

ASSIMILAÇÃO DE NITROGÊNIO EM PLANTAS NODULADAS

DE *PHASEOLUS VULGARIS* L. E *VIGNA UNGUICULATA* (L.) WALP¹

MARIA C.P. NEVES², MANLIO S. FERNANDES³ e MARCIA F.M. SA⁴

RESUMO - Foram comparados e contrastados em condições de campo os processos de assimilação de nitrogênio via nitrogenase e nitrato-redutase, o transporte e a acumulação de nitrogênio em plantas noduladas de *Phaseolus vulgaris* cv. Rio Tibagi e *Vigna unguiculata* cv. Vita 34. *V. unguiculata* apresentou valores mais altos de atividade da nitrogenase. A pequena nodulação de *P. vulgaris* resultou em maior dependência do nitrogênio mineral do solo, o que foi indicado pelos valores elevados de atividade da nitrato-redutase em relação a *V. unguiculata*, principalmente na fase reprodutiva das plantas. A superioridade de *V. unguiculata* em assimilar e depois remobilizar o nitrogênio originalmente alocado nos órgãos vegetativos foi acompanhado de produção de grãos 28% maior que a do *P. vulgaris*. Não foi observada correlação entre as variações estacionais do teor de ureídeos da seiva e atividade da nitrogenase para as duas espécies estudadas; entretanto, *P. vulgaris* exibiu uma correlação negativa entre as variações na atividade da nitrato-redutase e o teor de ureídeos na seiva, indicando que as vias metabólicas que resultam na produção de ureídeos funcionam alternativamente à assimilação de nitratos.

Termos para indexação: nitrogenase, nitrato-redutase, ureídeos.

NITROGEN ASSIMILATION BY NODULATE PLANTS OF *PHASEOLUS VULGARIS* L. AND *VIGNA UNGUICULATA* (L.) WALP

ABSTRACT - Under field conditions, the processes of nitrogen assimilation via nitrogenase and nitrate-reductase, the transport and the accumulation of nitrogen in nodulated plants of *Phaseolus vulgaris* cv. Rio Tibagi and *Vigna unguiculata* cv. Vita 34 were compared and contrasted. *V. unguiculata* showed better nodulation than *P. vulgaris* and consequently had higher rates of nitrogenase activity. The small nodulation of *P. vulgaris* resulted in greater dependence on soil mineral nitrogen as indicated by the higher rates of nitrate-reductase activity compared with *V. unguiculata*, especially during reproductive stage of growth. The superiority of *V. unguiculata* in terms of assimilation and remobilization of stored nitrogen resulted in a seed yield 28% greater than that of *P. vulgaris*. There was no correlation between the seasonal changes in the ureides content of the xylem sap and the nitrogenase activity for both plant species. However, *P. vulgaris* showed a negative correlation between the nitrate-reductase activity and the ureide content of the sap indicating that the metabolic pathways leading to ureide production operates alternatively to nitrate assimilation.

Index terms: nitrogenase, nitrate-reductase, ureides.

INTRODUÇÃO

O custo cada vez mais alto dos fertilizantes nitrogenados tende a dirigir a pesquisa agrícola, principalmente nos países em desenvolvimento, no sentido de utilizar esses adubos de forma racional e eficiente e, sempre que possível, substituí-los total ou parcialmente pela fixação biológica de nitrogênio, principalmente em se tratando de leguminosas. Dentre os muitos fatores que contribuem para aumentar a produtividade é de fundamental impor-

tância uma maior disponibilidade de nitrogênio em estágios críticos do crescimento. Leguminosas noduladas dispõem de duas fontes de nitrogênio, o atmosférico e o nitrogênio mineral (solo ou fertilizante), na forma, principalmente, de nitratos, tendo, portanto, dois processos distintos de assimilação de nitrogênio que operam via nitrogenase e nitrato-redutase, respectivamente. Conseqüentemente, é indispensável o conhecimento do funcionamento destes processos fisiológicos de assimilação de nitrogênio de modo a permitir o desenvolvimento de uma tecnologia capaz de aumentar os níveis atuais de produtividade, mantendo o uso mínimo de fertilizantes nitrogenados.

Grande variabilidade é observada entre as diferentes espécies de leguminosas quanto às variações estacionais da atividade da nitrogenase. Atividades máximas são observadas ora no período vegetativo, ora na floração ou no período de enchimento de grãos, ocorrendo, em algumas espécies, até mesmo

¹ Aceito para publicação em 22 de junho de 1981. Contribuição do Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), CEP 23460 - Seropédica, RJ.

² Bióloga, Ph.D., Prof. Adjunta, Departamento de Solos, UFRRJ, CEP 23.460 - Seropédica, RJ.

³ Eng.º Agr.º, Ph.D., Prof. Adjunto, Departamento de Solos, UFRRJ.

⁴ Eng.º Agr.º, aluna do Curso de Pós-Graduação, UFRRJ, bolsista da CAPES.

dois períodos distintos de atividades máximas (Minchin et al. 1981), dependendo tanto da espécie como da cultivar, estirpe de *Rhizobium* e das condições ambientais em que os experimentos foram conduzidos. A assimilação de nitratos do solo nos períodos de baixa atividade da nitrogenase pode, em grande parte, contribuir para a economia de nitrogênio das plantas. Entretanto, a atividade da nitrato-reductase também está sujeita a variações estacionais, que já foram relatadas para *Glycine max* (Streeter 1972, Tribodeau & Jaworski 1975, Franco et al. 1978), *Vigna unguiculata* (Minchin et al. 1980, Pulver 1977) e *Phaseolus vulgaris* (Franco et al. 1979).

O processo preponderante de assimilação de nitrogênio determina, em grande parte, o tipo do composto nitrogenado que é transportado e fica disponível para os órgãos em crescimento. Já que a síntese de ureídeos ocorre principalmente nos nódulos (Tajima & Yamamoto 1975) e está relacionada com a assimilação do nitrogênio molecular recém fixado (Matsumoto et al. 1977b, Fujihara & Yamaguchi 1978, Herridge et al. 1978), a utilização de nitratos parece restringir a produção de ureídeos (alantoína e alantoato) em *G. max* (Matsumoto et al. 1977a; Fujihara et al. 1977) e *V. unguiculata* (Minchin et al. 1980, Neves et al. 1981).

O presente trabalho teve por objetivo estudar sob condições de campo os processos de assimilação de nitrogênio em plantas noduladas de *P. vulgaris* e *V. unguiculata* (determinados através das atividades da nitrogenase e nitrato-reductase) e o transporte e acumulação de nitrogênio nas plantas durante o ciclo de desenvolvimento.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em condições de campo, em solo Podzólico Vermelho-Amarelo, série Silvicultura, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Ramos et al. 1973). A análise do solo antes da instalação do experimento revelou a seguinte composição: 51,8 ppm de K; 3,2 ppm de P; 0,05 mE/100 g de Al; 5,2 mE/100 g de Ca + Mg; 0,13% de N total e pH 5,9. Antes do plantio foi feita uma adubação básica com superfosfato simples (80 kg/ha⁻¹ de P₂O₅), KCl (30 kg/ha⁻¹ de K₂O) e (NH₄)₂SO₄ (20 kg/ha⁻¹ de N). A área experimental de 500 m² foi dividida em parcelas de 15 m², distribuídas em blocos ao acaso, com quatro repetições, com espaçamento de 0,6 m x 0,05 m entre plantas. As sementes foram inoculadas com as estirpes de *Rhizobium* correspondentes

(uma mistura de C-05 e F 413 para *P. vulgaris* cv. Rio Tibagi e I₁a para *V. unguiculata* cv. Vita 34), imediatamente antes do plantio, que foi feito em março de 1980. Durante o experimento, o solo foi mantido úmido através de freqüentes irrigações. As colheitas foram feitas semanalmente a partir da emergência (sete dias após o plantio), com início às 9 h, para evitar variações diurnas na atividade das enzimas.

Atividade da nitrogenase. Duas plantas por parcela foram cuidadosamente removidas do solo, cortadas na altura da cicatriz cotiledonar e as raízes noduladas foram colocadas em frascos de 300 ml, dos quais 12% do ar foi substituído por acetileno. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente (no campo), foram tiradas amostras de 0,5 ml da mistura gasosa do interior dos frascos para determinação por cromatografia do etileno produzido (Dart et al. 1972).

Atividade da nitrato-reductase. Os folíolos do internódio médio de cinco plantas escolhidas ao acaso, em cada parcela, foram coletados, acondicionados em gelo e imediatamente trazidos para o laboratório, para determinação da atividade da nitrato-reductase pelo método de Jaworski (1971).

Determinação do peso seco e nitrogênio total. Raiz, caule e folhas de cinco plantas por parcela foram secos a 60°C até peso constante, para determinação do peso seco, e o nitrogênio total de cada componente foi determinado pelo método de Kjeldahl.

Coleta de exsudato do xilema e análise de ureídeos. Quatro plantas escolhidas ao acaso em cada parcela foram decapitadas a 3 cm da superfície do solo, e o exsudato foi coletado durante uma hora (Minchin et al. 1980). As amostras foram guardadas a -20°C até o momento da análise. O teor de alantoína e alantoato na seiva foi determinado colorimetricamente pelo método de Young & Conway (1942).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferenças significativas na atividade da nitrato-reductase de *V. unguiculata* durante o ciclo da planta (Fig. 1), enquanto que *P. vulgaris* mostrou dois picos de atividade da nitrato-reductase, um aos 21 dias após o plantio e outro aos 56 dias após o plantio (duas semanas após o início da floração). Nestas duas épocas, a atividade da nitrato-reductase de *P. vulgaris* foi cerca de quatro vezes mais elevada que a observada para *V. unguiculata* e mesmo no período em que a atividade foi mínima (entre 42 e 49 dias após o plantio) os valores ainda eram cerca de 2,5 vezes superiores aos registrados para *V. unguiculata*. As variações estacionais da nitrato-reductase de *P. vulgaris* observadas neste experimento mostraram tendências semelhantes às observadas por Franco et al. (1979),

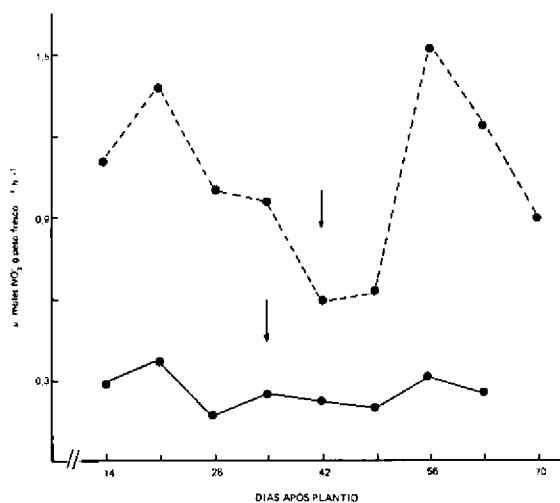


FIG. 1. Atividade da nitrato redutase durante o ciclo de *P. vulgaris* (0 - - 0) e *Vigna unguiculata* (0 — 0); ↓ indica início de floração.

com o segundo pico de atividade ocorrendo duas semanas após o início da floração. As variações estacionais na atividade da nitrato-redutase de *V. unguiculata* cv. Vita 34 foram muito menos acentuadas que as observadas por Minchin et al. (1980) em plantas não noduladas da cultivar K 2809 crescidas em fitotrons e recebendo diariamente solução nutritiva contendo 200 ppm N-nitrato, portanto, inteiramente dependentes desta via de assimilação de nitrogênio.

O aumento exponencial do peso seco de nódulos de *V. unguiculata* logo nas primeiras semanas após o plantio contrasta com a nodulação extremamente deficiente de *P. vulgaris* (Fig. 2). Entretanto, ambas as espécies exibem comportamentos similares quanto à época de início da senescência dos nódulos e, por conseguinte, queda de peso seco, que atingiu peso mínimo dentro de três semanas após o início da floração. Os valores máximos de peso seco de nódulos registrados neste experimento são menores que os encontrados para *V. unguiculata* crescendo em casa de vegetação ou fitotrons (Neves et al. 1981, Minchin et al. 1980, Neves 1978) e para *P. vulgaris* crescendo no campo e casa de vegetação (Franco et al. 1979, Franco & Day 1978). Entretanto, os valores observados estão dentro da média para estas culturas em condi-

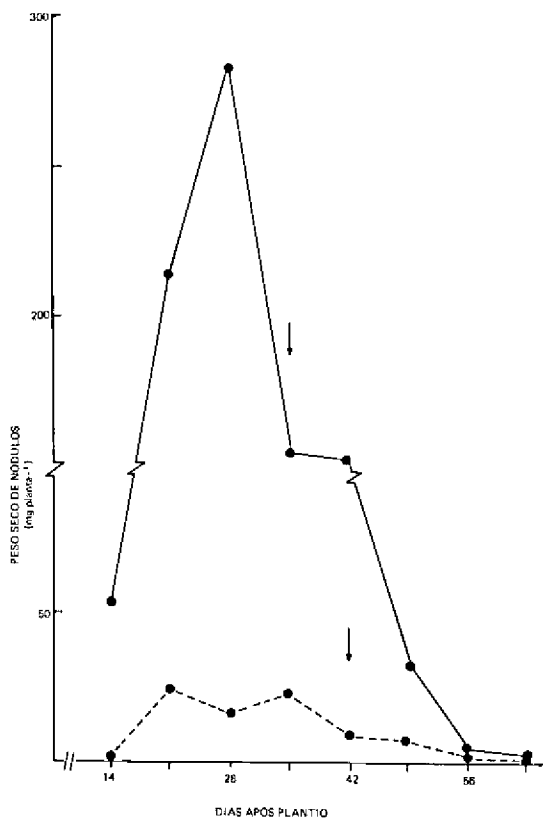


FIG. 2. Mudanças no peso seco de nódulos durante o ciclo de *P. vulgaris* (0 - - 0) e *V. unguiculata* (0 — 0); ↓ indica início de floração.

ções de campo (faixa de 30 a 180 mg planta⁻¹ para *P. vulgaris* e de 150 - 950 mg planta⁻¹ para *V. unguiculata*), para diversas cultivares (F.F. Duque, comunicação pessoal). Convém, entretanto, salientar que foi observado, a partir da época da floração um ataque de larvas de insetos aos nódulos de ambas as espécies, o qual deve ter influenciado na nodulação. Ezedinma (1964) também mencionou ataques de larvas em nódulos de *V. unguiculata* porém a importância de tal fator ainda necessita ser devidamente avaliada.

A atividade da nitrogenase foi medida até a sexta semana após o plantio (um acidente inutilizou as medições da sétima e oitava semana). A fixação de nitrogênio medida pela atividade da nitrogenase variou sazonalmente, de modo muito semelhante à

variação observada no peso dos nódulos (Fig. 2 e 3). As diferenças extremamente acentuadas de nodulação entre *P. vulgaris* e *V. unguiculata* também existem em relação à fixação de nitrogênio. Semelhante ao que acontece com o peso dos nódulos, a atividade da nitrogenase cai drasticamente logo após o início da floração (Fig. 3). Como foi observada uma correlação altamente significativa ($r = 0,85^{**}$) entre o peso dos nódulos e a atividade de nitrogenase, pode-se estimar que a fixação de nitrogênio, a partir da sétima semana após o plantio, foi, praticamente, zero. Neste aspecto, os resultados obtidos diferem dos de Franco et al. (1979), que registraram valores bem mais altos para a atividade da nitrogenase de um outro sistema simbiótico (*P. vulgaris* cv. Rico 23/*Rhizobium* F 300 + F 310). Valores bem mais altos de ativi-

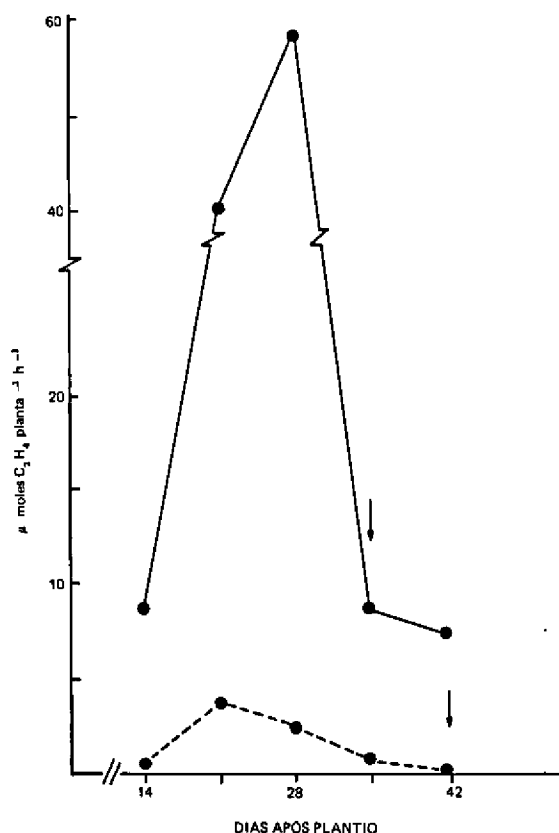


FIG. 3. Atividade da nitrogenase (redução de C_2H_2) durante o ciclo de *P. vulgaris* (O - - O) e *V. unguiculata* (O — O); ↓ indica início de floração.

de da nitrogenase já foram também relatados para *V. unguiculata* (Neves et al. 1981, Summerfield et al. 1977), porém estes valores provavelmente refletem as condições próximas do ótimo em que as plantas foram crescidas. Nos trópicos e em condições de campo, valores bem próximos aos deste experimento têm sido freqüentemente observados (F.F. Duque, comunicação pessoal).

A Fig. 4 mostra a variação estacional do teor de ureídeos na seiva obtida como exsudado de plantas decapitadas. Na primeira semana após a germinação (quatorze dias após o plantio), o teor de ureídeos de *V. unguiculata* foi 12,5 vezes maior que os de *P. vulgaris*, e se manteve mais alto até a quinta semana, embora as diferenças não fossem tão acentuadas (1,5 vez maior). Na sexta semana, entretanto, os teores de ureídeos em *P. vulgaris* mostraram um aumento acentuado, ultrapassando o de *V. unguiculata* em 1,5 vez, voltando a cair para níveis inferiores aos de *V. unguiculata* apenas na oitava semana após o plantio. A variação estacional nos teores de ureídeos não coincide com a observada no peso de nódulos e atividade da nitrogenase (Fig. 2, 3 e 4). Por outro lado, os níveis máximos de ureídeo em *P. vulgaris*, entre a sexta e sétima semana após o plantio, coincidem com níveis mínimos de atividade da nitrato-redutase (Fig. 1 e 4). Ao rápido aumento na atividade da nitrato-redutase entre

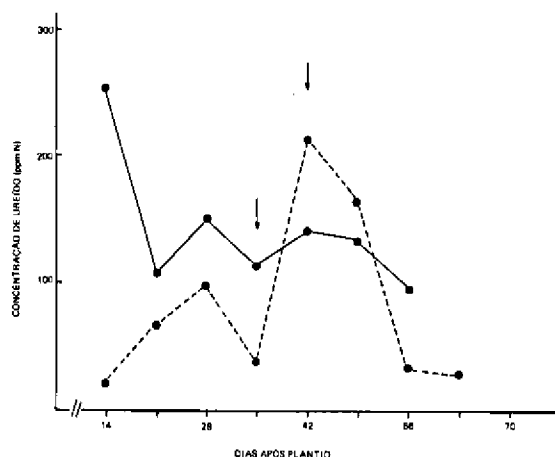


FIG. 4. Teor de ureídeo no exsudado do xilema durante o ciclo do *P. vulgaris* (O - - O) e *V. unguiculata* (O — O); ↓ indica início de floração.

a sétima e oitava semanas, correspondeu uma acentuada queda no teor de ureído; e considerando-se todo o período experimental, observa-se uma correlação negativa ($r = -0,79^*$) entre os dois parâmetros. Para *V. unguiculata* tal correlação não foi observada ($r = -0,18$).

Em ambientes controlados, correlações estreitas são observadas entre o teor de ureídos transportado na seiva e a fixação de nitrogênio de plantas totalmente dependentes da fixação biológica de nitrogênio e recebendo solução nutriente sem nitrogênio (Minchin et al. 1980, Cookson et al. 1980). A variação observada neste experimento provavelmente reflete o que acontece com plantas sujeitas a nutrição mista, como geralmente ocorre em condições de campo, apesar de que as influências de diferentes taxas transpiracionais possam ter concorrido para tais respostas muito embora a umidade do solo tenha sido controlada e o plantio na época de estiagem permitiu coletas sempre em dias de sol.

A Tabela 1 mostra a variação estacional do nitrogênio acumulado nas raízes, caules e folhas das duas espécies estudadas. Em *P. vulgaris*, o nitrogênio total das raízes aumenta até os 28 dias após o plantio e em seguida mantém-se relativamente estável. No caule e folhas, o nitrogênio total aumenta até a sétima semana após o plantio, caindo logo em seguida. Em *V. unguiculata* o acúmulo de nitrogênio nas raízes, caule e folhas é mais intenso e atinge valores máximos por volta do início da floração (35 dias após o plantio). O valor máximo de nitrogênio total acumulado na parte aérea de *P. vulgaris* e *V. unguiculata* ocorre na floração (35 e 42 dias após o plantio), respectivamente; e a partir desta época começa a ser translocado para os frutos. Aparentemente, cerca de 47% do nitrogênio acumulado nas folhas de *P. vulgaris* é remobilizado para os frutos, enquanto que *V. unguiculata* chega a remobilizar cerca de 67% do nitrogênio alocado originalmente nas folhas.

Estes resultados mostram diferenças acentuadas no metabolismo de nitrogênio de *P. vulgaris* e *V. unguiculata*. A superioridade de *V. unguiculata* em obter o nitrogênio necessário para crescimento e produção de sementes deve-se não só à ativa fixação de N_2 e assimilação durante o período vegetativo (Fig. 5), mas também à remobilização eficiente

TABELA 1. Variação estacional do nitrogênio total ($mg\ planta^{-1}$) em raízes, caule e folhas de feijão e cowpea.

Componente	Dias após o plantio						
	14	21	28	35	42	49	63
	Feijão						
Raiz	0.7	0.8	1.5	1.3	1.3	1.6	1.8
Caule	1.2	1.6	3.4	6.6	10.3	11.7	8.6
Folha	6.8	10.7	22.1	28.1	38.4	46.8	24.5
Total	8.7	13.1	27.8	36.0	50.0	56.9	34.5
	Cowpea						
Raiz	1.4	2.8	2.3	2.7	3.9	2.9	4.9
Caule	1.9	4.7	9.4	14.6	24.7	27.4	19.1
Folha	10.7	29.2	45.4	61.3	57.3	51.3	20.1
Total	14.0	36.7	57.1	78.6	85.9	81.6	44.1

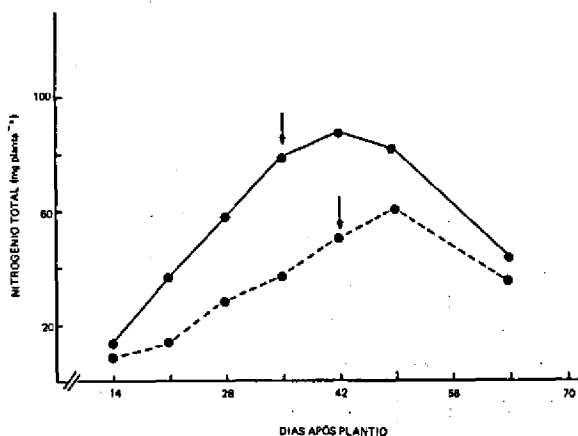


FIG. 5. Acumulação de nitrogênio total (raiz + caule + folhas) durante o ciclo de *P. vulgaris* (O - - O) e *V. unguiculata* (O — O); ↓ indica o início de floração.

te do nitrogênio acumulado nos estágios iniciais do desenvolvimento, o que resultou na produção significativamente mais elevada de grãos (1.041 contra 813 kg/ha⁻¹ para *V. unguiculata* e *P. vulgaris*, respectivamente), contendo, entretanto, menos teores semelhantes de nitrogênio (3,03 e 3,30% respectivamente).

CONCLUSÕES

1. *V. unguiculata* apresentou uma nodulação muito superior à de *P. vulgaris*, e, correspondentemente, apresentou níveis mais altos de atividade da nitrogenase, acumulando mais nitrogênio e de modo mais rápido. A pequena nodulação de *P. vulgaris* resultou em uma maior dependência do nitrogênio mineral, o que é indicado em relação à *V. unguiculata*, principalmente na fase de maior demanda de nitrogênio (início do período reprodutivo).

2. *V. unguiculata* mostra acúmulo e translocação de nitrogênio muito maiores que *P. vulgaris*, e que resultaram em um aumento de 28% na produção de grãos. Surpreendentemente, as tendências estacionais do teor de ureído e atividade da nitrogenase não coincidiram em nenhuma das espécies estudadas, muito embora correlação altamente significativa entre estes dois parâmetros já tenha sido observada em *V. unguiculata* crescida em areia e

vermiculita (Minchin et al. 1981). Existe a possibilidade de que parte dos ureídos tenha sido formada a partir da amônia absorvida do solo, fato já evidenciado em estudos de casa de vegetação com *G. max* e *P. vulgaris* (Matsumoto et al. 1977a, Cookson et al. 1980).

3. Entretanto, a quantidade de amônia aplicada foi baixa (20 ppm N), e a nitrificação desta amônia já teria sido completa, considerando-se as condições ambientais do experimento e o intervalo de tempo decorrido entre a aplicação da amônia e o início do experimento (Eira et al. 1968).

4. O feijão, por outro lado, com elevada atividade da nitrato-redutase, exibe uma correlação negativa entre este parâmetro e a concentração de ureído na seiva, mostrando que as vias metabólicas que resultam na produção de ureído funcionam alternativamente à nitrato-redutase e indicando uma possível competição por esqueletos de carbono, já que em termos de energia e redução do nitrato a amônia nas folhas pode se beneficiar do excesso de poder redutor proveniente da fotofosforilação (Ryle et al. 1978, 1979).

5. *P. vulgaris* e *V. unguiculata* são leguminosas que produzem grãos de características muito semelhantes, sendo que a última é freqüentemente usada como sucedânea do *P. vulgaris*; entretanto, os aspectos fisiológicos estudados mostram que estas culturas são muito diferentes, requerendo, portanto, diferentes tipos de manejo no campo.

REFERÊNCIAS

- COOKSON, C.; HUNGHERS, H. & COOMBS, J. Effects of combined nitrogen on anapleurotic carbon assimilation and bleeding sap composition in *Phaseolus vulgaris* L. *Planta*, 148:338-45. 1980.
- DART, P.J.; DAY, J.M. & HARRIS, D. Assay of nitrogenase activity by acetylene reduction. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, Viena, Áustria. Use of isotopes for study of fertilizer utilization by legume crops. 1972. p.85-100.
- EIRA, P.A.; ALMEIDA, P.L. & ALVAHYDO, R. Movimento do ion nitrato em solos da série Itaguaí, nas condições naturais de campo. *Pesq. agropec. bras.*, 3:267-73, 1968.
- EZEDINMA, F.O.C. Effect of preparatory cultivation on the general performance and yield of cowpea. *Nigerian agric.*, 1:21-5, 1964.
- FRANCO, A.A. & DAY, J.M. Effects of lime and molybdenum on nodulation and nitrogen fixation of

- Phaseolus vulgaris* L. in acid soils of Brazil. Turrialba, 30:99-105, 1978.
- FRANCO, A.A.; PEREIRA, J.C. & NEYRA, C.A. Seasonal patterns of nitrate-reductase and nitrogenase activities in *Phaseolus vulgaris* L. Plant Physiol., 63: 421-4, 1979.
- FUJIHARA, S. & YAMAGUCHI, M. Probable site of allantoin formation in nodulating soybean plants. Phytochemistry, 17:1239-43, 1978.
- FUJIHARA, S.; YAMAMOTO, K. & YAMAGUCHI, M. A possible role of allantoin and the influence of nodulation on its production in soybean plants. Plant Soil, 48:233-42, 1977.
- HERRIDGE, D.F.; ATKINS, C.A.; PATE, J.S. & RAINBIRD, R.M. Allantoin and allantoic acid in the nitrogen economy of the cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). Plant Physiol., 62:495-8, 1978.
- JAWORSKI, E.G. Nitrate-reductase assay in intact plant tissues. Biochem. Biophys. Res. Commun., 43: 1274-9, 1971.
- MATSUMOTO, T.; YATAZAWA, M. & YAMAMOTO, Y. Effect of exogenous nitrogen compounds on the concentration of allantoin and various constituents in several organs of soybean plants. Plant Cell Physiol., 18:613-24, 1977a.
- MATSUMOTO, T.; YATAZAWA, M. & YAMAMOTO, Y. Incorporation of ^{15}N into allantoin in nodulated soybean plants supplied with $^{15}\text{N}_2$. Plant Cell Physiol., 18:459-62, 1977b.
- MINCHIN, F.R.; SUMMERFIELD, R.; HADLEY, P.; ROBERTS, E.H. & RAWSTHORNE, S. Carbon and nitrogen nutrition of nodulated roots of grain legumes. Plant Cell Environ., 4:5-26, 1981.
- MINCHIN, F.R.; SUMMERFIELD, R.J. & NEVES, M.C.P. Carbon metabolism, nitrogen assimilation and seed yield of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) grown in an adverse temperature regime. J. Exp. Bot., 31:1327-45, 1980.
- NEVES, M.C.P. Carbon and nitrogen nutrition of cowpea (*Vigna unguiculata*). Inglaterra, University of Reading, 1978. Tese Doutorado.
- NEVES, M.C.P.; MINCHIN, F.R. & SUMMERFIELD, R.J. Carbon metabolism, nitrogen assimilation and seed yield of cowpea (*Vigna unguiculata*) plants dependent on nitrate-nitrogen or on one of two strains of *Rhizobium*. Trop. Agric., 58:115-32, 1981.
- PULVER, E.L. Grain legume improvement programme. In: INTERNATIONAL INSTITUTE OF TROPICAL AGRICULTURE, Ibadan, Nigéria. House report. Nigéria, 1977. p.49-60.
- RAMOS, D.P.; CASTRO, A.F. de & CAMARGO, M.N. Levantamento detalhado de solos da área da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Pesq. agropec. bras., 8(6):1-27, 1973.
- RYLE, G.J.A.; POWELL, C.E. & GORDON, A.J. Effect of source of nitrogen on the growth of Fiskeby soyabean: the carbon economy of whole plants. Ann. Bot., 42:637-48, 1978.
- RYLE, G.J.A.; POWELL, C.E. & GORDON, A.J. The respiratory costs of nitrogen in soyabean, cowpea and white clover. II. Comparison of the cost of nitrogen fixation and the utilization of combined nitrogen. J. Exp. Bot., 30:145-53, 1979.
- STREETER, J.G. Nitrogen nutrition of field grown soyabean plants. II. Seasonal variations in nitrate-reductase, glutamate dehydrogenase and nitrogen constituents of plant parts. Agron. J., 64:315-9, 1972.
- SUMMERFIELD, R.J.; DART, P.J.; HUXLEY, P.A.; EAGLESHAM, A.R.J.; MINCHIN, F.R. & DAY, J.M. Nitrogen nutrition of cowpea (*Vigna unguiculata*). I. Effects of applied nitrogen and symbiotic nitrogen fixation on growth and seed yield. Expl. Agric., 13:129-42, 1977.
- THIBODEAU, P.S. & JAWORSKI, E.G. Patterns of nitrogen utilization in the soybean. Planta, 127: 133-47, 1975.
- YOUNG, E.G. & CONWAY, C.F. On the estimation of allantoin by the Rimini-Schryver reaction. J. Biol. Chem., 142:839-53, 1942.