RELAÇÃO DAS ATIVIDADES DE FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASE E
GLUTAMINA SINTETASE COM A FIXAÇÃO SIMBIÓTICA DE N₂ EM
FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.) E CAUPI (*Vigna
unguiculata walp* L.)

JOSE LUIS CONTADO

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", pela Universidade de
São Paulo, para obtenção do
título Mestre em Agronomia, área
de concentração : Microbiologia
Agrícola

Estado de São Paulo - Brasil
outubro-1990

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

Contado, Jose Luis

C759r Relação das atividades de fosfoenolpiruvato carboxilase e
glutamina sintetase com a fixação simbiótica de N₂ em feijoei
ro (Phaseolus vulgaris L.) e caupi (Vigna unguiculata walp L.).
Piracicaba, 1990.
75p.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Caupi - Nodulação - Atividade enzimica 2. Enzima em
caupi 3. Enzima em feijão 4. Feijão - Nodulação - Ativida-
de enzimica 5. Nitrogênio em caupi - Fixação 6. Nitrogênio
em feijão I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz,
Piracicaba

CDD 635.652

RELACÃO DAS ATIVIDADES DE FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASE E
GLUTAMINA SINTETASE COM A FIXAÇÃO SIMBIÓTICA DE N₂ EM
FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.) E CAUPI (*Vigna
unguiculata* walp L.)

JOSE LUIS CONTADO

Ciências Biológicas

orientador: Prof. Dr. Joaquim Albenísio Gomes da Silveira

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", pela Universidade de
São Paulo, para obtenção do
título Mestre em Agronomia, área
de concentração : Microbiologia
Agrícola

Estado de São Paulo - Brasil

outubro-1990

RELAÇÃO DAS ATIVIDADES DE FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASE E
GLUTAMINA SINTETASE COM A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE N_2 EM
FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.) E CAUPI (*Vigna*
unguiculata L.)

José Luís Contado

aprovada em 06/12/90

Comissão examinadora:

Prof. Dr. Joaquim Albeniseo G. da Silveira

CENA/USP

Prof. Dr. Alvaro A. T. Vargas

CENA/USP

Prof. Dra. Elke J. B.N. Cardoso

ESALQ/USP

p/ Prof. Joaquim Albeniseo G. da Silveira

-orientador-

LUIZ G. DO PRADO FILHO

Uma pesquisa científica não se realiza num vácuo intelectual, mas se processa num contexto. Observar por observar, experimentar por experimentar, pode ser interessante, mas é atividade de pequena serventia. Quando se observa ou se experimenta, quando se investiga, há uma idéia que norteia a pesquisa.

ABRAHAM KAPLAN

dedico

aos meus pais

Euclydes e Angela

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de alguma forma, colaboraram na execução deste trabalho. Em especial:

- ao Prof. Dr. Joaquim Albenisio G. da Silveira, pela orientação e formação científica;
- ao Drs. Siu Mui Tsay e Alvaro Vargas, pelas orientações no trabalho de pesquisa e utilização do laboratório de Microbiologia do Solo do CENA;
- ao Prof. Dr. Murilo Melo, pela amizade e orientações durante o curso de mestrado.
- Ao colega de pós-graduação Jorge Luiz Mazza Rodrigues pelo grande apoio na conduta da pesquisa;
- aos professores do curso de Pós-Graduação, pela formação acadêmica;
- aos colegas de pós-graduação do CENA e ESALQ, Vitor, João Carlos, Oscar, Thereze, Jeanette, Sandra, Fernando e Leonardo pelo companheirismo;
- aos colegas do laboratório de Bioquímica de plantas, Dorelli, Marli, Malu, Vânia, Maili, Valesca, Henriqueta, Cidinha e João Salvador.
- ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, pelo desenvolvimento do trabalho, em especial à Seção de Bioquímica de Plantas;
- à CAPES pela concessão da bolsa.

SUMARIO

	página
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES	xi
RESUMO	xii
SUMMARY	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Atividade da enzima nitrogenase e a FBN	5
2.2. Atividade da enzima PEPCase e a FBN	7
2.3. Atividade da enzima GS e a FBN	10
2.4. Correlação entre as enzimas PEPCase, GS e a FBN	13
3. MATERIAL E METODOS	15
3.1. Condições do experimento	15
3.2. Condições das plantas	15
3.3. Substrato nitritivo	16
3.4. delineamento experimental	18
3.5. Amostragens e prepara das amostras	18
3.6. Obtenção dos extratos brutos (livres de células)	19
3.6.1. Determinação da atividade de PEPCase	19
3.6.2. Determinação da atividade de GS	19
3.7. Determinação da atividade de PEPCase	19
3.8. Determinação da atividade de GS	20
3.9. Determinação da atividade da nitrogenase	21
3.10. Determinação do teor de N-total (%N)	22
4. RESULTADOS	23
4.1. Desenvolvimento dos nódulos	23
4.1.1. Número de nódulos por plantas	23
4.1.2. Massa fresca de nódulos por planta	26
4.1.3. Peso médio dos nódulos	26

	página
4.2. Atividade da nitrogenase	28
4.3. Atividade de PEPcarboxilase	31
4.4. Atividade de glutamina sintetase	33
4.5. Conteúdo de N na planta	37
4.6. Acúmulo de fitomassa	42
5. DISCUSSÃO	49
5. CONCLUSÕES	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
7. APÊNDICE	64

LISTA DE FIGURAS

figura	página
1. Número e peso da matéria fresca de nódulos em raízes de Negro Argel	24
2. Número e peso da matéria fresca de nódulos em raízes de Caupi	25
3. Peso médio de nódulos de Negro Argel e de Caupi	27
4. Atividade da enzima nitrogenase em nódulos de Negro Argel	29
5. Atividade da enzima nitrogenase em nódulos de Caupi	30
6. Atividade da enzima PEPcase em nódulos de Negro Argel	32
7. Atividade da enzima PEPcase em nódulos de Caupi	34
8. Atividade da enzima GS em nódulos de Negro Argel	35
9. Atividade da enzima GS em nódulos de Caupi	36
10. Conteúdo de N em raiz, caule+folha e vagem em Negro Argel	38
11. Acúmulo de N em plantas inoculadas e controle, aos 65 D.A.E., em Negro Argel	39
12. Conteúdo de N em raiz, caule+folha e vagem em caupi	40
13. Acúmulo de N em plantas inoculadas e controle, aos 88 D.A.E., em Caupi	41
14. Acúmulo de fitomassa em raiz, caule+folha e vagem em Negro Argel	43
15. Acúmulo de fitomassa em plantas inoculadas e controle, aos 65 D.A.E., em Negro Argel	44
16. Acúmulo total de fitomassa e nitrogênio em Negro Argel	45
17. Acúmulo de fitomassa em raiz, caule+folha e vagem em Caupi	46

figura	página
18. Acúmulo de fitomassa em plantas inoculadas e controle, aos 88 D.A.E., em Caupi	47
19. Acúmulo total de fitomassa e de nitrogênio em Caupi	48
20. Correlação entre nitrogenase e PEPCase	50
21. Correlação entre nitrogenase e GS	

LISTA DE TABELAS

tabela	página
1. Composição da solução nutritiva utilizada pelas cultivares Negro Argel e Caupi	17

LISTA DE ABREVIATURAS

abreviatura	significado
DAG	dias após a emergência
AP	atividade enzimática por planta
AGN	atividade enzimática por grama de nódulo
NN	número de nódulos
PN	peso de nódulos
MS	matéria seca
MF	matéria fresca
CN	conteúdo de nitrogênio
F	florescimento
PEPcase	enzima fosofenolpiruvato carboxilase
GS	enzima glutamina sintetase
GDH	enzima glutamato desidrogenase
GOGAT	enzima glutamato sintase

RELAÇÃO ENTE AS ATIVIDADES DE FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASE, GLUTAMINA SINTETASE E A FIXAÇÃO BIOLÓGICA DE NITROGÊNIO, DURANTE A ONTOGÊNESE DE PLANTAS NODULADAS DE FEIJOERIO (*Phaseolus vulgaris* L.) E DE CAUPI (*Vigna unguiculata* walp L.)

Autor: JOSÉ LUIS CONTADO

Orientador: PROF. Dr. JOAQUIM ALBENISIO G. DA SILVEIRA

RESUMO

Com o objetivo de estudar relações entre as atividades das enzimas fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPcase), glutamina sintetase (GS), em nódulos, e a fixação biológica de nitrogênio, durante a ontogênese de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) e de caupi (*Vigna unguiculata* walp L.), foi realizado um experimento utilizando a simbiose *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli*/Negro Argel e *Bradyrhizobium* sp./Vigna. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação, em substrato sílica+vermiculita (1:1) e irrigadas com solução nutritiva isenta de N-mineral. Foram realizadas 10 amostragens destrutivas das plantas durante o ciclo de desenvolvimento das duas cultivares. Os parâmetros analisados em ambos simbioses, foram: atividade das enzimas PEPcase, GS e nitrogenase nos nódulos; peso da matéria fresca e número de nódulos; conteúdo de nitrogênio e de matéria seca nas raízes, caule+folha e vagens. De uma maneira geral, as atividades das enzimas PEPcase e GS correlacionaram-se positivamente com a da nitrogenase e com a fixação

simbiótica do nitrogênio (N_2), através do peso da matéria fresca dos nódulos e do conteúdo de N total na planta. Em Negro Argei, as atividades das enzimas PEPcase, GS e nitrogenase apresentaram dois picos nas fases de florescimento e de enchimento médio das vagens durante toda a ontogênese, enquanto que, Caupi apresentou somente um pico na fase de enchimento das vagens. Os dados relatados neste experimento sugerem que a eficiência no processo de fixação de N_2 depende, não somente da redução do N_2 (enzima nitrogenase), mas também da recuperação do carbono evoluído (através de PEPcase) e da assimilação do nitrogênio fixado (através de GS).

RELATIONSHIP BETWEEN PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE AND
GLUTAMINE SYNTHETASE ACTIVITY AND BIOLOGICAL NITROGEN
FIXATION, DURING ONTOGENESIS OF NODULATED BEAN (*Phaseolus*
vulgaris L.) AND COWPEA (*Vigna unguiculata* Walp L.) PLANTS

Author: JOSÉ LUIS CONTADO

Adviser: Dr. JOAQUIM ALBENISIO G. DA SILVEIRA

SUMMARY

The aim of this work to study the relationship between the activity of the enzymes phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPcase) and glutamine synthetase (GS) with biological nitrogen fixation, in nodules, during the ontogenesis of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and Cowpea (*Vigna unguiculata* Walp L.) plants. A greenhouse experiment was carried out using the symbiosis *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* (CIAT-899)/Negro Argel and *Bradyrhizobium* sp. (CB-756)/Cowpea symbiosis. Plants were grown on a 1:1 silica/vermiculite substrate and were watered with a nutrient solution without mineral-N. Ten samples of plants were taken during the growth cycle of both leguminous plants. The parameters analyzed in both cases were: activity of the enzymes PEPcase, GS and nitrogenase; number and fresh weight of nodules; nitrogen content and dry weight of roots, stalk+leaves and pods. In general, the activities of the enzymes PEPcase and GS were positively correlated with that of nitrogenase and nitrogen fixation, as nodule fresh weight had plant nitrogen content. In Negro

Argel, the activities of PEPcase, GS and nitrogenase apresented two peaks during its entrie onthogenesis, one just before flowering and another during the mid pod filling stage. Cowpea, however, presented only one peak during "pre-flowering". The data reported in this experiment shows that the of N_2 fixation process depends not only on the reduction of N_2 (nitrogenase enzyme), but also on the assimilation of envolved carbon (PEPcase) and nitrogen which had been fixed (GS).

1. INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) representa a principal fonte proteica para grande parte da população do Brasil. Porém, a cultura possui uma produtividade muito baixa (aproximadamente 700 Kg/ha), devido a existência de vários fatores limitantes atuando durante o seu ciclo (TEIXEIRA, 1977).

O Caupi (*Vigna unguiculata* walp), por outro lado, é uma cultura importante no norte e nordeste, mostrando boa adaptação para as condições de temperaturas elevadas e estresse de água, sendo um substituto para o feijão tradicional, que normalmente não se desenvolve bem nessas regiões devido as condições adversas de solo e de clima.

A capacidade desses dois gêneros utilizarem o N_2 como fonte de nitrogênio, através da simbiose com bactérias dos gêneros *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, faz com que possa ocorrer uma diminuição no custo de produção, além de evitar a poluição nos lençóis freáticos causadas pelos fertilizantes nitrogenados em excesso. A variabilidade genética existente entre e dentro dos simbiontes afetam diretamente na eficiência do processo.

O conhecimento da fisiologia dos nódulos, através do entendimento dos principais processos bioquímicos, é indispensável a qualquer programa de

melhoramento genético de leguminosas que vise aumentar a sua produtividade

Das nodulinas que se relacionam com a eficiência da fixação biológica do nitrogênio, duas enzimas tem sido destacadas ultimamente: fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPcase) [E.C. 4.1.1.31] e glutamina sintetase (GS) [E.C. 6.3.1.2], reponsáveis pela fixação do CO_2 "no escuro" e pela assimilação do nitrogênio fixado, respectivamente.

Este trabalho tem como objetivo relacionar as atividades das enzimas PEPcase e GS com a fixação biológica do nitrogênio, durante a ontogênese de plantas noduladas de feijoeiro e Caupi.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O nitrogênio é um constituinte essencial para muitos tipos de moléculas orgânicas, sendo requerido em grandes quantidades na produção de proteínas (HUNGRIA & NEVES, 1986-a). É um dos elementos mais abundantes na Terra; porém é na forma de N_2 (praticamente inerte quimicamente) que ele é mais encontrado, ocupando cerca de 78 a 80% da atmosfera (MALAVOLTA, 1980).

A fixação biológica do nitrogênio (FBN) poderá ser utilizada cada vez mais na cultura do feijoeiro, semelhante ao que ocorre com soja no Brasil, com significativas reduções nos custos de produção, além de contribuir para reduções no consumo de fertilizantes nitrogenados, os quais consomem grandes quantidades de energia não renovável, além de poluir lençóis freáticos quando utilizados intensamente.

De todas as associações simbióticas existentes entre microrganismos e plantas, aquela que envolve a família *Rhizobiaceae* e leguminosas torna-se uma das mais importante (HUNGRIA & NEVES, 1986-a). Uma das características principais consiste no fato de se associarem com a maioria das leguminosas (vegetal de grande valor nutritivo por ter alto teor de proteínas), e por ser uma simbiose altamente eficiente.

Os genótipos da planta e/ou da bactéria podem controlar a FBN (NUTMAN, 1969; HUNGRIA, 1985). Deste modo, tanto a cultivar quanto a estirpe podem afetar a eficiência da simbiose (HUNGRIA & NEVES, 1986-c), principalmente pelo fato das leguminosas possuírem uma grande variabilidade genética existente entre e dentro das espécies. Fatores que afetam a atividade das enzimas do nódulo, a infecção e o desenvolvimento do nódulo afetarão diretamente a eficiência do processo (HUNGRIA & NEVES, 1986-b).

O entendimento dos principais processos bioquímicos e fisiológicos envolvidos com a simbiose poderá permitir a melhor utilização deste sistema para uma maior produção (SCOTT et al., 1976), e conjuntamente com uma seleção genética, promover alterações visando uma maximização da FBN em feijoeiro (HUNGRIA & NEVES, 1986-c) e, conseqüentemente, da produtividade agrícola.

Três enzimas são consideradas de grande importância para a fixação biológica do nitrogênio: uma reduz o N_2 até amônia; outra fixa o CO_2 "no escuro" através dos nódulos e a terceira assimila a NH_3 em compostos orgânicos, as quais são: Nase (nitrogenase) [E.C. 1.7.9.2]; PEPcase (fosfoenolpiruvato carboxilase) [E.C. 4.1.1.31] e GS (glutamina sintetase) [E.C. 6.3.1.2], respectivamente, atuando nas seguintes reações:

As atividades dessas três enzimas estão diretamente relacionadas entre si e com a eficiência de fixação de N_2 conforme será mostrado a seguir.

3.1 Atividade da nitrogenase e a fixação Biológica de nitrogênio

Nitrogenase é a enzima mais estudada nos nódulos sendo relacionada diretamente com a eficiência da fixação. Trata-se de um complexo enzimático encontrado somente em organismos procariotos (BERINGER, 1984), formado por dois componentes não-heme: Fe-proteína e Mo-Fe-proteína, que requerem ATP, um agente redutor, um substrato reduzível, um ativador (Mg^{2+}) e um meio anaeróbico (YATES, 1980).

Consiste de uma enzima não específica, que reduz, além do nitrogênio, pelo menos dez substâncias, concomitantemente com hidrólise de ATP, dos quais o hidrogênio é o de maior importância para a fixação biológica. O hidrogênio é o segundo gás natural encontrado em maior quantidade nos nódulos. Quando reduzido, o H^+ torna o processo simbiótico menos eficiente por utilizar parte da energia para a sua própria redução (YATES, 1980).

Valores máximos da fixação do nitrogênio em *Rhizobium* X leguminosas correspondem a atividades mais elevadas de nitrogenase. Para algumas leguminosas de grãos, esse pico situar-se durante o florescimento (RIVERO & GERALDO, 1978) e para outras entre o florescimento e o período médio de enchimento de vagem (JACOB-NETO et al., 1988; HUNGRIA, 1985; HUNGRIA & NEVES, 1986-c). Em muitos casos, após esse pico, a atividade da nitrogenase começa a cair bruscamente e, conseqüentemente, a fixação biológica do nitrogênio.

Muitos autores atribuem a queda à competição por fotossintatos existentes entre os nódulos e os frutos (LAWN & BRUN, 1974; BETHENFALVAY & PHILLIPS, 1977; HERREIDGE & PATE, 1977 e HUNGRIA & NEVES, 1986-c). Dados contraditórios foram relatados por HUNGRIA & NEVES (1986-a). Após a retirada de frutos e flores, imediatamente ocorreu um aumento significativo na fixação de N_2 , porém após certo tempo houve uma queda na fixação devido à falta de fotossintatos. Essa queda da atividade da nitrogenase deve estar envolvida com fatores de senescência do nódulo e da planta.

Segundo HUNGRIA & NEVES (1986-c), a fixação de 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 de grãos. Aparentemente, ainda não se conhecem os mecanismos da regulação da fixação simbiótica de N_2 ao nível do ciclo da planta.

Qualquer diminuição na produção de fotossintatos para os nódulos, quer seja por diminuição de sua produção ou por competição, acarretará limitação de ATP e de agente redutor nos nódulos para reduzir o N_2 , diminuindo assim a atividade de nitrogenase e, conseqüentemente, uma queda no processo de fixação. Os microrganismos fixadores de nitrogênio, quando estão em vida livre, possuem uma baixa taxa de fixação comparado à dos microrganismos associados, podendo isso ser devido à limitada energia existente no seu interior (BERINGER, 1984).

Há fatores que alteram apenas a fotossíntese e que, posteriormente, poderão alterar também a fixação biológica do nitrogênio. Em alguns casos, algumas variações

poderão até aumentar a fixação do nitrogênio. Exemplos tidos com sombreamento, onde até 20-25% de sombreamento aumenta a fixação de nitrogênio por apenas abaixar a temperatura na zona radicular, pois a temperatura deixou de ser o fator limitante. A redução da energia solar pode ser compensada por um aumento na área foliar (HUNGRIA, 1986).

Durante o período máximo da fixação os nódulos podem desviar de 10 a 30% dos fotossintatos das plantas (SCHUBERT & RYLE, 1982 citado por HUNGRIA & NEVES, 1986-a; PATE & MINCHIN, 1980 citado por NEVES et al., 1981; COKER et al., 1981), e, se a simbiose não for eficiente, haverá uma redução do potencial de produção das leguminosas. Assim, um bom sistema simbiótico é aquele que utiliza mais eficientemente as fontes de carbono e de energia da planta.

3.2 Atividade da fosfoenolpiruvato carboxilase e a fixação biológica do nitrogênio

A PEPcase em nódulos tem a função de fixar o CO_2 no fosfoenolpiruvato, principalmente aquele liberado da respiração, para formar ácidos orgânicos e estes poderão reagir com a amônia produzida pela nitrogenase nos nódulos. Entretanto, pode estar também relacionada com a regulação do pH no nódulo, para que não se torne mais alcalino, ou no balanço de íons dentro dos nódulos (SMITH & RAVEN, 1979; SILVEIRA & VITORELLO, 1989; SILVEIRA, 1990).

Segundo SILVEIRA (1990), a função da "via PEP-case" está diretamente envolvida com o metabolismo oxidativo do carbono, balanço de cargas (cátion/ânion), controle do pH, armazenamento e transporte de malato e metabolismo energético. Essa via permite furar bloqueios da

glicólise, suprindo piruvato e malato para o ciclo de Krebs de forma alternativa, em condições de altos níveis de ATP e demanda elevada nas reações biossintéticas para o crescimento.

Descoberta por JACKSON & COLEMAN (1959), a PEPcase em nódulos pode ser considerada como uma via anaplerótica para conservação de carbono, operada pela célula hospedeira, sintetiza oxalacetato através da β -carboxilação do fosfoenolpiruvato. Este processo torna-se importante na recaptura e assimilação do CO_2 respirado (RAWSTHORNE et al., 1980), principalmente pelo fato de que nódulos ativos de leguminosas apresentam taxas respiratórias várias vezes maiores que as das raízes (RYLE et al., 1984).

A PEPcase está localizada em toda região nas leguminosas, porém é nos nódulos onde ela é mais ativa (PERREOT-RECHENMANN et al., 1981; SCUBERT et al., 1983; DEROCHE & CARROYOL, 1988; RODRIGUES & SILVEIRA, 1989). LAWRIE & WITEELER (1975) mostraram que a atividade da PEPcase em nódulos destacados de *Vicia faba* era 50 vezes maior que na raiz; CHRISTELLER et al. (1977) observou valores de 3 vezes mais em *Lupin*; Mc CLURE et al. (1983) de 5 vezes mais em *Ainus glutinosa* ; MILLER et al. (1987) de 6 a 12 vezes mais em alfafa.

DEROCHE & CARROYOL (1988) observaram que a PEPcase está localizada no citosol do nódulo, através da separação do bacteróide no nódulo por centrifigação, onde a atividade da enzima no bacteróide era ausente e no citosol muito elevada. CHRISTELLER et al. (1977) a encontraram predominante no bacteróide, porém quando purificada não era ativa. É estimado que a PEPcase represente de 1 a 2% das proteínas totais solúveis em nódulos ativos (VANCE & STADE, 1984; MILLER et al., 1987).

A atividade da PEPcase *in vitro* foi sempre maior que a da fixação do CO_2 *in vivo*, mesmo com alta concentração de CO_2 , donde os autores CHRISTELLER et al. (1977) concluíram que isso pode ser devido a baixa concentração do fosfoenolpiruvato no nódulo ou devido a mecanismos controladores através da relação PEPcase/piruvato quinase, que são as duas enzimas que atuam sobre a transformação de fosfoenolpiruvato na glicólise (DAVIES, 1979).

Outras enzimas de carboxilação foram descobertas em nódulos, mas elas estão em baixa atividade quando comparadas com a da PEPcase (Mc CLURE et al., 1983). A PEPcase é considerada a principal via de fixação de CO_2 em nódulos, principalmente por poder fixar até 25% do carbono utilizado pela respiração (VANCE et al., 1983; VANCE & STADE, 1984; KING et al., 1986).

A fixação não fotossintética de CO_2 através da PEPcase nos nódulos poderá contribuir com uma economia de cerca de 10 a 15% do total da fotossíntese da planta (PATE & MINHIN, 1980 citado por NEVES et al., 1981). Acredita-se que as leguminosas mais "eficientes" no uso de C, como *Lupinus* e *Vigna*, possam apresentar um sistema mais eficiente de fixação de CO_2 (PATE, 1981).

Segundo MARYAMA et al. (1966) e COOMBS et al. (1975), a PEPcase reage com HCO_3^- em vez de CO_2 , sugerindo a função da anidrase carbônica, que converte o CO_2 a HCO_3^- , encontrada em *Glycine max*, *Vicia faba*, *Phaseolus* e *Pisum spp* (ATKINS, 1974). Altos níveis de anidrase carbônica não parecem ser necessários para facilitar o transporte do CO_2 para dentro do nódulos, onde, por causa da alta taxa de respiração, a concentração

interna de CO_2 também é alta, proporcionando assim que o CO_2 fixado seja proveniente quase que totalmente da respiração (CHRISTELLER et al., 1977).

Em nódulos de leguminosas e tecidos não fotossintético de outras plantas, a PEPcase tem importante função na produção de ácidos orgânicos, que serão utilizados na síntese dos aminoácidos aspartato, glutamato, asparagina, glutamina e citrulina (WHEEK, 1978; Mc CLURE et al., 1983), evitando assim um grande consumo dos ácidos do ciclo de Krebs para assimilação da amônia (CHRISTELLER et al., 1977), funcionando como uma via anaplerótica para manter o nível de intermediários do ciclo de Krebs (Mc CLURE et al., 1983).

3.3 Atividade da glutamina sintetase e a fixação biológica do nitrogênio

A amônia é o primeiro composto estável da fixação biológica do nitrogênio (HURZ et al., 1975; RAWSTHORNE et al., 1980), produzida no bacteróide e excretada para o citosol onde é rapidamente assimilada por ser altamente tóxica podendo induzir clorose e inibir a respiração no nódulo (MIFLIN & LEA, 1976).

Até o presente momento, foram identificadas, no interior dos nódulos, cinco enzimas principais que assimilam a amônia livre: glutamina sintetase (GS); glutamato sintase (GOGAT); glutamato desidrogenase (GDH); aspartato aminotransferase(AAT) e asparagina sintetase(AS).

Em experimento comparando a atividade das enzimas durante o desenvolvimento dos nódulos de soja, BOLAND et al. (1982) relataram que houve um grande aumento na atividade das enzimas que inicialmente assimilam a

amônia: GS, GOGAT, GDH e AAT e paralelamente houve uma indução na atividade da nitrogenase no bacteróide e um aumento na síntese de leghemoglobina no citosol. A enzima AS também apresentou um aumento na sua atividade, mas rapidamente houve uma diminuição. A atividade de GS no bacteróide não aumentou, porém no citosol aumentou muito. O nível da GOGAT acompanhou a da GS durante a formação do nódulo.

A via GS/GOGAT é considerada como a principal via de assimilação de NH_3 (DUNN & KLUCAS, 1973; MEEKS et al., 1978; RAWSTHORNE et al., 1980), principalmente por assimilar rapidamente a amônia devido ao seu baixo K_m e ser uma reação irreversível (MIFLIN & LEA, 1976). Este fato não impede a GDH estar envolvida na assimilação da amônia (RAWSTHORNE et al., 1980), principalmente em condições de concentrações elevadas de NH_3 devido ao valor elevado de K_m de GDH para NH_3 .

Segundo MEERS et al. (1970), é o nível de amônia que regula a via de assimilação. De acordo com GROAT & VANCE (1981), a via GS/GOGAT tem a função de assimilar a amônia produzida pela FBN e a GDH-NADH poderá atuar durante a senescência dos nódulos.

A atividade da GS aumentou 9 vezes no período de 11 a 23 dias após a emergência em nódulos de soja (BOLAND et al., 1982). Na fração solúvel do nódulo de lupinos a atividade de GS foi 500 vezes mais que a da raiz e 300 vezes mais que a do bacteróide (ROBERTSON et al., 1975). Baseado na produção de aminoácidos em nódulos, RAWSTHORNE et al. (1980) afirmaram que a via preferencial para assimilação de amônia era a GS/GOGAT.

Após KENNEDY *et al.* (1966) evidenciarem, em estudo com ^{15}N , que os grupos amídicos (CO-NH_2) tornavam-se disponíveis e mais intensamente marcados que os grupos amino (CH-NH_2), MOONEY & FOTTELL (1968) sugeriram que a isocitrato desidrogenase e a GDH presente nos nódulos eram enzimas mais importantes para sintetizar glutamato no bacteróide do que para assimilar a amônia produzida pela nitrogenase.

Embora glutamato e glutamina sejam os compostos oriundos da assimilação de amônia livre, é na forma de asparagina, glutamina, aspartato, homoserina e alantóides que são encontrados os compostos que "transportam" a amônia fixada pelo nódulo através dos vasos do xilema, em proporções que depende da planta hospedeira (RAWSTHORNE *et al.*, 1980).

Segundo MIFLIN & LEA (1980) a GS pode ser inibida pela amônia, ADP e P_i , AMP, Mn^{+2} , histidina, lisina e alanina e a GOGAT por aspartato e metionina. Segundo RAWSTHORNE *et al.* (1980), a maior controladora da atividade de GS é a nitrogenase devido esta requerer muito ATP como fonte de energia, e o ATP tornar-se o fator limitante para a atividade da GS.

Para BRAY (1983) existem fortes evidências da regulação da transcrição de genes da nitrogenase através de glutamina sintetase. A GS existente nos organismos poderá estar na forma ativa (deadenilada) ou inativa (adenilada). Quando os níveis de amônia são altos, a GS é adenilada pela célula e então inativada com um desligamento consequencial na transcrição dos genes *nif*. Quando os níveis de amônia são baixos, a GS torna-se deadenilada e então ativada, resultando no procedimento da transcrição dos genes *nif*, tendo, como consequência, a biossíntese da nitrogenase.

Tem havido muitas especulações sobre o mecanismo de assimilação de amônia em nódulos. Entretanto, a exata interrelação entre a atividade da nitrogenase, produção de amônia e vias metabólicas de assimilação da amônia e o metabolismo do carbono ainda não é bem conhecida (RAWSTHORNE et al., 1980).

3.4 Relações entre as atividades de PEPcase e GS com a fixação biológica do nitrogênio

Diversos trabalhos tem demonstrado que as atividades das enzimas PEPcase, GS e nitrogenase estão diretamente relacionadas entre si e com a fixação de N_2 em nódulos, entre eles os descritos por CHRISTELLER et al. (1977), SCHUBERT (1978), COKER & SCHUBERT (1981), GROAT & VANCE (1981), GADAL (1983), VANCE et al. (1983), GROAT et al. (1984), JESSEN et al. (1987) e DEROCHE & CARROYOL (1988).

Estas correlações indicam que um fator depende do outro, principalmente enzimas atuando num mesmo processo. Assim, quando aumenta a atividade da nitrogenase, haverá excesso de amônia e esta sendo tóxica deverá ser drenada para o citosol. Com uma elevação do pH local, ou aumento do teor de cátions ou escassez de esqueleto de carbono, a PEPcase certamente deverá ser ativada, ou vice-versa. Havendo grande quantidade de esqueletos de carbono e amônia livre, a GS deverá ser ativada.

A presença de alta quantidade de compostos nitrogenados no nódulo ocasionará uma mobilização destes elementos nitrogenados para a planta, possibilitando que esta produza mais fotossintatos, que poderá fornecer em maior quantidade para os nódulos, fornecendo uma maior

quantidade de ATP e agente redutor para a nitrogenase. Novamente o nódulo reduzirá o nitrogênio, perfazendo um ciclo simbiótico perfeito.

Com todo esse sistema operando simultaneamente e sinergisticamente, há necessidade de se compreenderem os processos bioquímicos e fisiológicos que atuam na fixação biológica do N_2 para que se consiga compreender melhor o exato funcionamento desse sistema. A partir disso, com o melhoramento genético ou com alguma substância química (estimuladora ou bloqueadora) é possível que se possa interferir em alguma reação convencional.

Atualmente, sabe-se que os nódulos ativos apresentam isoenzimas ou isoformas específicas de PEPcase (DEROCHE & CARROYOL, 1989) e de Glutamina Sintetase (GEBHAROT et al., 1986; ROSSI et al., 1989) que se manifestam somente durante a fixação de N_2 . Essas enzimas (nodulinas) tem suas sínteses mais diretamente ligadas ao código genético da planta hospedeira.

Estudos futuros, com auxílio da engenharia genética, poderão contribuir para o aumento da eficiência da fixação simbiótica de N_2 através da manipulação de genes diretamente ligados à expressão daquelas enzimas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Condições do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação no Centro de Energia Nuclear na Agricultura, em Piracicaba-SP, no período de março a junho de 1989, utilizando duas espécies de leguminosas: *Phaseolus vulgaris* L. (cv. Negro Argel) e *Vigna unguiculata* Walp (cv. BR-05), inoculadas com as estirpes *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* estirpe CM-01 (CIAT-899) e *Bradyrhizobium* sp. (CB-756), respectivamente, cultivadas em vasos Leonard modificados e com solução nutritiva em sílica+vermiculita (na proporção de 1:1, v:v). Os dois pares simbiotes utilizados são considerados eficientes para a fixação de N_2 e contrastantes quanto ao ciclo da planta e o desenvolvimento da estirpe.

3.2. Condução das plantas

As sementes foram desinfestadas, imergindo-as em solução de hipoclorito de sódio comercial-10% (v/v), por 20 minutos, sob aeração, e enxaguadas 3 vezes com água destilada. Em seguida mergulhadas em água destilada por 20 minutos, sob aeração, e novamente enxaguadas 5 vezes em água destilada, para retirar o excesso de $NaClO$. Após, foram colocadas em vermiculita saturada com $CaSO_4$ -0,1mM, para elevar o pH do substrato e um melhor desenvolvimento nas raízes, e levadas

para a casa de vegetação para germinação. Os vasos e as estacas de suporte para as plantas foram lavados com hipoclorito de sódio comercial-20% (v/v).

Após emergência, 4 plântulas foram transplantadas para cada vaso, e cada plântula foi inoculada com aproximadamente 10^9 células de sua respectiva estirpe. As plantas receberam nutrientes minerais na forma de solução nutritiva (tabela 1), sendo na primeira semana diluída a 1/5 com água destilada e na segunda semana a 1/2, e nas semanas seguintes sem diluição. Na 1ª e 2ª semana ocorreu troca semanal da solução nutritiva e a partir da 3ª semana, duas vezes por semana. Na 1ª semana foi adicionada uma dose "arranque" de nitrogênio [$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -0,5 mM] em todos os vasos. Foi registrado o pH da solução a ser descartada (apêndice 1).

No quarto dia após a emergência (4ª DAE), as plantas foram reinoculadas com suas respectivas estirpes, sendo adicionado 10^9 células/planta. No 6ª DAE houve um desbaste, deixando-se 2 plantas por vaso. Semanalmente, houve rodizio, ao acaso, nas bancadas. Inseticida/acaricidas (GUSATHION-400, 1g/l) foi utilizado como tratamento fitossanitário quando necessário.

3.3. Substrato nutritivo

As plantas foram cultivadas em vasos Leonard modificados, contendo na parte superior como substrato aproximadamente 850 ml de mistura sílica:vermiculita (proporção 1:1) e na parte inferior 700 ml da solução de HOAGLAND & ARNON (1950) modificada no laboratório de Bioquímica de plantas (J.A.G. da SILVEIRA, comunicação pessoal - tabela 1). A cada vaso foram adicionados 300 ml de CaSO_4 -0,1mM (1ª ao 3ª DAE), para favorecer as condições de pH para a nodulação.

TABELA 1 - Composição da solução nutritiva Hogland & Arns modificada por Silveira (Seção Bioquímica de Plantas), utilizada no experimento.

SOLUÇÃO NUTRITIVA			
Substância utilizada	CONCENTRAÇÃO ESTOQUE (Molar)	UTILIZADA NO EXPERIMENTO (ml/l)	CONCENTRAÇÃO FINAL (mM)
K_2SO_4	0,5	4,0	S - 2
K_2HPO_4	1,0	1,0	P - 1
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,0	3,0	K - 6
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,0	0,5	Mg- 0,5
Fe-EDTA	0,01	1,0	Ca- 3
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0,02	2,0	Cl- 3
H_3BO_3	0,04		FE- 0,01
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0,015	1,0	Co- 0,25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,001		Na- 0,20
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,001		B- 0,18
$ZnSO_4 \cdot H_2O$	0,001		Mn- 0,28
			Mo- 0,47
			Cu- 0,25
			Zn- 0,23
pH 6,0 $\pm$ 0,2			

3.4. Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi blocos inteiramente ao acaso em fatorial 2X10 (cultivar X coleta, respectivamente), com 3 repetições. Houve um tratamento controle, o qual diferenciou-se apenas pela inclusão de 10 mM de N na solução nutritiva para acompanhar visualmente o desempenho das plantas que não receberam nitrogênio mineral durante todo o experimento. A comparação entre as médias foram feitas através do erro padrão da média.

3.5. Amostragens e preparo das amostras

Foram feitas 10 coletas para cada leguminosa, sendo aos 16, 25, 32, 36, 39, 42, 46, 51, 58 e 68 dias após a emergência (DAE) para Negro Argel e 16, 31, 38, 45, 52, 57, 61, 68, 78 e 88 DAE para Caupi.

As plantas foram coletadas as 9:30 h, tendo o seguinte procedimento: separação da parte aérea da raiz, em caso de presença de vagem, esta foi separada da parte aérea. Em seguida, as raízes foram separada do substrato e determinou-se a atividade da nitrogenase nos nódulos intáctos presos às raízes. Após a análise, as raízes foram lavadas, mergulhando-as por 3 vezes em recipientes contendo CaSO_4 -0,1 mM. Foram retirados, contados e pesados (após "secagem" com papel absorvente) todos os nódulos existentes em cada raiz. Utilizou-se 1 g de nódulos, ao acaso, para fazer o extrato enzimático, para determinação das atividades da Fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPcase) e da Glutamina Sintetase (GS).

Foram determinados os pesos da matéria fresca e pesos da matéria seca (após 7 dias a 70°C) das raízes, parte aérea e vagens.

3.6. Obtenção dos Extratos Brutos (livres de células vegetais)

3.6.1. Extração para determinação da atividade de PEPcase

Os nódulos foram triturados em almofariz banhado em gelo e resfriado com nitrogênio líquido (-196°C) no seu interior, fazendo com que a temperatura no almofariz e ao seu redor se situasse abaixo de 0°C .

Adicionou-se 1,0 grama de nódulo em 5 ml (2+2+1ml) de tampão HEPES-50mM pH=8,0 contendo ditioneitol-5mM + EDTA-0,125mM. Após triturados, foram filtrados em 4 camadas de gazes e centrifugados a 500 G em uma centrífuga refrigerada à 0°C por 10 minutos. O sobrenadante (citossol + bacteróide) foi congelado para posterior análise da PEPcase.

3.6.2. Extração para determinação da atividade de GS

Foi adotado o mesmo procedimento executado para a PEPcase, sendo o sobrenadante novamente centrifugado a aproximadamente a 30.000 G a 0°C por 30 minutos (separação da fração citossol).

3.7. Determinação da atividade de PEPcase

A análise foi feita pelo método "in vitro" de Bergensen (1980). Adicionaram-se no frasco de cintilação: 250 μl da mistura tampão (TRIS-HCl-250mM pH=8,0 + $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ -20mM + ditioneitol-10mM + NADH-1,4mM) + 50 μl de fosfoenolpiruvato-50mM + 100 μl da solução de $\text{NaH}^{14}\text{CO}_3$ (250mM-100 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) + 100 μl de extrato enzimático. Agitou-se bem. No branco não se adicionou o bicarbonato.

Os frascos foram colocados em banho-maria a 30°C por 30 minutos, e depois adicionaram-se 100 µl de HCl-2M. Agitou-se. Os frascos, agora destampados, foram postos na estufa para secagem a 90°C por 2 horas. Depois, adicionou-se 1ml de água destilada e 10ml da solução cintiladora (4g POP; 100mg POPOP; 333ml triton-X100 e 666ml tolueno). Agitou-se fortemente. Os frascos foram mantidos no escuro por uma noite, antes das leituras no aparelho de cintilação líquida, modelo BECKMAN LS 5801.

A atividade de PEPcase por grama de nódulos (AGN) foi determinada comparando-se a atividade (DPM) do ^{14}C das amostras com padrão de H^{14}CO_3 adicionado em trietanolamina a 10%. A atividade por grama de nódulo (AGN) foi expressa em $\mu\text{moles } \text{H}^{14}\text{CO}_3^- \text{ fixado} \cdot (\text{grama de nódulo fresco} \cdot \text{hora})^{-1}$ e posteriormente convertido em atividade por planta (AP) $\mu\text{moles } \text{H}^{14}\text{CO}_3^- \text{ fixado} \cdot (\text{planta} \cdot \text{hora})^{-1}$ através do peso fresco total de nódulos por planta.

3.8. Determinação da atividade de GS

O método utilizado foi o "in vitro" de BERGENSEN (1980). Adicionaram-se num tubo: 0,6ml do tampão (TRIS-HCl 250mM pH= 7,0 + 0,2ml de ATP 30mM pH=7,0 + 0,2ml de $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ mM) + 0,2ml da solução de hidroxilamina (NH_2OH -1M + NaOH-1M, na proporção 1:1) + 0,5ml de extrato enzimático. Agitaram-se bem os tubos. Foram levados ao banho a 30°C por 30 minutos. Em seguida, Adicionaram-se 0,5ml da solução férrica ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ +HCl-0,2M 10% (p/v); TCA 24% (p/v) e HCl 50% (v/v), na proporção 1:1:1). Centrifugou-se a 5.000G por 10 minutos e a leitura foi feita em espectrofotômetro Bausch Lomb - Spectronic 20D, a 540 nm.

A atividade por grama de nódulo de glutamina sintetase foi expressa em μmoles de γ -glutamil(G

$\text{mat.fresca.hora}^{-1}$, a partir dos valores de absorvidade molar do γ -glutamil e posteriormente convertidos em atividade por planta (AP) γ -glutamil $(\text{planta.hora})^{-1}$ através do peso fresco total de nódulos por planta.

3.9. Determinação da atividade de nitrogenase

A atividade da enzima nitrogenase foi medida indiretamente através do método da atividade de redução do acetileno-ARA (HARDY et al., 1968).

Após a separação da raiz de cada planta, esta foi colocada no interior de um frasco de vidro (volume 500 ml), rapidamente vedado com rolhas perfuráveis.

Retirou-se, com seringa, 10% do ar do interior do frasco (50 ml) e adicionou-se a mesma quantidade na forma de gás acetileno. Após 15 minutos, retiraram-se duas alíquotas (1 ml) do ar contido dentro de cada frasco injetando-as no cromatógrafo.

As leituras das amostras foram efetuadas pelo aparelho de cromatografia gasosa de ionização de chama -BECKMAN CG 65 (coluna com 0,5m de comprimento e 0,005m de diâmetro; com temperatura inicial e final de 50°C; resina Porapac N-80 a 100 mesh e nitrogênio como gás de arraste; detector de chama à temperatura de 125°C e "range" 100). Como padrão foi utilizado o gás etileno-500ppm.

A atividade por planta (AP) da nitrogenase foi expressa em $\mu\text{moles de C}_2\text{H}_4.(\text{planta.hora})^{-1}$ a partir dos valores obtidos pela altura do pico em relação ao padrão de 500 ppm de etileno. Posteriormente os valores foram convertidos para atividade por grama de nódulos (AGN) $\mu\text{moles de C}_2\text{H}_4.(\text{g nódulo.hora})^{-1}$ através do peso fresco

total dos nódulos por planta.

3.10 Determinação do teor de N-total (%N)

Após secas e moídas a 30 mesh, 100 mg de raiz, caule+folha e de vagem foram colocadas em solução digestora à 350 °C. Após digerida, o nitrogênio contido na amostra foi destilado e a amônia foi fixada pela mistura de ácido bórico e indicadores e em seguida titulada com H_2SO_4 -0,0512 N, através do método convencional de Kjeldahl.

O conteúdo de N (CN) foi determinado pela relação:

$$CN = \frac{\% N \cdot \text{peso MS(mg)}}{100} \quad (\text{mg N/planta})$$

4. RESULTADOS

4.1. Desenvolvimento dos nódulos

4.1.1. Número de nódulos por planta

O número de nódulos em raízes de Negro Argel (figura 1), em função da idade das plantas (tempo), mostrou-se elevado neste experimento, o qual apresentou um gráfico com tendência do tipo parábola assimétrica, com valor máximo situado aos 46 DAE (período de enchimento médio das vagens). O número de nódulos apresentou um aumento linear por um longo período do ciclo da planta, que compreendeu desde o início da formação dos nódulos (16 DAE) até o período de enchimento médio das vagens (46 DAE), e, em seguida diminuiu bruscamente após essa última fase.

Verifica-se, pela figura 2, que em Caupi o número de nódulos apresentou um crescimento linear entre os períodos de início de formação dos nódulos (25 DAE) e pós-florescimento (61 DAE), e praticamente teve o seu número dobrado nos 18 dias seguintes (61 aos 78 DAE), quando as plantas encontravam-se entre os períodos de formação inicial de vagens e enchimento médio das mesmas. A partir dos 78 DAE, o número de nódulos decaiu intensamente, embora o peso dos nódulos fosse alto. Por Caupi, aos 16 DAE, praticamente não apresentar nódulos, os valores neste período foram desprezados.

NEGRO ARGEL

NÚMERO E PESO DE NÓDULOS

figura 1 Variação sazonal no número (NN) e peso da matéria fresca (PN) dos nódulos de feijoeiro (Negro Argel). Piracicaba 1989. As barras indicam o erro padrão. A ausência da barra significa um valor menor que o símbolo indicado.

CAUPI

NÚMERO E PESO DE NÓDULOS

figura 2 Variação sazonal no número (NN) e peso da matéria fresca (MF) dos nódulos de Caupi (BR-05), Piracicaba 1989. As barras indicam o erro padrão. A ausência da barra significa um valor menor que o símbolo indicado.

4.1.2. Matéria fresca de nódulos por planta

Em relação ao peso da matéria fresca de nódulos, em função do tempo, observa-se que em Negro Argel ocorreram dois aumentos acentuados (figura 1), um do início da formação dos nódulos até antes do florescimento (entre 15 a 25 D.A.E); e retornando a aumentar no início do surgimento das vagens até o período de enchimento médio das vagens (entre 39 a 46 DAE). Após esse último aumento, a matéria fresca dos nódulos começou a diminuir bruscamente.

Em Caupi, o gráfico da matéria fresca de nódulos em função do tempo apresentou uma tendência do tipo sigmóide, tendo um aumento linear até aos 38 DAE (figura 2), surgindo em seguida um aumento mais acentuado, persistindo assim até o período de enchimento médio das vagens (78 DAE), e, no final do ciclo apresentou uma certa constância nos valores do peso da matéria fresca.

4.1.3. Peso médio dos nódulos

Os gráficos da figura 3 representam o peso médio dos nódulos de Negro Argel e Caupi. Nota-se que os gráficos diferiram entre si. Em Negro Argel, o peso médio dos nódulos apresentou um leve aumento até a fase de floração (15 a 36 DAE), em seguida, um aumento mais acentuado entre a floração e o período de enchimento médio das vagens (37 aos 46 DAE). Após, houve uma tendência a decrescer na maturação das vagens (68 DAE).

Em Caupi, o tipo de gráfico apresentado foi do tipo sigmóide, apresentando um aumento mais acentuado entre os 45 e 68 DAE (pré-floração e início formação da vagem). Após aos 68 DAE, nota-se uma tendência a estabilizar o peso médio dos nódulos.

Figura 3 Variação sazonal no peso médio de nódulos (em miligramas) de feijoeiro (Negro Argel) e Caupi (BR-05). Piracicaba, 1989. As barras indicam o erro padrão. A ausência da barra significa um valor menor que o símbolo indicado.

4.2. Atividade da nitrogenase

A atividade da enzima nitrogenase expressa pela atividade total dos nódulos-AP ($\mu\text{moles } \text{C}_2\text{H}_4 \cdot \text{planta}^{-1} \cdot \text{hora}^{-1}$) e pela atividade da enzima por grama de nódulo-AGN ($\mu\text{moles } \text{C}_2\text{H}_4 \cdot \text{g nódulos}^{-1} \cdot \text{hora}^{-1}$), apresentaram dois picos durante o ciclo do Negro Argel (figura 4). Pelo gráfico que expressa a atividade total da nitrogenase em nódulos (AP), nota-se que o primeiro pico ocorreu antes do florescimento (32 DAE), e o segundo no período de enchimento médio das vagens (46 DAE). Após a ocorrência do segundo pico houve um forte decaimento na atividade.

Similarmente, o gráfico que expressa a atividade da enzima nitrogenase por grama de nódulo de raízes de Negro Argel (figura 2) foi semelhante ao da sua atividade total durante todo o ciclo, inclusive o pico que representou a sua maior atividade foi o mesmo para a atividade total nos nódulos.

Em Caupi, as atividades da enzima nitrogenase, tanto a total dos nódulos (AP) como a por grama de nódulo (AGN), estão representadas na figura 5. Ambos os gráficos apresentaram um pico aos 58 DAE, indicando que a atividade máxima da enzima nitrogenase ocorreu logo após o florescimento (após 52 DAE). O gráfico que expressa a atividade por planta da enzima nitrogenase apresentou um gráfico do tipo de uma parábola (figura 5), no qual se verifica que a atividade foi aumentando do início da formação dos nódulos até após o florescimento da planta (58 DAE), e, em seguida começou a cair bruscamente.

Figura. 4 Variação sazonal na atividade da enzima nitrogenase, expressa por planta (AP) e por grama de nódulo (AGN) em feijoeiro (Negro Argel). Piracicaba 1989. As barras indicam o valor padrão. A ausência da barra significa um valor menor que o símbolo indicado

Figura 5 Variação sazonal na atividade da enzima nitrogenase, expressa por planta (AP) e por grama de nódulo (AGN) em Caupi (BR-05). Piracicaba 1989. As barras indicam o erro padrão. A ausência da barra significa um valor menor que o símbolo indicado.

Entretanto, o gráfico que expressa a atividade por grama de nódulo (AGN) da enzima nitrogenase em Caupi (figura 5), mostrou uma elevada atividade enzimática logo no início do processo simbiótico, apresentando uma diminuição logo em seguida e se estendendo até o florescimento (dos 37 aos 51 DAE), e, após o período de florescimento (58 DAE) houve um rápido aumento na atividade da enzima nitrogenase por grama de nódulo, que no gráfico foi expresso por um pico, e, em seguida a atividade caiu rapidamente.

4.3. Atividade de PEPcarboxilase

A variação da atividade da enzima PEPcase em nódulos de Negro Argel, expressa pela atividade total dos nódulos-AP ($\mu\text{moles HCO}_3^- \text{planta}^{-1} \text{hora}^{-1}$) e por grama de nódulo-AGN ($\mu\text{moles de HCO}_3^- \text{g nódulo}^{-1} \text{hora}^{-1}$) estão apresentadas na figura 6. Ambos os gráficos apresentaram dois picos durante toda a ontogênese do Negro Argel, sendo que o primeiro pico ocorreu antes do período do florescimento (32 DAE) e o segundo pico durante o período de enchimento médio das vagens (46 DAE).

Estes dois picos coincidiram na mesma época com os apresentados pela atividade da enzima nitrogenase. A atividade total nodular (AP) da PEPcase em Negro Argel apresentou seu valor máximo no segundo pico, que coincidiu com os picos apresentados nos gráficos que expressaram o número e peso fresco de nódulos (figura 1).

Contudo, no gráfico que expressa a atividade por grama de nódulo em Negro Argel (figura 6), a enzima PEPcase apresentou seu valor máximo no primeiro pico (32 DAE), coincidindo com o pico maior apresentado pelas

NEGRO ARGEL PEP-CARBOXILASE

Figura 6 Variação sazonal na atividade da enzima PEPcase, expressa por planta (AP) e por grama de nódulo (AGN) em feijoeiro (Negro Argel). Piracicaba 1989. As barras indicam o erro padrão. A ausência da barra significa um valor menor que o símbolo indicado

atividades da enzima nitrogenase (figura 4). Observa-se que no início do processo de nodulação (16 DAE) a atividade por grama de nódulos da PEPcase era elevada.

Em Caupi, as atividades da enzima PEPcase (figura 7), expressas pela atividade total de nódulos (AP) e por grama de nódulo (AGN), obtiveram, cada, apenas um pico aos 61 DAE para ambos os gráficos. Nota-se que as atividades da enzima PEPcase obtiveram valores máximos após os da nitrogenase terem ocorrido.

4.4. Atividade de glutamina sintetase

Na figura 8, o gráfico mostra as atividade da enzima GS em nódulos de Negro Argel, expressa pelo total de nódulos-AP ($\mu\text{moles de } \gamma\text{-glutamil.planta}^{-1}.\text{hora}^{-1}$) e por grama de nódulos-AGN ($\mu\text{moles de } \gamma\text{-glutamil.g nódulos}^{-1}.\text{hora}^{-1}$). Observa-se também dois picos, o primeiro justamente no período que antecedeu o florescimento (32 DAE) e o outro durante o período de enchimento médio das vagens (46 DAE), coincidindo com os picos máximos apresentados nas atividades total dos nódulos das enzimas nitrogenase (figura 4) e PEPcase (figura 6), com o número e peso fresco de nódulos (figura 1). O maior pico da atividade por grama de nódulo (AGN) da enzima GS coincidiu com os da nitrogenase e da PEPcase. Ambos os tipos de gráficos que expressam as atividade total de nódulos e por grama de nódulos das enzimas PEPcase e GS foram muito semelhantes (figuras 4, 6 e 8).

Na atividade expressa pelo total de nódulos (AP) de GS em Caupi (figura 9), não houve a ocorrência de um pico. Houve um crescente aumento na sua atividade e no final do ciclo (78.DAE) apresentou uma tendência a estabilização, sendo o tipo de gráfico similar ao da matéria

Figura 7 Variação sazonal na atividade da enzima PEPcase, expressa por planta (AP) e por grama de nódulo (AGN) em Caupi (BR-05). As barras indicam o erro padrão. A ausência da barra significa um valor menor que o símbolo indicado.

Figura 8 Variação sazonal na atividade da enzima GS, expressa por planta (AP) e por grama de nódulo (AGN) em feijoeiro (Negro Argel). Piracicaba 1989. As barra indicam o erro padrão. A ausência da barra significa um valor menor que o símbolo indicado.

Figura 9 Variação sazonal na atividade da enzima GS, expressa por planta (AP) e por grama de nódulos (AGN) em Caupi (BR-05). Piracicaba 1989. As barras indicam o erro padrão. A ausência da barra significa um valor menor que o símbolo indicado.

fresca de nódulos (figura 2). Quanto a sua atividade por grama de nódulos (AGN), a enzima GS apresentou-se máxima no período de enchimento das vagens (figura 9), coincidindo com os picos apresentados pelas enzimas nitrogenase (figura 4) e a da PEPcase (figura 7).

4.5. Conteúdo de N na planta

Os gráficos que expressam o conteúdo de N da partes raiz e caule+folha, em função do tempo, em Negro Argel, estão representados na figura 10. Observa-se que em caule+folha, o conteúdo de N apresentou um gráfico do tipo parábola. Houve um leve aumento entre o início do desenvolvimento da planta e o período de florescimento (15 aos 36 DAE), em seguida um aumento mais acentuado (36 aos 46 DAE), e após este último período (aos 46 DAE) houve uma brusca decaída no conteúdo de N no caule+folha, provavelmente devido a mobilização para as vagens.

O aumento no conteúdo de N na raiz apresentou-se do tipo sigmóide. Nas vagens, o conteúdo de N caracterizou-se pelo seu rápido acúmulo, ocasionando no final (aos 65 DAE) um alto índice de colheita de N (g N na vagem/g N na planta), aproximadamente 70% (figura 11).

Em Caupi (figura 12), tanto o conteúdo de N de caule+folha como o de raiz apresentaram um aumento do tipo sigmóide, sendo os tipos de gráficos muito similares, diferentes do ocorrido em Negro Argel. Nas vagens, por a planta estar no início da fase reprodutiva, pouco conteúdo de N havia nas mesmas, devido ao pouco N translocado para as vagens até os 88 DAE (figura 13).

NEGRO ARGEL CONTEÚDO DE N

Figura 10 Variação sazonal no conteúdo de nitrogênio total em diversas partes da planta (raiz, caule e folha, e vagens), em feijoeiro. Piracicaba 1989. As barras indicam o erro padrão. A ausência da barra significa um valor menor que o símbolo indicado.

Figura 11 Distribuição aos 65 DAE no acúmulo de nitrogênio em diversas partes da planta (raiz, caule e folha, e vagem), em feijoeiro (Negro Argel) inoculado e controle (10mM N). Piracicaba 1989.

CAUPI CONTEÚDO DE N

Figura 12 Variação sazonal no conteúdo de nitrogênio total em diversas partes da planta (raiz, caule e folha, e vagens), em Caupi (BR-05). Piracicaba 1989. As barras indicam o erro padrão. A ausência da barra significa um valor menor que o símbolo indicado.

Figura 13 Distribuição aos 88 DAE no acúmulo de nitrogênio em diversas partes da planta (raiz, caule e folha, e vagem), entre Caupi (BR-05) inoculado e controle (10mM N). Piracicaba 1989.

4.6. Acúmulo de fitomassa

Os gráficos que representam o acúmulo de fitomassa em Negro Angel (figura 14) foram muito semelhantes com os de conteúdo de N (figura 10). O mesmo ocorreu para distribuição de N e de fitomassa na planta (figura 11 e 15). Os gráficos de acúmulo de fitomassa da raiz e de caule+folha apresentaram-se na forma sigmoide e parabolica, respectivamente, igualmente aos seus respectivos em conteúdo de N, indicando que raiz continuou crescendo após o período de enchimento das vagens (46 DAE). Os gráficos de acúmulo de fitomassa e de conteúdo de N das vagens também foram idênticos (figura 16).

Observa-se na figura 17, que o acúmulo de fitomassa em Caupi foi semelhante com os de conteúdo de N (figura 12), diferenciando apenas no fato que mesmo aos 88 DAE, a planta continuava a crescer. Em vagem, os gráficos foram similares (figuras 12 e 18). Também em Caupi o acúmulo de N e de fitomassa pela planta durante todo o ciclo foram proporcionalmente semelhantes (figura 19).

NEGRO ARGEL

ACÚMULO DE FITOMASSA

Figura 14 Variação sazonal no acúmulo de fitomassa em diversas partes da planta (raiz, caule e folha, e vagem em feijoeiro (Negro Argel). Piracicaba 1989. As barras indicam o erro padrão. A ausência de barras significa um valor menor que o símbolo indicado.

Figura 15 Variação aos 65 DAE no acúmulo de fitomassa em diversas partes da planta (raiz, caule e folha, e vagem), entre feijoeiro (Negro Argel) inoculado e controle (10mM N), Piracicaba 1989.

NEGRO ARGEL ACÚMULO DE N E DE FITOMASSA

Figura 16 Variação sazonal no acúmulo total de fitomassa e de nitrogênio em feijoeiro (Negro Argel). Piracicaba 1989. As barras indicam o erro padrão. A ausência de barras significa um valor menor que o símbolo indicado.

CAUPI

ACÚMULO DE FITOMASSA

Figura 17 Variação sazonal no acúmulo de fitomassa em diversas partes da planta (raiz, caule e folha, e vagens), em Caupi (BR-05). Piracicaba 1989. As barras indicam o erro padrão. A ausência da barra significa um valor menor que o símbolo indicado.

Figura 18 Distribuição aos 28 DAE no acúmulo de fitomassa nas diversas partes da planta (raiz, caule e folha), e vagem, entre Caupi (BR-05) inoculado e controle (10mM N). Piracicaba 1989.

CAUPI

ACÚMULO DE N E DE FITOMASSA

Figura 19 Variação sazonal no Acúmulo total de fitomassa e de nitrogênio entre Caupi (BR-05) inoculado e controle. Piracicaba 1989. As barras indicam o erro padrão. A ausência de barras significa um valor menor que o símbolo indicado.

6. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão de acordo com o que tem sido observado com outras leguminosas (HUNGRIA & NEVES, 1986-c; RODRIGUES & SILVEIRA, 1989). Assim, as maiores taxas de fixação de N_2 estiveram relacionadas com maiores taxas de assimilação de NH_3 e de fixação de CO_2 através da PEPcase (VANCE et al., 1983; SILVERA, 1990).

O correlacionamento enzimático apresentado em Negro Argel e Caupi, pelas nodulinas PEPcase e GS, através das suas atividades (figuras 20 e 21, respectivamente), foram diretamente proporcionais com a atividade da nitrogenase durante a maior parte da ontogênese, tanto para *Rhizobium* /Negro Argel como para *Bradyrhizobium* /Caupi. Outras leguminosas, entre elas soja, alfafa, ervilha, lupinus, também apresentaram esse correlacionamento, como se pode verificar em trabalhos publicados de CHRISTELLER et al. (1977); COKER & SCHUBERT (1981); GADAL (1983); JESSEM et al. (1983); VANCE et al. (1983); GROAT et al. (1984); JESSEM et al. (1987) e JESSEM et al. (1988).

Concomitantemente, as atividades de PEPcase e GS se relacionaram positivamente com a fixação biológica de nitrogênio, como pode ser visto através das figuras 4, 6, 8 e 15 para Negro Argel e 5, 7, 9 e 16 para Caupi. Esta relação existente entre PEPcase e GS com a

Negro Argel: $y = 8,309 + 0,0699.X$

$r = 0,743$

Caupi: $y = 9,846 + 0,1058.X$

$r = 0,726$

Figura 20 Correlação n a m e n t o entre as atividades das enzimas nitrogenase e PEPcase, durante a ontogênese do feijoeiro e Caupi, através de regressão linear.

Negro Argel: $y = 4,057 + 0,6613.X$

$r = 0,691$

Caupi: $y = 25,49 + 0,5465.X$

$r = 0,453$

Figura 20 Correlacionamento entre as atividades das enzimas nitrogenase e GS, durante a ontogênese do feijoeiro e Caupi, através de regressão linear.

fixação biológica do nitrogênio também já foi relatada por vários autores, entre eles GROAT *et al.* (1981); GADAL (1983); JESSEM *et al.* (1987); JESSEM *et al.* (1988).

O correlacionamento positivo existente entre as atividades das enzimas PEPcase, GS e nitrogenase, pressupõem que essas enzimas são interdependentes uma com a outra dentro do nódulo, porém relacionadas diretamente dentro do sistema simbiótico. A existência de um relacionamento direto entre essas enzimas reforça a hipótese de SILVEIRA & VITORELLO (1989), de que as enzimas PEPcase e GS não são ativadas pela nitrogenase, apesar de serem diretamente relacionadas entre si.

Os resultados encontrados reforçam a idéia de que estas nodulinas podem ser utilizadas como marcadores genético-bioquímicos de variação na eficiência de fixação de N (JESSEN *et al.*, 1987; JESSEN *et al.*, 1988). Além disso, mostram também, a existência de grandes variações sazonais ao longo da ontogênese das plantas, sendo assim, necessário a padronização da idade das plantas para estudos comparativos entre cultivares.

Como já foi apresentado anteriormente (figuras 4, 6 e 8), a cultivar Negro Argel apresentou dois picos para as atividades de nitrogenase, GS e PEPcase, que foram diretamente relacionadas com aumentos no peso dos nódulos. Não se sabe ao certo a causa da existência de um segundo pico. Foi observado que aos 39 DAE havia a presença de nódulos senescentes e nódulos jovens devido a uma reinfestação, e supõem-se que esta reinfestação possa ser o motivo do surgimento do segundo pico em Negro Argel, durante o período de enchimento médio das vagens (46 DAE).

Em Caupi, mesmo com a ocorrência de um único pico na atividade das enzimas PEPCase, GS e nitrogenase (tanto expressa por planta como por grama de nódulo) durante a ontogênese, as plantas inoculadas desenvolveram semelhantemente ao controle-10mM N (figura 18). Talvez a não existência de um segundo pico pode ser favorecido devido a predominância de altos valores da atividade das enzimas por grama de nódulos durante a fase vegetativa.

A ocorrência de uma relação direta entre o peso da matéria fresca dos nódulos e a atividade das enzimas PEPCase, GS e nitrogenase, para ambas associações, faz com que estudos relacionando matéria fresca ou peso médio dos nódulos com as enzimas acima citadas e/ou com a fixação simbiótica de N_2 sejam feitos para saber a importância da massa nodular na eficiência do processo simbiótico.

O sistema simbiótico permaneceu ativo até o período de enchimento médio das vagens, senescendo juntamente com a planta. Este resultado contradiz com os trabalhos publicados anteriormente que relataram sobre o sistema simbiótico senescer antes a planta. Estas duas simbioses *Rhizobium*/Negro Argel e *Bradyrhizobium*/Caupi são conhecidas como eficientes fixadoras de nitrogênio, em condições ótimas para seu desenvolvimento (HUNGRIA & NEVES, 1987; BARRADAS et al., 1989; RODRIGUES et al., 1989).

O fato das plantas inoculadas não terem se diferenciados visualmente em relação ao controle (10mM de NO_3^-), indica que as plantas que utilizaram o N_2 foram tão eficientes quanto as que receberam N-inorgânico. Isso difere de alguns trabalhos, onde as plantas controle obtiveram um desenvolvimento muito superior em relação as que receberam N_2 como única fonte de nitrogênio.

A diferença no conteúdo de N total e acúmulo de fitomassa nas vagens entre as plantas inoculada e controle, tanto em Negro Argel como em Caupi (figuras 11, 15, 13 e 18, respectivamente) foi devido a diferença do estado fisiológico existente entre as plantas controle e inoculas, de aproximadamente 3 dias em Negro Argel e 6 dias em Caupi. A diferença de porcentagem no conteúdo de N-total e acúmulo de fitomassa entre as cultivares, foi devido Negro Argel e Caupi não estarem situados no mesmo estado fisiológico quando foi realizado a última coleta de cada cultivar.

A utilização de 10mM de nitrogênio para o controle foi baseado num experimento anterior utilizando várias concentrações de N (0; 2,5; 5,0; 7,5; 10 e 15mM), onde com 10mM as plantas se desenvolveram melhor.

A despeito de Caupi ter apresentado um crescimento de nódulos no final do ciclo de experimentação (ver aumento no peso médio de nódulos - fig. 3), observou-se um acentuado decréscimo nas atividades das três enzimas após o período de enchimento médio das vagens. Isto pode sugerir com controle genético-fisiológico no níveis das nodulinas.

7. CONCLUSÃO

- As atividades das enzimas PEPcase, GS e nitrogenase, nos nódulos, foram positivamente relacionadas entre si e com a fixação de N_2 em feijoeiro e em caupi;
- As atividade de PEPcase, GS e nitrogenase apresentaram um modelo de variação sazonal que difereriram entre si ao longo da ontogênese das duas espécies;
- As atividades de PEPcase, GS e nitrogenase apresentaram dois picos em feijoeiro: o primeiro na floração e o segundo na fase de enchimento médio das vagens. Caupi apresentou sempre um pico nas atividade das enzimas, na fase de enchimento das vagens.
- É provável que as ações das enzimas PEPcase, GS e nitrogenase nos nódulos estejam sinergisticamente integradas no processo global de fixação simbiótica de N_2 .

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ATKINS, C.A. 1974 Efficiencies and inefficiencies in the legume *Rhizobium* symbiose A Review Plant and Soil 82:273-284
- BARRADAS, C.A.; BODDEY, L.H. & HUNGRIA, M. 1989 Seleção de cultivares de feijão e estirpes de *Rhizobium* para nodulação precoce e senescência tardia dos nódulos. R. bras. Ci. Solo, 13:169-179
- BERINGER, J.E. 1984 The significance of symbiotic nitrogen fixation in plant production. CRC critical review in Plant Science cap.4 pp 3-24.
- BETHLENFALVAY, G.L. & PHILLIPS, D.A. 1977 Effect of light intensity on the efficiency of carbon dioxide and nitrogen reduction in *Pisum sativum* L. Plant Physiol. 60:871-878
- BOLAND, M.J.; HANKS, J.F.; REYNOLDS, P.H.S.; BLEVINS, D.G. ; TOLBERT, N.E. and SCHUBERT, K.R. 1982 Subcellular organization of ureide biosynthesis from glycolytic intermediates and ammonium in nitrogen fixing soybean nodules Planta 155:45
- BRAY, C.M. 1983 Nitrogen metabolism in plants Logman Inc. New York cap.1 (1-29)

- CHRISTELLER, J.T.; LAING, W.A.; SUTTON, W.D. 1977 Carbon dioxide fixation by lupin root nodules. *Plant Physiol.* 60:47-50
- COKER, G.T. & SCHUBERT, K.R. 1981 Carbon dioxide fixation in soybean roots and nodules I. Characterization and comparison with N_2 fixation and composition of xylem exudate during early nodule development *Plant Physiol.* 67:691-696
- COOMBS, J.; MAW, S.L. and BALORY, C.W. 1975 Metabolic regulation in C_4 photosynthesis - inorganic carbon substrate for PEP carboxylase *Plant Science Letters* 4:97-102
- DAVIES, D.D. 1979 The central role of phosphoenolpyruvate in plant metabolism *Ann. Rev. Plant Physiol.* 30:131-158
- DEROCHE, M.E. & CARROYOL, E. 1988 Nodule phosphoenolpyruvate carboxylase: a review *Physologia Plantarum* 74:775-782 Copenhagen
- DUNN, S.D. and KLUCAS, R.V. 1973 Studies on possible routes of ammonium assimilation in soybean root nodule bacteroids *Can. J. Microb.* 19:1493-1499
- FARDEN, K.J.F. & ROBERTSON, J.G. 1980 Methods for evaluating biological nitrogen fixation. edited by F. J. Bergersen. John Wiley & Sons Ltd. cap.7 (265-314)
- GADAL, P. 1983 Phosphoenolpyruvate carboxylase and nitrogen fixation *Physiol. Veg.* 21:1069-1074

- GEBHARDT,C.; OLIVER,J.E.; FORDE,B.G.; SAARELAINEN,R. and MIFLIN,B. 1986 Primary structure and differential expression of glutamine synthetase genes in nodules, roots and leaves of *Phaseolus vulgaris* The EMBO L5(7):1429-1435
- GROAT,R.G. & VANCE,C.P. 1981 Root nodule enzymes of ammonia assimilation in alfafa (*Medicago sativa* L.): Development patterns and response to applied nitrogen Plant Physiol. 67:1198-1203
- GROAT,R.G.; VANCE,C.P. and BARNES,D.K. 1984 Host plant nodule enzymes associated with selection for increased N_2 -fixation in alfafa. Crop Sci. 24:895-898
- HARDY,R.W.F.; HOLSTEN,R.D.; JACKSON,E.K. and BURNS,R.C. 1968 The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation laboratory and field evaluation Plant Physiol., Bethesda 43:1185-1207
- HERREIDGE,D.F. & PATE,J.S. 1977 Utilization of net photosynthate of nitrogen fixation and protein production in an annual legume Plant Physiol. 60:759-764
- HUNGRIA,M. 1985 Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em *Phaseolus vulgaris* L. Tese doutorado UFRJ
- HUNGRIA,M. & NEVES,M.C.P. 1986-a Efeito na manipulação de fotossintatos na fixação biológica do nitrogênio em feijoeiro. Pesq. Agropec. Bras. 21(1):9-24

- HUNGRIA,M. & NEVES,M.C.P. 1986-b Interação entre cultivares de *Phaseolus vulgaris* e estripes de *Rhizobium* na fixação e transporte do nitrogênio. Pesq. Agropec. Bras. 21(2):127-140
- HUNGRIA,M. & NEVES,M.C.P. 1986-c Ontogenia da fixação biológica do nitrogênio em *P. vulgaris* Pesq. Agropec. Bras. 21(7):715-730
- HURZ,W.G.W.; ROKOSH,D.A. and LA RUE,A. 1975 Enzymes of ammonia assimilation in *Rhizobium leguminosarum* bacteroids. CAN. J. MICROBIOL. 21:1009-1012
- JACKSON,W.A. & COLEMAN,N.T. 1959 Fixation of carbon dioxide by plant roots through phosphoenolpyruvate carboxylase. Plant and Soil 2:1-16
- JACOB-NETO,J.; THOMAS,R.J. & FRANCO,A.A. 1988 Variação estacional da concentração do Mo nos nódulos e demais partes da planta do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) Turrialba 38(1):1-4
- JESSEN,D.L.; BARNEY,D.L.K.; VANCE,C.P. and HEICHEL,G.H. 1987 Variation for activity of nodule nitrogen and carbon assimilating enzymes in alfafa Crop Sci. 27:6270631
- JESSEM,D.L.; BARNES,D.K. and VANCE,C.P. 1988 Bidirectional selection in alfafa for activity of nodule nitrogen and carbon-assimilating enzymes Crop Sci. 28:18-22
- KENNEDY,I.R.; PARKER,C.A. and KIDEY,D.K. 1966 The probable site of nitrogen fixation in root nodules of *ornithopus sativis* Biochim. Biophys. Acta 130:295

- KING, B.J.; LAYZELL, D.B.; CANVIN, D.T. 1986 The role of dark carbon dioxide fixation in root nodules of soybean *Plant Physiol.* 81(2):200-205
- LAWN, R.J. & BRUN, W.A. 1974 Symbiotic nitrogen fixation in soybeans I. Effect of photosynthetic source - sink manipulations *Crop Sci.* 14:11-16
- LAWRIE, A.C. & WHEELER, C.T. 1975 Nitrogen fixation in the root nodules of *Vicia faba* L. in relation to the assimilation of carbon: II. The dark fixation of carbon dioxide *New Phytol.* 74:437-445
- MARYAMA, H.; EASTERDAY, H.J.; CHANG, H.C. and LANE, M.D. 1966 *Journal Biological Chemical* 243:2405-2412
- Mc CLURE, P.R.; COKER, G.T. and SCHUBERT, K.R. 1983 Carbon dioxide fixation in roots and nodules of *Alnus glutinosa* *Plant Physiol.* 71:652-657
- MEEKS, J.C. ; WOLK, C.P., SCHILLING, N. SHAFFER, P.W.; AVISAR, Y. and CHEIN, W. 1978 Initial organic products of fixation of (^{13}N) dinitrogen by root nodules of soybean (*Glycine max*) *Plant Physiol.* 61:980-983
- MEERS, J.L.; TEMPEST, D.W. and BROWN, 1970 "Glutamine (ammonide):2-oxoglutarate amino transferase oxido-reductase (NADP)", an enzyme involved in the synthesis of glutamine by some bacteria *J. Gen. Microb.* 64:187-194
- MIFLIN, B.J. & LEA, P.J. 1976 The pathway of nitrogen assimilation in plants *Phytochemistry* 15(13A):873-885

- MILLER, S.S.; BOYLAN, K.L.M.; VANCE, C.P. 1987 Alfafa root nodule carbon dioxide fixation. Plant Physiology 84:501-508.
- MINCHIN, F.R. and PATE, J.S. 1973 The carbon balance of legume and the functional economy of its root nodules. J. EXP. BOT. 24:295-308
- MOONEY, P. and FOITRELL, P.F. 1968 The induction of glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in *Rhizobium* Biochem. j. 110:102-110
- NEVES, M.C.P.; MINCHIN, F.R. & SUMMERFIELD, R.J. 1981 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., Trinidad 58(2):115-132
- PEREIRA, P.A.A. & ROCHA, R.E.M. da 1982 1º RENAFE (reunião nacional de pesquisa de feijão) Embrapa pag.68 Goiânia
- PERREOT-RECHENMANN, C.; VIDAL, J.; MAUDINOS, B. and GADAL, P. 1981 Immunocytochemical study of phosphoenolpyruvate carboxylase in nodulated *Alnus glutinosa* Planta 153:14-17
- RAWSTHORNE, E.; MINCHIN, F.R.; SUMMERFIELD, C.; COOKSON, J. and COOMBS, J. 1980 Carbon and nitrogen metabolism in legume root nodules Phytochemistry 19:341-355
- REYNOLDS, P.H.; BLEVINS, D.G.; BOLAND, M.J.; SCHUBERT, K.R. and RANDALL, D.D. 1982 Enzymes of ammonia assimilation in legume nodules: A comparison between ureide and amide transporting plants Plant Physiol. 55:255-260

- RIVERO, C.R. & GERALDO, C.T. 1978 Comparación de nodulación y fijación de nitrógeno por *Rhizobium* frizol *P. vulgaris* L. y soya *G. max.* L.merril CIAT-pp.269
- ROBERTSON, J.G.; FARNDEN, K.J.F.; WARBURTON, M.P.; BANKS, J.A.M. 1975 Induction of glutamine synthetase during nodule development in Lupin Aust. J. Plant Physiol. 2:265-272
- RODRIGUES, J.L.M. & SILVEIRA, J.A.G. 1989 Relação existente entre PEPCase e fixação biológica de nitrogênio em *Phaseolus vulgaris* e *vigna unguiculata* Anais da II Reunião Brasileira de Fisiologia Vegetal.
- RYLE, G.J.A.; ARNOTT, R.A.; POWELL, C.E. and GORDON, A.J. 1984 N_2 fixation and the respiratory costs of nodules, nitrogenase activity, and nodule growth and maintenance in fiskeby soybean J. Exp. Botany 33:1156-1165
- SCHUBERT, K.R. 1978 Carbon and nitrogen metabolism in soybean and alder nodules and roots Plant Physiol. 61:398-
- SCHUBERT, K.R.; TIENEY, M.; CHRISTENSON, A.; Mc CLURE, P. and COKER, G. 1983 Carbon and nitrogen metabolism in soybean and alder nodules and roots Department of Biochemistry, Michigan State University, East Lansing, U.S.A. pp.384
- SCOTT, D.B.; FARNDEN, K.J.F. and ROBERTSON, J.G. 1976 Ammonia assimilation in Lupin nodules. Nature (London) 263:703-705

- SILVEIRA, J.A.G. & VITORELLO, V.A. 1989 Fixação não fotossintética do CO_2 (via PEPcase) em nódulo: causa, ou efeito da eficiência de fixação de N_2 ? um modelo baseado em relações ao pH Anais s II RBFV p272
- SILVEIRA, J.A.G. 1990 Relações entre metabolismo de C e N : fixação não fotossintética de CO_2 e assimilação de N inorgânico I Simpósio Bras. sobre N nas plantas-UFRJ
- TEIXEIRA, S.M. 1987 Conjuntura econômica da produção de feijão no Brasil. IN: Resumos II Reunião Nacional de Pesquisa de Feijão Goiânia
- VANCE, C.P.; STADE, S. and MAXWELL, C.A. 1983 Alfalfa root nodule carbon dioxide fixation I. Association with nitrogen fixation and incorporation into amino acids Plant Physiology 72:469-473
- VANCE, C.P. & STADE, S. 1984 Alfafa root nodule carbon dioxide fixation I. Partial purification and characterization of root nodule phosphoenolpyruvate carboxylase Plant Physiol. 75:261-264
- YATES, M.G. 1980 Biochemistry of nitrogen fixation. IN: The biochemistry of plants, vol. 5, cap.1, p.1-64

APÊNDICE 1. Variação diária da temperatura no interior da casa de vegetação; durante o período de condução do experimento

APENDICE 2. Valores de pH da solução nutritiva quando
seriam descartadas.

O.A.E.	NEGRO ARGEL		CAUPT	
	sem N	com N	sem N	com N
9	7.0	7.1	7.0	7.1
12	6.4	6.8	6.4	6.7
16	6.0	6.5	5.9	6.0
20	6.3	6.3	5.7	6.0
23	6.0	6.3	6.2	6.8
26	6.0	6.5	5.2	6.3
30	6.2	6.3	4.7	5.8
33	6.1	6.4	6.1	6.4
37	5.6	6.0	5.6	5.8
41	6.3	6.2	5.7	6.4
45	5.9	6.3	4.9	5.9
48	5.9	6.7	5.5	6.6
52	5.7	5.7	4.9	6.4
55	5.6	6.0	5.3	5.6
59	6.3	5.8	6.2	6.6
62	5.3	5.8	5.0	6.4
67			5.7	6.6
75			6.6	7
83			5.6	6.7

APÊNDICE 3. Número, peso da matéria fresca e peso médio dos nódulos de feijoeiro (Negro Argel), ao longo do tempo.

D.A.E.	Número de nódulos ¹		Matéria fresca denódulos ¹		Peso médio de nódulos (mg) ¹	
	$\bar{X}$	σ	$\bar{X}$	σ	$\bar{X}$	σ
16	157	8.1	0.47	0.054	2.99	0.195
25	371	10.1	1.63	0.043	4.39	0.127
32	442	7.0	2.08	0.125	4.70	0.261
36	567	22.9	2.33	0.212	4.11	0.358
29	543	17.9	3.94	0.314	7.25	0.403
43	575	41.3	3.68	1.093	6.39	1.770
46	666	7.5	5.60	0.296	8.41	0.362
51	619	46.9	5.48	0.495	8.89	0.587
58	474	17.6	3.76	0.496	7.87	0.793
68	580	60.3	3.73	1.018	6.32	1.293
$\bar{X}_{cv}^2 =$	8,649		13,476		10,789	

1 - erro padrão da respectiva média

2 - média do coeficiente de variação

APÊNDICE 4. Atividade expressa por planta das enzimas PEPcase, GS e nitrogenase de nódulos de feijoeiro (Negro Argel), ao longo da ontogênese.

D.A.E.	Atividade da PEPcase		Atividade da GS		Atividade da nitrogenase	
	$\bar{X}$	σ^1	$\bar{X}$	σ^1	$\bar{X}$	σ^1
16	66	3.4	3.41	1.906	-	-
25	210	9.1	23.28	1.127	21.61	2.661
32	328	19.3	27.09	2.567	48.98	0.244
36	170	14.5	25.34	2.515	19.09	2.100
39	315	23.6	39.39	7.556	27.68	2.483
43	386	26,2	33.55	5.378	21.60	4.391
46	491	33.1	61.92	4.286	38.78	2.227
51	182	18.5	45.04	4.738	36.37	5.703
58	23	9.0	12.28	2.901	6.19	1.648
68	8	5.2	13.27	4.547	2.14	1.770
$\bar{X}_{cv}^2 =$	10,789		1,502		1,867	

1 - erro padrão da respectiva média

2 - média do coeficiente de variação

APÊNDICE 5. Atividade expressa por grama de nódulos das enzimas PEPcase, GS e nitrogenase de nódulos de feijoeiro (Negro Argel), ao longo da ontogênese.

D.A.E.	Atividade de PEPcase		Atividade de GS		Atividade de nitrogenase	
	$\bar{X}$	σ^1	$\bar{X}$	σ^1	$\bar{X}$	σ^1
16	141	9.24	6.47	3.199	-	-
25	129	4.09	14.29	0.363	1.80	0.222
32	158	8.00	12.97	0.460	4.08	0.021
36	73	7.05	10.89	0.539	1.59	0.175
39	81	8.00	9.83	1.122	2.56	0.393
43	104	5.26	9.07	0.187	1.97	0.235
46	88	7.06	11.03	0.267	3.23	0.185
51	34	5.02	8.20	0.187	3.03	0.476
58	6	1.76	3.43	0.938	0.32	0.172
68	2	0.75	3.43	0.225	0.18	0.147
$\bar{X}_{cv}^2 =$	16,940		16,940		58,488	

1 - erro padrão da respectiva média

2 - média do coeficiente de variação

APÊNDICE 6. Conteúdo de nitrogênio nas partes raiz, caule+folha e vagens, em feijoeiro (Negro Argel), ao longo da ontogênese

D.A.E.	Conteúdo de N em raiz ¹		Conteúdo de N em caule+folha ¹		Conteúdo de N em vagens ¹	
	$\bar{X}$	σ	$\bar{X}$	σ	$\bar{X}$	σ
16	8.16	0.482	25.3	1.84	-	-
25	6.92	0.533	55.7	1.82	-	-
32	6.24	1.180	74.7	4.36	-	-
36	7.47	1.341	98.5	2.69	-	-
39	1.65	0.842	208.3	26.94	-	-
43	2.32	0.737	181.7	14.41	-	-
46	1.85	0.324	308.0	3.63	6.82	0.045
51	4.20	0.711	254.3	23.90	12.79	1.353
58	9.45	1.116	235.4	25.35	22.06	3.535
68	22.60	12.013	369.3	25.53	33.60	2.534
$\bar{X}_{cv}^2 =$	8.891		6.942		9.0495	

1 - erro padrão da respectiva média

2 - média do coeficiente de variação

APENDICE 7. Acúmulo de fitomassa nas partes raiz, caule+folha e vagens, em feijoeiro (Negro Argel), ao longo da ontogênese.

D.A.E.	Fitomassa da raiz		Fitomassa do caule+folha		Fitomassa das vagens	
	$\bar{X}$	σ^1	$\bar{X}$	σ^1	$\bar{X}$	σ^1
16	0.390	0.0033	0.69	0.032	-	-
25	0.323	0.0145	1.35	0.043	-	-
32	0.280	0.0120	1.83	0.161	-	-
36	0.313	0.0153	2.75	0.080	-	-
39	0.503	0.0115	5.17	0.497	-	-
43	0.470	0.0722	6.08	0.441	-	-
46	0.490	0.0841	7.79	0.141	1.84	0.066
51	0.667	0.0252	7.41	0.618	3.65	0.439
58	0.690	0.1150	5.01	1.178	7.36	0.407
68	0.883	0.0470	5.54	1.397	12.38	1.054
$\bar{X}_{cv}^2 =$	8.0144		6.238		7.5443	

1 - erro padrão da respectiva média

2 - média do coeficiente de variação

APÊNDICE 8. Número, peso da matéria fresca e peso médio dos nódulos de Caupi (BR-05), ao longo da ontogênese.

D.A.E.	Número de nódulos ¹		Matéria fresca denódulos ¹		Peso médio de nódulos (mg) ¹	
	$\bar{X}$	σ	$\bar{X}$	σ	$\bar{X}$	σ
16	-	-	-	-	-	-
31	67	2.9	0.46	0.018	6.92	0.00020
38	82	6.6	0.84	0.025	10.38	0.00108
45	151	6.2	1.57	0.093	10.41	0.00024
52	129	15	3.26	0.445	25.13	0.00047
57	151	15	3.85	0.269	25.76	0.00156
61	135	10	3.98	0.267	29.44	0.00063
68	179	32	5.92	0.491	35.82	0.00754
78	318	12	6.33	0.244	19.99	0.00110
88	213	20	8.04	0.147	38.60	0.00457
$\bar{X}_{cv}^2 =$	8,649		6.353		8.181	

1 - erro padrão da respectiva média

2 - média do coeficiente de variação

APENDICE 9. Atividade expressa por planta das enzimas
PEPcase, GS e nitrogenase de nódulos de Caupi
(BR-05), ao longo da ontogênese.

D.A.E.	Atividade da PEPcase		Atividade da GS		Atividade da nitrogenase	
	$\bar{X}$	σ^2_1	$\bar{X}$	σ^2_1	$\bar{X}$	σ^2_1
16	-	-	-	-	-	-
31	41	2.5	5.02	0.383	10.23	0.576
38	81	1.9	9.46	0.279	19.23	2.094
45	164	4.7	16.39	0.664	28.86	1.630
52	396	46.8	37.32	4.583	60.16	8.533
57	476	33.7	42.87	4.319	93.56	7.578
61	535	40.4	50.14	4.311	73.83	5.942
68	497	28.9	53.26	5.984	68.11	1.393
78	440	10.2	67.69	1.245	43.59	6.565
88	506	51.7	67.11	7.063	22.74	9.097
$\bar{X}_{cv}^2 =$	5.750		7.839		17.330	

1 - erro padrão da respectiva média

2 - média do coeficiente de variação

APÊNDICE 10. Atividade expressa por grama de nódulos das enzimas PEPcase, GS e nitrogenase de nódulos de Caupi (BR-05), ao longo da ontogênese.

D.A.E.	Atividade de PEPcase		Atividade de GS		Atividade de nitrogenase	
	$\bar{X}$	σ^1	$\bar{X}$	σ^1	$\bar{X}$	σ^1
16	-	-	-	-	-	-
31	90	3.44	10.79	0.405	22.07	0.916
38	97	1.97	11.28	0.442	22.82	2.051
45	105	3.97	10.47	0.246	18.39	0.281
52	122	3.65	11.52	0.314	18.83	2.354
57	124	0.80	11.10	0.457	24.27	0.593
61	134	2.80	12.58	0.235	18.84	2.375
68	84	2.70	9.01	0.831	11.66	2.070
78	69	1.13	10.72	0.344	6.98	1.307
88	62	5.22	8.37	0.939	2.82	1.136
$\bar{X}_{cv}^2 =$	3.742		4.762		15.050	

1 - erro padrão da respectiva média

2 - média do coeficiente de variação

APENDICE 11. Conteúdo de nitrogênio nas partes raiz, caule+folha e vagens, em Caupi (BR-05), ao longo da ontogênese

D.A.E.	Conteúdo de N em raiz ¹		Conteúdo de N em caule+folha ¹		Conteúdo de N em vagens ¹	
	$\bar{X}$	σ	$\bar{X}$	σ	$\bar{X}$	σ
16	5.23	0.477	14.8	3.611	-	-
31	3.03	0.197	19.6	0.886	-	-
38	4.39	0.227	56.4	0.950	-	-
45	6.24	0.574	107.5	4.639	-	-
52	12.35	0.424	182.8	12.101	-	-
57	11.57	1.225	225.9	24.359	-	-
61	20.57	1.544	248.0	17.005	-	-
68	18.57	0.543	309.7	36.234	-	-
78	25.27	2.070	451.3	34.011	17.34	8.704
88	24.93	1.199	472.4	42.280	89.48	39.766
$\bar{X}_{cv}^2 =$	6.831		9.179		41.350	

1 - erro padrão da respectiva média

2 - média do coeficiente de variação

APÊNDICE 12. Acúmulo de fitomassa nas partes raiz, caule+folha e vagens, em Caupi (BR-05), ao longo da ontogênese.

D.A.E.	Fitomassa da raiz		Fitomassa do caule+folha		Fitomassa das vagens	
	$\bar{X}$	σ^1	$\bar{X}$	σ^1	$\bar{X}$	σ^1
16	0.277	0.0033	0.63	0.037	-	-
31	0.183	0.0145	0.55	0.029	-	-
38	0.263	0.0120	1.32	0.025	-	-
45	0.450	0.0153	3.27	0.047	-	-
52	0.690	0.0115	5.70	0.312	-	-
57	0.647	0.0722	6.81	0.647	-	-
61	1.093	0.0841	8.89	0.731	-	-
68	0.930	0.0252	11.83	0.734	-	-
78	1.460	0.1150	16.99	1.676	0.36	0.1965
88	1.673	0.0470	24.38 ^a	1.319	2.63	1.0303
<hr/>						
$\bar{X}_{cv}^2 =$	5.1629		6.0049			

1 - erro padrão da respectiva média

2 - média do coeficiente de variação