seiva do xilema e % do N na seiva sob a forma de ureídos, particularmente na época de maior atividade da nitrogenase (35 e 56 DAG).

5. Foi encontrada uma correlação positiva significativa entre a ER e a percentagem N-ureído, indicando uma possível relação entre o metabolismo do hidrogênio e o metabolismo dos ureídos nos nódulos.

6. A melhor combinação simbiótica, da cultivar Negro Argel com a estirpe CO5, superou a combinação menos eficiente, Venezuela-350 -127 K-17, em 88% quanto ao N total das sementes, em 20% quanto ao índice de colheita para N e perdeu menos N nas folhas senescentes.

7. A taxa de translocação de N na seiva do xilema, a percentagem N-ureído e a ER foram métodos válidos e rápidos para avaliação da eficiência dos sistemas simbióticos e a melhor época para essas avaliações, em feijão, foi entre 35 e 42 DAG.

REFERÊNCIAS

- BETHLENFALVAY, G.J. & PHILLIPS, D.A. Ontogenetic interactions between photosynthesis and symbiotic nitrogen fixation in legumes. *Plant Physiol.*, 60: 419-21, 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.135-46.
- CARTER, K.R.; JENNINGS, N.T.; HANUS, J. & EVANS, H.J. Hydrogen evolution and uptake by nodules of soybeans inoculated with different strains of *Rhizobium japonicum*. *Can. J. Microbiol.*, 24:304-11, 1978.
- 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.
- EDIE, S.A. & PHILLIPS, D.A. Effects of the host legume on acetylene reduction and hydrogen evolution by *Rhizobium* nitrogenase. *Plant Physiol.*, 72:156-60, 1983.
- ELKAN, G.H.; WYNNE, J.C. & SCHEEVEIS, T.J. Isolation and evaluation of strains of *Rhizobium* collected from centres of diversity in South America. *Trop. Agric., Trinidad*, 58(4):297-305, 1981.
- FELKER, P. Microdetermination of nitrogen in seed protein extracts with the salicylate - dichlorocyanurate color reaction. *Anal. Chem.*, 49:1088, 1977.
- FRANCO, A.A. & DÖBEREINER, J. Especificidade hospedeira na simbiose com *Rhizobium* - feijão e influência de diferentes nutrientes. *Pesq. agropec. bras.*, Rio de Janeiro, 2:467-74, 1967.
- GIBSON, A.H.; DREYFUS, B.L.; LAWN, R.L.; SPRENT, J.I. & TURNER, G.L. Host and environmental factors affecting hydrogen evolution and uptake. In: GIBSON, A.H. & NEWTON, W.E., ed. *Current perspectives in nitrogen fixation; proceedings of the Fourth International Symposium on Nitrogen Fixation*. Canberra, Aust. Acad. Sci., 1981. p.373.
- HARDY, R.W.F. & HAVELKA, U.D. Photosynthate as a major factor limiting nitrogen fixation by field grown legumes with emphasis on soybeans. In: NUTMAN, P.S., ed. *Symbiotic nitrogen fixation in plants*. Cambridge, Cambridge Univ. Press, 1976. p.421-39.
- HARDY, R.W.F.; HOLSTEIN, R.D.; JACKSON, E.K. & BURNS, R.C. The acetylene-ethylene assay for N₂ fixation; laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.*, 43:1185-207, 1968.
- HERRIDGE, D.F.; ATKINS, C.A.; PATE, J.S. & RAINBIRD, R.M. Allantoin and allantoinic acid in the nitrogen economy of the cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Plant. Physiol.*, 62:495-8, 1978.
- HERRIDGE, D.F. & PATE, J.S. Utilization of net photosynthate for nitrogen fixation and protein production in an annual legume. *Plant Physiol.*, 60:759-64, 1977.
- HUNGRIA, M. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em *Phaseolus vulgaris* L. Itaguaí, UFRRJ, s.d. Tese Doutorado.
- 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: REUNIÓN LATINOAMERICANA DE RHIZOBIUM, 11., Lima, Peru, 1982. *Memórias*. Lima, ALAR, 1982. p.60.
- ISRAEL, D.W. Cultivar and *Rhizobium* strain effects on nitrogen fixation and remobilization by soybeans. *Agron. J.*, 73:509-16, 1981.
- ISRAEL, D.W. & MCCLURE, P.R. Nitrogen translocation in the xylem of soybeans. In: CORBIN, F.T., ed. *Proceedings of the II World Soybean Conference*. Granada, Westview Press, 1980. p.111-27.
- LAWN, R.J. & BRUN, W.A. Symbiotic nitrogen fixation in soybeans. I. Effect of photosynthetic source-sink manipulation. *Crop Sci.*, 14:11-6, 1974.
- LIAO, C.F.H. Devarda's alloy method for total nitrogen determination. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 45:852-5, 1981.

- MCKNIGHT, T. Efficiency of isolates of *Rhizobium* in the cowpea group with proposed additions to this group. *Queensl. J. Agric. Sci.*, 6:61-76, 1949.
- MAGUE, T.H. & BURRIS, R.H. Reduction of acetylene and nitrogen by field grown soybeans. *New Phytol.*, 71:275-86, 1972.
- MATHESON, A.T.; TIGANE, E. & HANES, C.S. Quantitative chromatographic methods; an improved ninhydrin-hydrindantin reagent. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 39:417-25, 1961.
- MINAMISAWA, K.; ARIMA, Y. & KUMAZAWA, K. Transport of fixed nitrogen from soybean nodules inoculated with H_2 - uptake positive and negative *Rhizobium japonicum* strains. *Soil Sci. Plant Nutr.*, 29(1):85-92, 1983.
- MINCHIN, F.R.; SUMMERFIELD, R.J. & EAGLESHAM, A.R.J. Plant genotype x *Rhizobium* strain interactions in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Trop. Agric., Trinidad*, 55:107-15, 1978.
- 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.
- MITCHEL, H.L. Microdetermination of nitrogen in plant tissues. *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, 55:1-2, 1972.
- NELSON, A.N. & WEAVER, R.W. Seasonal nitrogen accumulation and fixation by soybeans grown at different densities. *Agron. J.*, 72:613-6, 1980.
- NEVES, M.C.P.; DIDONET, A.D.; DUQUE, F.F. & DÖBEREINER, J. *Rhizobium* strain effects on nitrogen transport and distribution in soybeans. *J. Exp. Bot.*, 36(169):1179-92, 1985.
- PACOKSKY, R.S.; BAYNE, H.G. & BETHLENFALVAY, G.J. Symbiotic interactions between strains of *Rhizobium phaseoli* and cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. *Crop Sci.*, 24:101-5, 1984.
- PEAT, J.R.; MINCHIN, F.R.; SUMMERFIELD, R.J. & JEFFCOAT, B. Young reproductive structures promote nitrogen fixation in soya bean. *Ann. Bot.*, 48(2):177-82, 1981.
- RAINBIRD, R.M.; THORNE, J.H. & HARDY, R.W.F. Role of amides, aminoacids and ureides in the nutrition of developing soybean seeds. *Plant Physiol.*, 74:329-34, 1984.
- RENNIE, R.J. & KEMP, G.A. Dinitrogen fixation on pea plants (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by growth stage and temperature regime. *Can. J. Bot.*, 59(7):1181-8, 1981.
- 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.
- RUSCHEL, A.P. & SAITO, S.M.T. Efeito da inoculação de *Rhizobium*, nitrogênio e matéria orgânica na fixação de nitrogênio em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). *R. bras. Ci. Solo*, 1:21-4, 1977.
- RUSCHEL, A.P.; SAITO, S.M.T. & TULMAN NETO, A. Eficiência da inoculação de *Rhizobium* em *Phaseolus vulgaris* L. I. Efeito de fontes de nitrogênio e cultivares. *R. bras. Ci. Solo*, 3:13-7, 1979.
- RUSCHEL, A.P.; VOSE, P.B.; MATSUI, E.; VICTORIA, R.L. & SAITO, S.M.T. Field evaluation of N_2 -fixation and nitrogen utilization by *Phaseolus* bean varieties determined by ^{15}N isotope dilution. *Plant Soil*, 65:397-407, 1982.
- 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 legumes. In: SUMMERFIELD, R.J. & BUNTING, A.H., ed. *Advances in legume science*. London, HMSO, 1980.
- STREETER, J.G. Seasonal distribution of carbohydrates in nodules and stem exudate from field-grown soybean plants. *Ann. Bot.*, 48:441-50, 1981.
- 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.*, 82:857-69, 1979.
- THOMAS, R.J.; JOKINEN, K. & SCHRADER, L.E. Effect of *Rhizobium japonicum* mutants with enhanced N_2 fixation activity on N transport and photosynthesis of soybeans during vegetative growth. *Crop Sci.*, 23:453-6, 1983.
- THOMAS, R.J.; MCFERSON, J.R.; SCHRADER, L.E. & BLISS, F.A. Composition of bleeding sap nitrogen from lines of field-grown *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Soil*, 79:77-9, 1984.
- THOMAS, R.J. & SCHRADER, L.E. The assimilation of ureides in shoot tissues of soybean. I. Changes in allantoinase activity and ureide contents of leaves and fruits. *Plant Physiol.*, 67:973-6, 1981a.
- THOMAS, R.J. & SCHRADER, L.E. Review; ureide metabolism in higher plants. *Phytochemistry*, 20:361-71, 1981b.
- VINCENT, J.M. *Manual for the practical study of root nodule bacteria*. Oxford, Blackwell, 1970. 164p. (Inst. Biol. Program Handb., 15)
- VOGELS, G.D. & DRIFT, C. van der. Differential analysis of glyoxylate derivatives. *Anal. Biochem.*, 33:143-57, 1970.
- WINTER, H.C. & BURRIS, R.H. Nitrogenase. *Annu. Rev. Biochem.*, 45:409-26, 1976.
- ZABLOTOWICZ, R.M.; RUSSEL, S.A. & EVANS, H.J. Effect of the hydrogenase system in *Rhizobium japonicum* on the nitrogen fixation and growth of soybeans at different stages of development. *Agron. J.*, 72:555-64, 1980.
- ZENGBÉ, M. & SALSAC, L. Variations des teneurs en uréides et enzymes du catabolisme purique chez *Glycine max*. *Physiol. Veg.*, 21(1):67-76, 1983.