

Nodulação e fixação do dinitrogênio em soja tratada com sulfentrazone⁽¹⁾

João Silveira Arruda⁽²⁾, Nei Fernandes Lopes⁽³⁾ e Marcos Antonio Bacarin⁽⁴⁾

Resumo – Em condições de casa de vegetação, avaliou-se o efeito de doses (0, 36, 72, 108 e 144 $\mu\text{g m}^{-2}$ de i.a.) do herbicida sulfentrazone na nodulação da soja (*Glycine max* (L.) Merrill cv. BR-16) infectada com *Bradyrhizobium japonicum* estirpe SEMIA 5079, e na fixação de dinitrogênio, estimada pelos teores de ureídeos no exsudato do xilema. Foram quantificados, também, os teores de aminoácidos e nitrato no exsudato do xilema. O número e a matéria seca dos nódulos, as concentrações de aminoácidos, nitrato e ureídeos decresceram com o incremento na dose de sulfentrazone, tanto no estágio R₃ quanto no R₅ de desenvolvimento da soja.

Termos para indexação: *Bradyrhizobium japonicum*, *Glycine max*, herbicidas, rizóbio.

Nodulation and dinitrogen fixation in soybean treated with sulfentrazone

Abstract – Under greenhouse conditions, the effect of sulfentrazone rates (0, 36, 72, 108 and 144 $\mu\text{g m}^{-2}$ of a.i.) was evaluated on growth of nodules in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill cv. BR-16), inoculated with *Bradyrhizobium japonicum* strain SEMIA 5079, on dinitrogen fixation estimated by the content of ureides in xylem exsudate. The amino acids, nitrate and ureides contents in xylem exsudate were also determined. The number and dry matter of nodules, the content of amino acids, nitrate and ureides decreased as a function of increase of sulfentrazone rate at R₃ and R₅ development stages of soybean stages.

Index terms: *Bradyrhizobium japonicum*, *Glycine max*, herbicides, rhizobium.

Introdução

O uso de herbicidas é um componente importante no processo de produção da maioria das culturas; entre estas, as capazes de fixar nitrogênio. Na cultura de soja, os herbicidas são utilizados em quantidades significativas para o controle de plantas daninhas; entretanto, pouco é conhecido sobre a influência que estes produtos exercem sobre a nodulação e fixação do dinitrogênio (N₂). A fixação do N₂ na simbiose soja-rizóbio pode contribuir com mais de 70% no

requerimento de N total da cultura (Thurlow & Hiltbold, 1985; Marengo et al., 1993). Entretanto, o uso de herbicidas pode reduzir a nodulação (Deuber et al., 1981; Varela & Cruz, 1984; Mallik & Tesfai, 1985; Bollich et al., 1988). A redução na fixação de N₂, causada pelos herbicidas, pode ser devida à ação indireta no crescimento da planta, a efeitos diretos sobre o crescimento do rizóbio, ou a efeitos sobre associação planta-rizóbio.

Os produtos nitrogenados sintetizados nos nódulos são exportados rapidamente para a parte aérea do hospedeiro, via xilema, pelo fluxo da transpiração. As leguminosas mais representativas no Brasil, a soja e o feijão, quando noduladas, transportam o N proveniente da fixação biológica do N₂ principalmente na forma de N-ureídeo (alantoina e ácido alantóico). A composição da seiva do xilema de leguminosas noduladas, em termos de compostos nitrogenados, pode ser encontrada em algumas revisões e trabalhos, como os de Sprent (1984) e Atkins (1991). As análises dos compostos nitrogenados na seiva do xilema são importantes em estudos fisiológicos, mos-

⁽¹⁾ Aceito para publicação em 13 de abril de 2000.

Extraído da dissertação de mestrado apresentada pelo primeiro autor à Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS.

⁽²⁾ UFPel, Dep. de Botânica, Caixa Postal 354, CEP 96010-900 Pelotas, RS. Bolsista da CAPES. E-mail: joaoarruda@aventis.com

⁽³⁾ UFPel, Dep. de Botânica. Bolsista do CNPq.

⁽⁴⁾ UFPel, Dep. de Botânica. E-mail: bacarin@ufpel.tche.br

trando as variações metabólicas que ocorrem devido ao microsimbionte e ao hospedeiro, ou, ainda, por estresses ambientais, além de outros fatores (Hungria et al., 1985a, 1985b, 1989; Hungria & Neves, 1986a, 1986b, 1986c; Hungria & Franco, 1988, 1993; Thomas & Hungria, 1988).

Também tem sido sugerido que análise dos compostos nitrogenados da seiva do xilema, tanto em condições de campo como em casa de vegetação, pode ser utilizada para a quantificação da fixação biológica de N_2 . Isso foi proposto para as leguminosas que transportam ureídeos, pois em diversos experimentos foi encontrada uma correlação positiva e significativa entre concentração de ureídeos na seiva do xilema e as estimativas do N_2 proveniente da fixação obtidas pelas técnicas de redução do acetileno, diluição isotópica de ^{15}N e acúmulo de N total nos tecidos (Herridge, 1982, 1984; Berkum et al., 1985; Hungria et al., 1985a; Hungria & Neves, 1986b).

O sulfentrazone faz parte do grupo das aril-triazolinonas, cujo nome químico é N-[2,4-dicloro-5-[4-(difluorometil)-4,5-dihidro-3-metil-5-oxo-1H-1,2,4-triazol-1-yl]-fenil] metanossulfonamida. O mecanismo de ação do sulfentrazone nas plantas invasoras está relacionado com a inibição da enzima protoporfirinogênio oxidase (Protox) (Nandihalli & Duke, 1993). Sua translocação ocorre com pequena movimentação pelo floema, pelo fato de ocorrer rápida dessecação foliar. Apresenta ação de pré-emergência, recomendado para as culturas de soja e cana-de-açúcar (Rodrigues & Almeida, 1998).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de doses de sulfentrazone sobre a nodulação e fixação do N_2 na cultivar BR-16, infectada com a estirpe de rizóbio SEMIA 5079.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, localizada em Pelotas, RS, no período de janeiro a março de 1998. Sementes de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] cv. BR-16 foram semeadas em vasos de plástico com capacidade de cinco litros, contendo substrato com composição física de 149, 430 e 421 g kg^{-1} de argila, areia e silte respectivamente, e 4,4 g kg^{-1} de matéria orgânica. O substrato apresentou 18% de retenção de água na capacidade de campo ($\psi_w \approx -0,03$ MPa), sendo mantido próximo a esse regime hídrico, por irrigações diárias, ao longo do período experimental.

O substrato foi previamente esterilizado, aplicando-se $15 \times 10^{-5} m^3$ de brometo de metila por m^3 de substrato, por um período de dez dias, e correção química com 400 mg de P (superfosfato simples) e 80 mg de K (cloreto de potássio) por quilo de substrato. O pH foi corrigido para 6, que favorece o desenvolvimento da simbiose rizóbio-planta. A correção foi realizada mediante a tabela de interpretação de análises de solo adotada pela Rede Oficial de Laboratórios dos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (Rolas, 1995).

A semeadura foi realizada em 25 de janeiro de 1998, na densidade de cinco sementes por vaso. Quinze dias após a semeadura (DAS), foi feito o desbaste, deixando-se uma plântula por vaso. No momento da semeadura o substrato foi infectado com uma concentração de $1,8 \times 10^7$ UFC mL^{-1} da estirpe de rizóbio SEMIA 5079, sendo colocados 900 mL por vaso. Após a semeadura, foi aplicado o herbicida sulfentrazone nos vasos, com pulverizador de pressão constante (200 kPa), calibrado para vazão de 300 L ha^{-1} .

O experimento teve delineamento inteiramente casualizado, no esquema fatorial (5×2), sendo cinco doses de sulfentrazone e duas épocas de coleta, com quatro repetições. As doses utilizadas de sulfentrazone foram 0, 36, 72, 108 e 144 $\mu g m^{-2}$ de i.a.; a terceira dose é a recomendada. A primeira coleta foi realizada no estágio R_3 (58 dias após a semeadura), e a segunda, em R_5 (65 dias após a semeadura) da escala diferencial de crescimento da soja proposta por Fehr et al. (1971). A parte aérea das plantas foi seccionada rente ao substrato, deixando-se o pedaço de caule unido ao sistema radical, para acoplar um tubo de látex cilíndrico com 25 mm de comprimento, que serviu para armazenar o exsudato translocado das raízes via xilema. A coleta de exsudato foi realizada com auxílio de micropipeta automática, entre as 10h e as 12h30. As amostras foram colocadas em frascos de vidro à temperatura de $0^\circ C$, e, posteriormente, armazenadas em congelador, a $-15^\circ C$, até o momento das análises.

Os teores de nitrato, aminoácidos e ureídeos no exsudato do xilema foram quantificados, segundo Cataldo et al. (1974), por reação de ninhidrina (Herridge, 1984; Peoples et al., 1989) e reação colorimétrica (Young & Conway, 1942), respectivamente. Uma mistura equimolar de glicina, glutamina, fenilalanina e arginina foi usada como padrão na determinação dos aminoácidos.

Os resultados foram submetidos a análise de variância e aplicados testes de Duncan ($P \leq 0,05$). Foram realizadas também análises de regressão, para obter a equação matemática que melhor se ajustasse aos dados experimentais. Também foram estimadas as doses que inibiram 50% dos compostos do exsudato do xilema e do número e matéria seca dos nódulos (I_{50}).

Resultados e Discussão

A matéria seca dos nódulos (Wn) das raízes de soja foi afetada negativamente pelo sulfentrazone, e ocorreu uma diminuição significativa em razão do incremento de doses do herbicida, tanto no estágio de crescimento R₃ quanto no R₅ (Tabela 1). Comparando Wn das plantas controle, cujos valores foram de 252 e 480 mg planta⁻¹, com as tratadas com sulfentrazone na dose de 72 µg m⁻² de i.a., com 112 e 120 mg planta⁻¹, nos estádios R₃ e R₅, respectivamente, constatou-se uma redução em Wn de 55,5% em R₃ e de 75,0% em R₅.

O número de nódulos (Nn) das raízes de soja foi influenciado negativamente pelo herbicida sulfentrazone, e ocorreu redução significativa em razão do aumento de doses do herbicida, nos estádios de crescimento R₃ e R₅ (Tabela 1). Quando comparado Nn das plantas controle, cujos valores foram 67 em R₃ e 92 em R₅, com as plantas tratadas com sulfentrazone na dose de 72 µg i.a. m⁻², com Nn de 45 e 16 nódulos planta⁻¹, verificou-se que houve uma redução de 33,0% em R₃ e 82,6% em R₅. Provavelmente, essas reduções em Wn e Nn ocorreram de forma indireta, causadas pelo herbicida, acarretando menor produção e menor quantidade de fotoassimilados translocados e alocados aos nódulos, pois o fornecimento de fotoassimilados é essencial a sua formação e manutenção da atividade da enzima nitrogenase nos nódulos (Wong & Evans, 1971).

Os resultados mostraram que houve tendências de reduções em Wn e Nn, em razão de doses de

sulfentrazone, tanto no estágio R₃ quanto no R₅. Resultados semelhantes foram obtidos por Marengo et al. (1993) com os herbicidas clorimuron e trifluralina em soja.

Os teores de aminoácidos no exsudato do xilema decresceram com o aumento na dose do herbicida sulfentrazone, apresentando comportamento diferenciado em ambos os estádios de crescimento (Figura 1). No estágio R₃ a redução mais drástica ocorreu a partir da dose de 36 µg m⁻² de i.a., enquanto no estágio R₅ os teores de aminoácidos no exsudato foram praticamente constantes até a dose de 72 µg m⁻² de i.a., recomendada para a cultura da soja no campo, e ocorreu queda acentuada no teor de aminoácidos em doses mais elevadas.

As doses que inibiram 50% da concentração de aminoácidos nos vasos do xilema (I₅₀) foram de 50,0 e 93,0 µg m⁻² de i.a., aos 58 e 65 DAS, respectivamente. A dose que produziu o I₅₀ na concentração de aminoácidos ficou abaixo da recomendada no estágio R₃ e acima em R₅, e esta ficou bem próxima da recomendada.

A redução na concentração de nitrato foi diferente em relação aos estádios de crescimento das plantas de soja (Figura 2). Houve redução acentuada na concentração de nitrato com o aumento na dose de

Tabela 1. Número e matéria seca de nódulos nos estádios R₃ (58 dias após a semeadura) e R₅ (65 dias após a semeadura) das plantas de soja em razão de doses do herbicida sulfentrazone⁽¹⁾.

| Dose (µg m ⁻² de i.a.) | Número de nódulos por planta | | Matéria seca de nódulos (mg planta ⁻¹) | |
|--------------------------------------|---------------------------------|----------------|---|----------------|
| | R ₃ | R ₅ | R ₃ | R ₅ |
| 0 | 67a | 92a | 252a | 480a |
| 36 | 48ab | 28b | 139ab | 195b |
| 72 | 45ab | 16b | 112ab | 120b |
| 108 | 21bc | 15b | 40b | 60c |
| 144 | 6c | 11b | 2c | 40c |

⁽¹⁾Em cada coluna, médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si a 5% de probabilidade, pelo teste de Duncan.

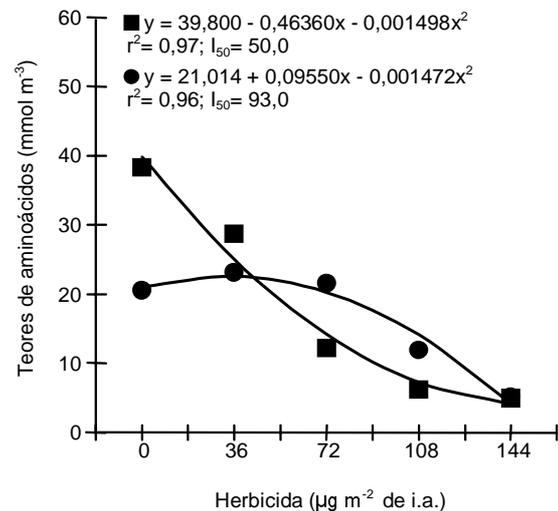


Figura 1. Efeito de doses do herbicida sulfentrazone nos teores de aminoácidos no exsudato de plantas de soja nos estádios R₃ (■) e R₅ (●).

sulfentrazone, tanto aos 58 (R₃) quanto aos 65 DAS (R₅), quando comparada com as concentrações de nitrato das plantas controle. As doses que inibiram 50% na concentração de nitrato na seiva dos vasos do xilema (I₅₀) foram de 24,0 e 59,5 $\mu\text{g m}^{-2}$ de i.a., aos 58 e 65 DAS, respectivamente, sendo menores do que a dose recomendada para a cultura da soja.

No estágio R₅ a quantidade de aminoácidos nas plantas controle foi quatro vezes maior que a concentração de nitrato. Provavelmente, parte do decréscimo de nitrato foi devido à própria redução do nitrato a amônia, que pode ter ocorrido no sistema radicular das plantas de soja, pelas enzimas nitrato e nitrito redutase, utilizando agentes redutores provenientes da respiração, e incorporando-a em ácidos orgânicos ou aminoácidos por meio de transaminases ou aminotransferases dentro do próprio nódulo. Plantas de soja com baixo número de nódulos e não-noduladas transportam N na forma de asparagina e glutamina (Streeter, 1977; Pate et al., 1980), reduzindo a concentração de nitrato na seiva do xilema, mascarando a quantidade real de nitrato absorvido pelas raízes da soja.

A concentração de ureídeos na seiva do xilema decresceu significativamente em razão do incremento de doses do herbicida, em ambos os estádios de crescimento R₃ e R₅ (Figura 3). No estágio R₃, a con-

centração de ureídeos foi praticamente a metade do que da verificada em R₅ nas plantas controle analisadas. As doses que inibiram 50% da concentração de ureídeos no exsudato dos vasos do xilema das plantas de soja (I₅₀) foram de 112 e 84 $\mu\text{g m}^{-2}$ de i.a., aos 58 e 65 DAS, respectivamente. Verifica-se que a dose de 84 $\mu\text{g m}^{-2}$ de i.a., aos 65 DAS, ficou bastante próxima da recomendada. A alta concentração de ureídeos encontrada no estágio R₅ está de acordo com os resultados obtidos na fase reprodutiva da soja por McClure & Israel (1979) e Herridge et al. (1990). O aumento do N₂ fixado durante os estádios reprodutivos pode estar influenciado por estímulos hormonais pelo surgimento dos botões florais (Peat et al., 1981).

A redução na matéria seca e no número de nódulos, nas concentrações de aminoácidos, nitratos e ureídeos causados pela herbicida sulfentrazone foi similar aos efeitos negativos dos herbicidas clorimuron e trifluralina, que causaram redução na nodulação e fixação de N (Marenco et al., 1993). Por outro lado, esses mesmos autores, constataram que o clomazone não influenciou Wn, mas estimulou o aumento do número de nódulos e também causou redução na fixação de N.

As reduções nos teores de ureídeos, aminoácidos e nitratos estão intimamente relacionadas com efei-

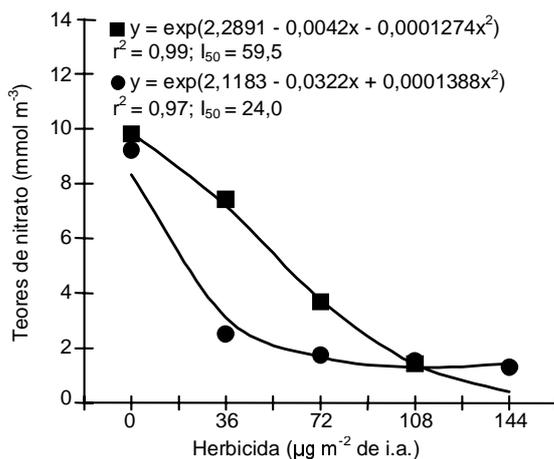


Figura 2. Efeito de doses do herbicida sulfentrazone nos teores de nitrato no exsudato de plantas de soja nos estádios R₃ (■) e R₅ (●).

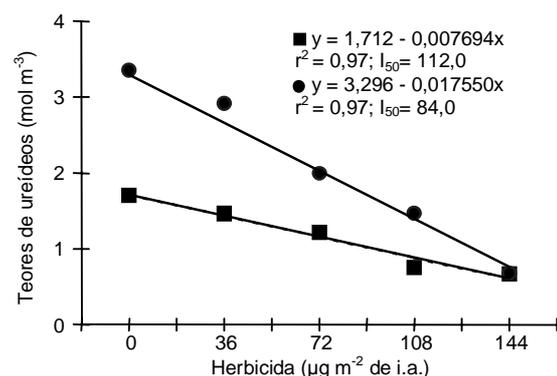


Figura 3. Efeito de doses do herbicida sulfentrazone nos teores de ureídeos no exsudato de plantas de soja nos estádios R₃ (■) e R₅ (●).

tos indiretos causados pelo herbicida nos diversos órgãos da planta, pois o sulfentrazone acarretou diminuição no tamanho do aparelho assimilatório, reduzindo as matérias secas da parte aérea e raízes (Arruda, 1998).

Conclusão

O sulfentrazone reduz tanto a formação de nódulos quanto a fixação do N₂, e esses efeitos são acentuados com o aumento das doses do herbicida.

Referências

- ARRUDA, J. S. **Efeito de herbicidas em estirpes de *Bradyrhizobium japonicum*, na fixação de dinitrogênio e no crescimento de *Glycine max* (L.) Merrill cv. BR-16.** Pelotas : UFPel, 1998. 55 p. Dissertação de Mestrado.
- ATKINS, C. A. Ammonia assimilation and export nitrogen from the legume nodule. In: DILWORTH, M. J.; GLENN, A. R. (Ed.). **Biology and biochemistry of nitrogen fixation.** Amsterdam : Elsevier, 1991. p. 293-319.
- BERKUM, P. van; SLOGER, C.; WEBER, D. F.; CREGAN, P. B.; KEYSER, H. H. Relationship between ureide N and N₂ fixation, aboveground N accumulation, acetylene reduction, and nodule mass in greenhouse and field studies with *Glycines max* L. (Merr.). **Plant Physiology**, Rockville, v. 77, n. 1, p. 53-58, 1985.
- BOLLICH, P. K.; DUNIGAN, E. P.; KITCHEN, L. M.; TAYLOR, V. The influence of trifluralin and pendimethalin on nodulation, N₂ (C₂H₂) fixation, and seed yield of field grown soybeans (*Glycine max*). **Weed Science**, Urbana, v. 36, p. 15-19, 1988.
- CATALDO, D. A.; SCHRADER, L. E.; YOUNGS, V. L. Analysis by digestion and colorimetric assay of total nitrogen in plant tissues high in nitrate. **Crop Science**, Madison, v. 14, n. 6, p. 854-856, 1974.
- DEUBER, R.; CAMARGO, P. N.; SIGNORI, L. H. Efeitos de herbicidas e populações de plantas na nodulação e produção de soja (*Glycine max* L.) Merrill, Santa Rosa. **Planta Daninha**, Botucatu, v. 4, p. 97-109, 1981.
- FEHR, W. R.; CAVINESS, C. E.; BURMOOD, D. T.; PEENINGTON, J. S. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merril. **Crop Science**, Madison, v. 11, n. 6, p. 929-931, 1971.
- HERRIDGE, D. F. Effect of nitrate and plant development on the abundance of nitrogenous solutes in root-bleeding and vacuum-extracted exudates of soybean. **Crop Science**, Madison, v. 24, n. 1, p. 173-179, 1984.
- HERRIDGE, D. F. Use of the ureide technique to describe the nitrogen economy of fields-grown soybeans. **Plant Physiology**, Rockville, v. 70, n. 1, p. 7-11, 1982.
- HERRIDGE, D. F.; BERGERSEN, F. J.; PEOPLES, M. B. Measurement of nitrogen fixation by soybean in the field using the ureide and natural ¹⁵N abundance methods. **Plant Physiology**, Rockville, v. 93, n. 2, p. 708-716, 1990.
- HUNGRIA, M.; FRANCO, A. A. Effects of high temperatures on nodulation and N₂ fixation by *Phaseolus vulgaris* L. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 149, n. 1, p. 95-102, 1993.
- HUNGRIA, M.; FRANCO, A. A. Nodule senescence in *Phaseolus vulgaris*. **Tropical Agriculture**, St. Augustine, v. 65, n. 3, p. 341-346, 1988.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M. C. P. Efeito da manipulação de fotossintatos na fixação biológica de nitrogênio em feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 1, p. 9-24, jan. 1986a.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M. C. P. Interações entre cultivares de *Phaseolus vulgaris* e estirpes de *Rhizobium* na fixação e transporte de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 2, p. 127-140, fev. 1986b.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M. C. P. Ontogenia da fixação biológica do nitrogênio em *Phaseolus vulgaris*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 21, n. 7, p. 715-730, jul. 1986c.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M. C. P.; DÖBEREINER, J. Relative efficiency, ureide transport and harvest index in soybeans inoculated with isogenic HUP mutants of *Bradyrhizobium japonicum*. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 7, n. 3, p. 325-329, 1989.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M. C. P.; VICTORIA, R. L. Assimilação do nitrogênio pelo feijoeiro. I. Atividade da nitrogenase, da nitrato redutase e transporte do nitrogênio na seiva do xilema. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 9, n. 3, p. 193-200, 1985a.
- HUNGRIA, M.; NEVES, M. C. P.; VICTORIA, R. L. Assimilação do nitrogênio pelo feijoeiro. II. Absorção e translocação do N mineral e do N₂ fixado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 9, n. 3, p. 201-209, 1985b.

- McCLURE, P. R.; ISRAEL, D. W. Transport of nitrogen in the xylem of soybeans plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 64, n. 3, p. 411-416, 1979.
- MALLIK, M. A. B.; TESFAI, K. Pesticidal effect on soybean-rhizobia symbiosis. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 85, n. 1, p. 33-41, 1985.
- MARENCO, R. A.; LOPES, N. F.; MOSQUIM, P. R. Nodulation and nitrogen fixation in soybeans treated with herbicides. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 5, n. 2, p. 121-126, 1993.
- NANDIHALLI, U. B.; DUKE, S. O. The porphyrin pathway as a herbicide target site. In: DUKE, S. O.; MENN, J. J.; PLIMMER, J. R. (Ed.). **Pest control with enhanced environmental safety**. Washington : American Chemical Society, 1993. p. 62-72. (American Chemical Society Symposium Series, 524).
- PATE, J. S.; ATKINS, C. A.; WHITE, S. T.; RAINBIRD, R. M.; WOO, K. C. Nitrogen and xylem transport of nitrogen in ureide-producing grain legumes. **Plant Physiology**, Rockville, v. 65, n. 3, p. 961-965, 1980.
- PEAT, J. R.; MINCHIN, F. R.; JEFFCOAT, B.; SUMMERFIELD, R. J. Young reproductive structures promote nitrogen fixation in soybean. **Annals of Botany**, London, v. 48, n. 2, p. 177-182, 1981.
- PEOPLES, M. B.; FAIZAH, A. W.; RERKASEN, B.; HERRIDGE, D. F. **Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field**. Canberra : Australian Centre for International Agricultural Research, 1989. p. 76 (ACIAR. Monography, 11).
- RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. 4. ed. Londrina : IAPAR, 1998. 648 p.
- ROLAS. **Recomendação de adubação e de calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina**. 3. ed. Passo Fundo : Comissão de Fertilidade do Solo-RS/SC, 1995. 223 p.
- SPRENT, J. I. **The biology of nitrogen-fixing organisms**. London : McGraw-Hill, 1984. 196 p.
- STREETER, J. G. Asparaginase and asparagine transaminase in soybean leaves and root nodules. **Plant Physiology**, Rockville, v. 60, n. 2, p. 235-239, 1977.
- THOMAS, R.; HUNGRIA, M. Effects of potassium on nitrogen fixation, nitrogen transport and nitrogen harvest index of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 11, n. 2, p. 175-188, 1988.
- THURLOW, D. L.; HILTBOLD, A. E. Dinitrogen fixation by soybeans in Alabama. **Agronomy Journal**, Madison, v. 77, n. 3, p. 432-436, 1985.
- VARELA, R.; CRUZ, R. Efecto de algunas dinitroanilinas sobre la nodulación de la soya (*Glycine max* (L.) Merr.). **Revista del Instituto Colombiano Agropecuario**, Bogota, v. 19, n. 1, p. 17-23, 1984.
- WONG, P. P.; EVANS, H. J. Poly- β -hydroxybutyrate utilization by soybean (*Glycine max* Merr.) nodules and assessment of its role in maintenance of nitrogenase activity. **Plant Physiology**, Rockville, v. 47, n. 6, p. 750-755, 1971.
- YOUNG, E. G.; CONWAY, C. F. On the estimation of allantoin by the Rimini-Schryver reaction. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 142, n. 4, p. 839-853, 1942.