EFICIÊNCIA DA FIXAÇÃO SIMBIÓTICA DO NITROGÊNIO x
EVOLUÇÃO DO H_2 x RESPIRAÇÃO DOS NÓDULOS
DE FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)

MARIANGELA HUNGRIA LIMA

Orientadora : DRA. ALAÍDES PUPPIN RUSCHEL

Dissertação apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Solos e Nutrição de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
dezembro, 1981

A minha mãe Leda,
pelo seu carinho e dedicação
Ao meu avô Acácio,
pelo seu apoio e atenção,
A minha avô Edina,
por ter me introduzido
no mundo da biologia
OFEREÇO

Ao Edu e
as minhas filhinhas,
Ana Carolina e
Marcela,
com muito amor
DEDICO

AGRADECIMENTOS

- à Dra. Alaidés Puppín Ruschel, pela orientação, incentivo e amizade durante todo o período de pesquisa e por ter me introduzido nos estudos sobre Fixação Simbiótica do Nitrogênio;

- à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de mestrado concedida;

- à Dra. Siu Mui Tsai Saito, pelo apoio durante o desenvolvimento da pesquisa;

- Ao Engenheiro Agrônomo Eduardo Lima, pelo auxílio, críticas e sugestões valiosas em todos os experimentos;

- À Iraci, Daciano e Francisco, da Seção de Microbiologia do Solo, pela amizade e auxílio nos experimentos;

- Aos colegas Marli, Roberto, Rafaela, Sônia, Paulo, Renato e Maurício, pelo companheirismo;

- Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, pelos materiais concedidos;

- Ao Dr. Eiche Matsui e ao Marco Aurélio, pelas análises de CO_2 e H_2 do quarto experimento;

- Ao Romeu e à Marli, pelos desenhos;

- Ao Engenheiro Florestal Walter Dihel, pelo auxílio nas análises estatísticas;

- À Sônia Novaes Rasera, pelo trabalho de datilografia e ao Benedito H. Davanzo pela composição da dissertação.

ÍNDICE

	<u>página</u>
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Histórico	4
2.2. O complexo enzimático da nitrogenase	5
2.2.1. MoFe proteína	5
2.2.2. Fe proteína	6
2.2.3. O cofator Mo (FeMoCO)	6
2.2.4. O transporte de elétrons para a nitrogenase	6
2.2.5. Interação dos componentes proteicos com substratos alternativos e inibidores	7
2.3. Metodologia no estudo da fixação biológica do nitrogênio .	11
2.3.1. A redução do acetileno	11
2.4. A economia de energia nos sistemas simbióticos fixadores de nitrogênio	15
2.4.1. O metabolismo do hidrogênio nos organismos fixado- res de nitrogênio	16
2.4.1.1. A evolução do hidrogênio	16
2.4.1.2. O papel da hidrogenase	18
2.4.2. A respiração nos sistemas simbióticos	24
2.5. Efeito do nitrogênio mineral na fixação biológica do H ₂ ..	27
2.6. Seleção de sistemas simbióticos mais eficientes	30
2.6.1. Papel das estirpes de <i>Rhizobium</i>	30
2.6.2. Papel da leguminosa hospedeira	32
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1. Plantas	37
3.2. Bactérias	38
3.2.1. Estirpes utilizadas	38
3.2.2. Expressão da hidrogenase in vivo	38
3.3. Instalação do experimento	42
3.3.1. Local da condução do experimento	42
3.3.2. Preparo dos vasos	42
3.3.3. Preparo do inoculante	44

3.3.4. Inoculação das sementes	44
3.3.5. Semeadura e condução do experimento	44
3.3.6. Colheita dos experimentos e determinação do teor de nitrogênio	45
3.4. Análise dos gases	46
3.4.1. Gases utilizados	46
3.4.2. Cromatografia gasosa	46
3.4.3. Espectrometria de massa	47
3.5. Procedimento para análise da redução de C_2H_2 e evolução de H_2 e de CO_2 pelos nódulos	47
3.5.1. Determinação da redução do C_2H_2 e evolução do H_2 usando sistemas intactos	47
3.5.2. Determinação da redução C_2H_2 em raízes destacadas .	49
3.5.3. Determinação da evolução do CO_2 por raízes nodula das	50
3.5.4. Determinação da evolução do H_2 e do CO_2 pelos nódu- los destacados	50
3.6. Delineamento estatístico	51
3.7. Cálculos	51
3.7.1. Cálculo do C_2H_4 , H_2 e CO_2 determinados por cromato- grafia gasosa	51
3.7.2. Cálculo do volume do frasco e do C_2H_4 produzido na presença de propano (usado como gás traçador)	52
3.7.3. Cálculo do H_2 e do CO_2 determinados por espectrome- tria de massa	53
3.7.4. Cálculo do N_2 (C_2H_2) fixado	53
3.7.5. Eficiência relativa dos elétrons destinados ao com- plexo enzimático da nitrogenase	54
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1. Experimento I	55
4.2. Experimento II	67
4.3. Experimento III	85
4.4. Experimento IV	119

4.5. Discussão geral	154
5. CONCLUSÃO	161
6. LITERATURA CITADA	164
APÊNDICES	182

RESUMO

EFICIÊNCIA DA FIXAÇÃO SIMBIÓTICA DO
NITROGÊNIO x EVOLUÇÃO DO H_2 x RESPIRAÇÃO DOS
NÓDULOS DE FEIJOEIRO (*Phaseolus vulgaris* L.)

Autora: Mariangela Hungria Lima

Orientadora: Alaidés Puppim Ruschel

Com o objetivo de estudar a eficiência da fixação simbiótica do nitrogênio em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) foram conduzidos quatro experimentos, nos anos de 1980 e 1981, no Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, São Paulo. Foram utilizadas quatro cultivares de feijoeiro (Carioca, Aroana, Moruna, Rio Tibagi e Venezuela-350) e 5 estirpes de *Rhizobium phaseoli* (C-05; C-29 = 127 K 17; C-40 = CIAT 255; C-88 = SEMIA 487 e C-89 = CIAT 57).

O primeiro experimento foi conduzido em câmara de crescimento em vasos de Leonard, enquanto que nos outros utilizou-se vasos de plásticos de capacidade de 2,5 l, e o experimento ocorreu em casa-de-vegetação. Determinou-se os parâmetros de peso de matéria seca e teor de nitrogênio durante o crescimento das plantas.

Como medida da eficiência da fixação do N_2 , estudou-se o gasto energético relacionado com a evolução do H_2 . Para isso, avaliou-se a atividade da nitrogenase (redução de C_2H_2) e evolução de H_2 dos nódulos. Para a avaliação da redução do C_2H_2 foram utilizados dois sistemas: plantas inteiras intactas e raízes noduladas destacadas. A evolução do H_2 foi determinada em nódulos destacados e em plantas inteiras intactas. Determinou-se então a eficiência relativa dos elétrons destinados ao complexo da nitrogenase (ER), isto é, os elétrons que são realmente utilizados na redução do N_2 e não na evolução do H_2 . Detectou-se também quais estirpes expressaram a atividade da hidrogenase unidirecional independente de ATP em meio de cultura.

Nos terceiro e quarto experimentos, realizou-se também a análise da evolução CO_2 por raízes noduladas e nódulos destacados, a fim de se verificar a eficiência respiratória dos sistemas simbióticos em estudo.

No quarto experimento, procurou-se verificar os efeitos da aplicação de pequenas doses iniciais de nitrogênio mineral (7 e 35 ppm de N como KNO_3) na eficiência da fixação do N_2 , visto que esse elemento sempre está presente no solo e pode inibir o processo de nodulação e fixação do nitrogênio.

Nas condições desses experimentos pode-se concluir que:

- a. Observou-se o efeito da cultivar de *P. vulgaris*, da estirpe de *R. phaseoli* e da interação cultivar x estirpe no peso de matéria seca e teor de nitrogênio da parte aérea, raiz, nódulos, vagens e sementes. Houve também influência na atividade da nitrogenase (redução de C_2H_2), na evolução do H_2 e na ER do complexo da nitrogenase.
- b. A presença da enzima hidrogenase na estirpe de bactéria não implicou necessariamente na maior eficiência delas na fixação do N_2 . A hidrogenase de *R. phaseoli* também não foi capaz de reciclar todo o H_2 produzido e a máxima ER encontrada foi de 0,89.
- c. A ER dentro de cultivares, a ER dentro de estirpes e a ER dos sistemas simbióticos nos primeiros estágios do ciclo da planta sempre apresentou uma relação positiva com o teor de nitrogênio da planta.
- d. Não se encontrou relação entre: peso dos nódulos e fixação do nitrogênio; peso dos nódulos e redução do C_2H_2 , observando-se grande variação da eficiência nodular entre cultivares e entre estirpes.
- e. Não houve relação entre o método de redução do C_2H_2 , analisado por cromatografia gasosa, e o teor de nitrogênio fixado, e isso foi atribuído ao desvio de elétrons utilizados na evolução do H_2 , que foi de 11% a 56%.
- f. A eficiência respiratória das raízes noduladas e dos nódulos destacados foi relacionada positivamente com o peso e teor de nitrogênio das

plantas e com a ER do complexo da nitrogenase.

- g. O melhor desempenho das estirpes e das cultivares foi relacionado positivamente com a maior ER e eficiência respiratória.
- h. A aplicação de pequenas doses iniciais de nitrogênio mineral favoreceu o acúmulo de matéria seca e de nitrogênio total, e não prejudicou a fixação do nitrogênio. Essas pequenas doses não afetaram a ER dos sistemas, mas aumentaram a eficiência respiratória das raízes noduladas.
- i. Existem sistemas simbióticos onde a principal limitação para o crescimento das plantas hospedeiras é a deficiência de nitrogênio, e em outros provavelmente é o suprimento de carbono.
- j. Os vasos de Leonard podem limitar o crescimento das plantas e prejudicar as pesquisas de seleção de *Rhizobium* em casa-de-vegetação.

SUMMARY

EFFICIENCY OF SYMBIOTIC NITROGEN FIXATION
X H_2 EVOLUTION X RESPIRATION BY THE BEAN
NODULES (*Phaseolus vulgaris* L.)

Author : Mariangela Hungria Lima

Adviser : Alaides Puppin Ruschel

There were conducted (at CENA, Piracicaba, São Paulo, Brazil), four experiments , in 1980 and 1981, to study the efficiency of symbiotic nitrogen fixation in beans (*Phaseolus vulgaris* L.). The bean cultivars utilized were Carioca, Aroana, Moruna, Rio Tibagi and Venezuela, 350; the *Rhizobium phaseoli* strains utilized were: C-05, C-29 =127 K 17, C-40 =CIAT 57, C-88 =SEMIA 487, C-89 =CIAT 255).

In the first experiment the plants were grown in Leonard jars and were kept in a growth chamber. The other experiments were conducted under greenhouse conditions, and the plants were grown in plastic pots of 2,5 l. The dry weight and total nitrogen content during the plant growth cycle were determinated.

The energetic cost of H_2 evolution was used as a parameter on the nitrogen fixation efficiency study. With this purpose, it was considered the analysis of nitrogenase activity (C_2H_2 reduction) and of H_2 evolution by the nodules. There were utilized two systems to measure nitrogenase activity : intact plants and detached nodulated roots. The H_2 evolution was measured on intact plant systems and with detached root nodules. From this, it was estimated the Relative Efficiency (RE) of electron transfer to N_2 via nitrogenase. It was also detected if the *Rhizobium* strains presented the hydrogenase activity on a proper medium.

In the third and fourth experiments it was measured the respiratory CO_2 efflux from freshly detached nodulated roots and from detached nodules, to calculate the respiratory efficiency of nitrogen fixation systems.

In the fourth experiment, the plants were supplied with low quantities of mineral nitrogen (7 and 35 ppm N as KNO_3), in order to evaluate the effect of this element on the efficiency of nitrogen fixation, since the nitrogen is always present in soils and can inhibit plant nodulation and nitrogen fixation.

Under the conditions of these experiments, it can be said that:

- a. There was an effect due to the *Phaseolus* cultivar, an effect due to the *Rhizobium phaseoli* strain and an effect due to the interaction cultivar X strain, on dry weight and total nitrogen content of aerial parts of plants, roots, nodules, pods and seeds. There was also an influence on nitrogenase activity (C_2H_2 reduction), on H_2 evolution and on the RE of nitrogenase system.
- b. The detection of hydrogenase uptake, ATP independent, from the strain was not always related with the higher nitrogen plant content. The *Rhi*zobium *phaseoli* hydrogenase failed to recicle all the H_2 produced via nitrogenase, and the maxim RE found was 0,89.
- c. The RE between cultivars, the RE between strains and the RE between symbiotic systems in the first stage of plant growth, were always positively related with the total plant nitrogen content.
- d. There was no relation between : dry weight of nodules and nitrogen fixation ; dry weight of nodules and C_2H_2 reduction. There was great variability on nodule nitrogen fixation efficiency , influenced by both cultivars and strains.

- e. There was no relation between the results obtained by the method of C_2H_2 reduction, analysed by gas chromatography, and the nitrogen plant content. This was probably due to the lost of electrons on the H_2 evolution. The lost of electrons ranged from 11% to 56%.
- f. The respiratory efficiency of detached nodulated roots and detached nodules was positively related with the dry weight and nitrogen plant content, and was also positively related with RE of nitrogenase system.
- g. The good performance of the strains was positively related with RE and respiratory efficiency of the nodules; the good performance of the cultivars was positively related with RE and respiratory efficiency of nodules and nodulated roots.
- h. The supply with low quantities of mineral nitrogen in the beginning of plant growth cycle favoured the increase of dry weight and plant nitrogen content, and it was not disadvantageous to nitrogen fixation. This low supply of nitrogen didn't affect the RE of the symbiotic systems, but increased the respiratory efficiency of nodulated roots.
- i. There are symbiotic systems where the main limitation to host plant growth in the beginning of plant growth cycle is the deficiency of nitrogen, while in other systems the main limitation to host plant growth probably is the supply of carbon.
- j. The conduction of experiments in Leonard jars may limit the plant growth and prejudice the research about *Rhizobium* selection under greenhouse conditions.

1. INTRODUÇÃO

A população crescente do mundo, exigindo um aumento na oferta de alimentos, e os problemas relacionados ao fornecimento e disponibilidade de fontes fósseis, conduziram as pesquisas no sentido de aumentar a produtividade agrícola com menores gastos energéticos. Neste quadro, o fertilizante nitrogenado representa um dos fatores limitantes na agricultura moderna, não só pela importância desse elemento para se obter um incremento na produção de alimentos, como também pelo alto custo energético relacionado com a sua fabricação (BURNS e HARDY, 1975; BRILL, 1977, 1979).

Uma grande parte do nitrogênio necessário à agricultura é fornecido por alguns microrganismos que realizam a conversão do nitrogênio atmosférico em amônia, e a importância desse processo é ainda maior nos países em desenvolvimento, cuja agricultura requer minimização de investimentos para permanecer economicamente viável (BRILL, 1979; DÖBEREINER e DUQUE, 1980):

O feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) é a leguminosa mais utilizada na alimentação dos povos sul americanos e o Brasil, embora se situe entre os três maiores produtores mundiais de feijão, apresenta uma das mais baixas produtividades, de 519 kg/ha, tendo-se verificado também uma queda na produção e na produtividade brasileiras nos últimos anos. Para isso contribuem diversos fatores fisiológicos da cultura, baixo nível tecnológico e baixa utilização de insumos (FAO, 1978; ANÔNIMO,

1980; SANDERS e SCHWARTZ, 1980).

Os estudos visando o aumento da produção de feijão através da fixação simbiótica do nitrogênio, porém, têm provado que é possível se obter uma produtividade de até 1600 kg/ha sem a utilização de adubos nitrogenados, surgindo como uma perspectiva promissora na agricultura dos países em desenvolvimento (DÖBEREINER e DUQUE, 1980).

Para que ocorra a redução do nitrogênio atmosférico, há um considerável gasto de energia e poder redutor, e nas leguminosas ambos são fornecidos pelo catabolismo respiratório dos fotossintatos da planta hospedeira. Desse modo, o potencial da fixação simbiótica do nitrogênio tem sua principal limitação no suprimento energético pela planta hospedeira. Por outro lado, a elevada demanda de fotossintatos para a realização desse processo pode reduzir diretamente o potencial das leguminosas hospedeiras (SCHUBERT e RYLE, 1980; MINCHIN *et alii*, 1981).

Conseqüentemente, as pesquisas devem ser dirigidas para estudos relativos à eficiência da conversão do nitrogênio atmosférico a amônia ou para estudos que permitam um aumento da capacidade fotossintética da planta (SCHUBERT e RYLE, 1980).

Como hipótese deste trabalho, coloca-se que o feijoeiro pode fixar nitrogênio em quantidades capazes de suprir todas as suas necessidades, mas o estudo sobre a eficiência energética nesse sistema simbiótico é essencial para se obter incrementos no nitrogênio fixado.

Incluem-se, entre os fatores que podem melhorar essa eficiência energética:

- a. Seleção de sistemas simbióticos onde a perda de energia pela evolução do hidrogênio seja menor (SCHUBERT e EVANS, 1976, 1977).
- b. Seleção visando obter maior economia na respiração de raízes noduladas (MAHON, 1977a, 1977b).

- c. Seleção de sistemas com alta eficiência de conversão do nitrogênio atmosférico em amônia na presença de pequenas doses de nitrogênio mineral, uma vez que este sempre está presente no solo e pode inibir o processo da fixação biológica (GIBSON, 1981b).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico

Antoine Laurent Lavoisier denominou o nitrogênio de "azoto" que significa "sem vida", pois acreditava-se que esse elemento não participava do metabolismo dos seres vivos. Hoje, porém, sabe-se que o nitrogênio é necessário em grandes quantidades para todas as formas de vida (BRILL, 1979).

A importância das leguminosas para a fertilidade dos solos foi reconhecida desde os tempos pré-históricos, cerca de 6000 anos A.C. Há citações sobre o seu uso em rotações de cultura na China (5000 anos A.C.), no Egito antigo, na Grécia e no império romano (BURRIS, 1974a).

Embora houvesse suspeitas sobre a fixação de nitrogênio pelas leguminosas, foi Jean Baptiste Boussingault que, em 1837, forneceu a prova conclusiva ao mundo científico, conduzindo um experimento em solo isento de nitrogênio e verificando que ao cultivar ervilha, trigo e aveia, somente a primeira aumentava suas quantidades de nitrogênio. O botânico russo Woronin havia encontrado bactérias nos nódulos radiculares de leguminosas e Hellriegel e Wilfarth, em 1886, estabeleceram a relação entre a fixação de nitrogênio e as bactérias nos nódulos radiculares das leguminosas (BURRIS, 1974a; WILSON, 1976).

Nos anos que se seguiram os estudos se concentraram na natu

reza dos organismos e suas aplicações agrônômicas, e poucos estudos foram realizados até os últimos anos da década de 20. WILSON *et alii* (1937) e WILSON (1940) realizaram alguns dos primeiros estudos bioquímicos, estabelecendo o km para a redução do N_2 , a influência do O_2 e a inibição competitiva pelo H_2 .

A sensibilidade da nitrogenase ao O_2 e as necessidades energéticas para a fixação do N_2 foram, durante muito tempo, grandes obstáculos ao estudo bioquímico e fisiológico sobre a fixação biológica do nitrogênio. CARNAHAN *et alii* (1960) finalmente isolaram o primeiro extrato de células livres que fixou nitrogênio, usando o anaeróbico obrigatório *Clostridium pasteurianum*.

Deve-se ainda salientar que um grande impulso para os estudos bioquímicos e fisiológicos foi dado por duas descobertas importantes: BULEN *et alii* (1965) provaram que o ditionito de sódio é um redutor adequado para substituir o sistema fosforoclástico pirúvico, o qual é muito instável e complexo; DILWORTH (1966) e SCHÖLLHORN e BURRIS (1967) verificaram que a nitrogenase reduz o acetileno a etileno que, segundo método proposto por HARDY *et alii* (1968), poderia ser facilmente analisado por cromatografia gasosa em concentração de nanomoles.

2.2. O complexo enzimático da nitrogenase

A nitrogenase é um sistema enzimático com dois componentes proteicos, a Fe proteína e a MoFe proteína, e que cataliza a redução do N_2 a NH_3 ou NH_4^+ , além da redução de muitos outros substratos particularmente os isômeros do N_2 (BURRIS, 1966; LJONES, 1974; WINTER e BURRIS, 1976).

Até hoje, só se conhece organismos fixadores procarióticos e, embora eles pertençam a diversas classes fisiológicas, as propriedades de suas nitrogenases são muito semelhantes (YATES, 1980).

2.2.1. MoFe proteína

Acredita-se que as MoFe proteínas sejam tetrâmeros heteroméricos de subunidades do tipo $\alpha_2\beta_2$, ou seja, elas têm 4 subunidades de dois

tipos diferentes. Os pesos moleculares estão entre 200.000 e 270.000 e apresentam teores metálicos de 18-38 g átomos Fe/mol de tetrâmero, 1,3-2,0 g átomos Mo/mol e 16,7-28,0 g átomos de S^{-2} /mol. A MoFe proteína se liga aos substratos, sendo por isso chamada de dinitrogenase (WINTER e BURRIS, 1976; LOWE *et alii*, 1980; YATES, 1980).

2.2.2. Fe proteína

Todas as Fe proteínas ou componentes II possuem subunidades do tipo α_2 , compreendendo 2 subunidades idênticas. Os pesos moleculares das Fe proteínas estão entre 55.000-72.600, com teores metálicos de 3,1-4,0 g átomos Fe/mol, 2,4-3,9 g átomos S^{-2} /mol, provavelmente como uma estrutura $[4 Fe 4 S]$. Há consideráveis evidências de que é a Fe proteína que transfere elétrons *in vitro* de doadores de elétrons químicos ou biológicos, para a MoFe proteína, sendo por isso também chamada de redutase da nitrogenase (WINTER e BURRIS, 1976; YATES, 1980; BURRIS *et alii*, 1981).

2.2.3. O cofator Mo (FeMoco)

NICHOLAS (1963) e PATEMAN *et alii* (1964) apresentaram as primeiras evidências de que algumas molibdoenzimas possuíam um cofator que tinha Mo. SHAH e BRILL (1977), estudando a MoFe de proteína de *Azotobacter vinelandii*, conseguiu isolar um cofator de baixo peso molecular contendo Fe e Mo (FeMoco), muito instável ao O_2 e, segundo RAWLINGS *et alii* (1978), sem estruturas $[4 Fe 4 S]$. Atualmente acredita-se que o FeMoco possua uma estrutura 4 Fe Mo 4 S, que seria o sítio de redução do N_2 (MORTENSON e THORNELEY, 1979; YATES, 1980).

2.2.4. O transporte de eletrons para a nitrogenase

A redução do N_2 a NH_3 ou NH_4^+ exige um redutor, uma fonte de elétrons, carregadores de elétrons com potencial redox suficientemente baixo (como as ferredoxinas e flavodoxinas), um sistema gerador de ATP, Mg^{2+} como ativador, todos funcionando sob anaerobiose. O MgATP se prende à Fe proteína e nela induz uma mudança conformacional que provoca o abaixamento do potencial redox, havendo então a transferência de um elétron para o

FeMoco, que se liga ao substrato e o reduz (LJONES e BURRIS, 1978; MORTENSON e THORNELEY, 1979), como pode ser visto na Figura 1.

Presume-se que os dois componentes da nitrogenase devam formar um complexo, provavelmente transitório, que permita a transferência de elétrons (BURRIS *et alii*, 1981), tendo sido citado um completo 1:1 (EADY, 1973), e um complexo 2:1 (HAGEMAN e BURRIS, 1978), embora essas diferenças possam refletir distinção entre espécies, a existência de ambos os complexos ou ainda uma alteração na presença de substratos diferentes.

2.2.5. Interação dos componentes proteicos com substratos alternativos e inibidores

Como já foi dito, a nitrogenase cataliza a redução de diversos substratos, como pode ser visto na Tabela 1, havendo consideráveis evidências de que a redução desses substratos ocorre em sítios diferentes ou devido a diferenças conformacionais da enzima (BURRIS, 1979; YATES, 1980). O estudo dos substratos e inibidores é muito importante para o entendimento dos mecanismos de ação e sítios da nitrogenase.

WILSON *et alii* (1937) realizaram as primeiras observações de que hidrogênio era um inibidor específico e competitivo do N_2 na fixação, embora não iniba a redução de N_3^- , C_2H_2 , CN^- e metilisocianina (HWANG *et alii*, 1973; BURRIS, 1979). Desse modo os prótons, presumivelmente da água, são um segundo substrato natural e a enzima evolui H_2 independentemente da adição de um substrato reduzível.

LIND e WILSON (1941) apontaram o CO como inibidor específico e não competitivo de todos os substratos, exceto os prótons (RIVERA-ORTIZ e BURRIS, 1973). O N_2O (MOLMAR *et alii*, 1948) e o NO (BURRIS, 1979) são inibidores competitivos de N_2 .

DILWORTH (1966) e SCHOLLHORN e BURRIS (1967) descobriram que o C_2H_2 era um inibidor de N_2 . DILWORTH (1966) e HWANG *et alii* (1973) descobriram que essa inibição era não competitiva, embora o N_2 fosse inibidor competitivo do C_2H_2 (RIVERA-ORTIZ e BURRIS, 1975). O C_2H_2 também inibe a evolução do H_2 , embora não seja inibido por ela (HWANG *et alii*, 1973).

Figura 1. Vias de transferência de elétrons para o sistema nitrogenase e hipóteses para os sítios da nitrogenase (Adaptado de BURRIS, 1979 e BURRIS *et alii*, 1981).

Tabela 1. Relação dos substratos catalizados pela nitrogenase (YATES, 1980).

	subprodutos
1. $N_2 + 6H^+ + 6e^- \longrightarrow 2 NH_3$	
2. $CH_3N \equiv C + 6H^+ + 6e^- \longrightarrow CH_4 + CH_3 NH_2$	C_2H_4
3. $HCN + 6H^+ + 6e^- \longrightarrow CH_4 + NH_3$	C_2H_6
4. $HCN + 4H^+ + 6e^- \longrightarrow CH_3 NH_2$	
5. $HN_3 + 2 H^+ + 2e^- \longrightarrow N_2 + NH_3$	
6. $N_2O + 2 H^+ + 2e^- \longrightarrow N_2 + H_2O$	
7. $C_2H_2 + 2 H^+ + 2e^- \longrightarrow C_2H_4$	
8. $2 H^+ + 2e^- \longrightarrow H_2$	
9.	
$ \begin{array}{c} \text{H}_2 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{HC} = \text{CH} \end{array} \xrightarrow[H^+]{e^-} \begin{array}{c} \text{H}_2 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{H}_2\text{C} - \text{CH}_2 \end{array} + \text{CH}_3\text{CH} = \text{CH}_2 $	

outros substratos incluem:

$CH_2 = CHCN$; $C_2H_5 N = C$; $CH_2 CN$; $C_2H_5 CN$; $CH_3CN = CH CN$;

$CH_2 = CH CH_2 CN$; trans - $CH_3 CHO CH CN$;

$CH_2 = C (CH_3) CN$; $C_4H_9 CN$

Outros inibidores incluem HCN, nitrato hidroxilamina, hidrazina, inibidores da cadeia respiratória e da fotossíntese, Mg ADP, etc. (BURRIS, 1979; YATES, 1980). Na Tabela 2 podemos ver um resumo dos estudos com substratos e inibidores.

Tabela 2. Interações entre substrato e inibidores da nitrogenase (RIVERA-ORTIZ e BURRIS, 1975).

Substra to	Inibidor							
	N_2	N_2^-	C_2H_2	HCN	N_2O	H_2	CO	$CH_3 NC$
N_2			NC	NC	C	C	NC	
N_3^-			NC	C		NI	NC	C
C_2H_2	C	NC		NC	NC	NI	NC	
HCN	I	C	A		A	A	NC	
H^+	I	I	I	I	I	NI	NI	I

C - inibição competitiva

NC - inibição não competitiva

NI - não inibe

I - inibe

A - aumenta

A partir desses estudos, HWANG *et alii* (1973) e LJONES (1974) propuseram a existência dos seguintes sítios ou modificações dos sítios para a ligação dos substratos e inibidores:

1. Sítio do N_2 , H_2 , N_2O
2. Sítio do N_3^- , HCN e $CH_3 NC$
3. Sítio do C_2H_2

4. Sítio do CO

5. Sítio do H^+ (evolução do H_2), que requer mais clareza.

2.3. Metodologia no estudo da fixação biológica do nitrogênio

Uma das maiores dificuldades no estudo da fixação biológica do nitrogênio reside em encontrar uma metodologia adequada para a sua detecção e avaliação.

Os primeiros estudos baseavam-se na simples observação do crescimento das plantas em meios supostamente isentos de nitrogênio. Esse método histórico, embora bastante rudimentar, conduziu às primeiras observações da existência dos sistemas simbióticos. Com o progresso no estudo das análises químicas, iniciou-se a avaliação através do teor de nitrogênio total no tecido, pelo método Kjeldahl ou Dumas, mas que só pode ser utilizado em sistemas fixadores muito ativos, uma vez que não detecta diferenças menores do que 1% (BURRIS e WILSON, 1957). Além disso, muitos microrganismos conseguem utilizar NH_3 e N-óxido de ar, provocando aumentos no teor de N que não são devidos à fixação (POSTGATE e HILL, 1979).

A análise gasométrica de $^{15}N_2$ em espectrômetro de massa é um método direto, seguro e cerca de cem vezes mais sensível do que o método Kjeldahl (MOZEN e BURRIS, 1954), embora sua aplicação seja restrita devido à aparelhagem sofisticada, custo elevado do material e utilização em poucas plantas. Essas duas desvantagens, porém, foram parcialmente superadas pelo método de diluição isotópica com ^{15}N (VOSE *et alii*, 1981). O uso do ^{13}N , embora dê resultados, fica restrito devido à sua meia vida extremamente curta, de apenas dez minutos (CAMPBELL *et alii*, 1967). Outros métodos utilizados são a medida da leghemoglobina, estudos da frequência, competição e inoculação com *Rhizobium*, além de outros (SPRENT, 1979).

2.3.1. A redução do acetileno

O maior impulso na metodologia da fixação do nitrogênio, po

rêm, foi dado pela descoberta de que o acetileno (C_2H_2) inibia a redução de N_2 em *Clostridium pasteurianum* (DILWORTH, 1966; SCHÖLLHORN e BURRIS, 1967). Essa inibição é não competitiva, e a nitrogenase reduz o C_2H_2 a etileno (C_2H_4) em uma reação análoga à redução do N_2 (DILWORTH, 1966). Tanto o consumo de ATP (HARDY e KNIGHT, 1966; MOUSTAFA e MORTENSON, 1967) como a ativação energética da nitrogenase (HARDY *et alii*, 1968; BURNS, 1969) independem do substrato presente, mas somente ATP pode ser usado como fonte de energia para o sistema (HARDY *et alii*, 1968).

HARDY e KNIGHT (1967) sugeriram então que a redução do C_2H_2 a C_2H_4 poderia ser usada em uma nova metodologia de medida da atividade da nitrogenase, uma vez que o C_2H_4 poderia ser medido com rapidez e precisão em cromatógrafo gasoso.

As reações catalizadas pela nitrogenase podem ser representadas da seguinte maneira:

Hã, portanto uma relação teórica de 3:1, que permite a quantificação da taxa de fixação de N_2 (MATERSON e MURPHY, 1980).

De acordo com os estudos de HARDY *et alii* (1968), o km para C_2H_2 está entre 0,025 e 0,20, mas já foram encontrados valores tão elevados quanto 0,74 em *Beijerinckia* (SPIFF e ODU, 1973), não se podendo portanto pré-determinar as concentrações nos experimentos (MASTERSON e MURPHY, 1980).

A seguir, tentar-se-ã relacionar as principais vantagens e desvantagens desse método tão largamente utilizado nos estudos da fixação:

- Vangatens analíticas

1. Grande sensibilidade, sendo 10^3 vezes mais sensível do que o uso de $^{15}N_2$ e 10^6 vezes mais sensível do que o método Kjeldahl, conseguindo de tectar até $< 1 \mu\text{mole } C_2H_4/\text{amostra}$ (HARDY *et alii*, 1968).

2. Facilidade de manipulação, estabilidade do produto permitindo sua estocagem; rapidez das análises; transporte fácil do aparelho, permitindo maior flexibilidade nos experimentos; baixo custo do aparelho (HARDY *et alii*, 1968; BODDEY, 1980a).
3. O C_2H_2 é o padrão natural interno, facilitando sua medida e a conversão dos resultados é fácil. Há também a especificidade do aparelho, pois o C_2H_4 é separado do CH_4 , C_2H_2 e C_2H_6 (HARDY *et alii*, 1968).
4. Os experimentos têm mostrado que há boa correlação entre o teor de N total das plantas e o C_2H_4 produzido. BERGERSEN (1970), por exemplo, encontrou $r = 0,78$ e $r = 0,89$ entre esses dois parâmetros.

- *Vantagens biológicas*

1. Permite a análise sem a destruição do material (MASTERSON e MURPHY, 1980).
2. A reação de redução do C_2H_2 apresenta as mesmas necessidades energéticas da redução de N_2 (MOUSTAFA e MORTENSON, 1967).
3. A redução do C_2H_2 ocorre em todos os organismos já pesquisados e nenhum outro produto além do C_2H_4 é produzido e este é estável, não sendo metabolizado para formas orgânicas e inorgânicas de nitrogênio (HARDY *et alii*, 1968).
4. A produção de C_2H_4 na ausência de C_2H_2 normalmente é baixa (HARDY *et alii*, 1968).

- *Desvantagens*

1. Embora o C_2H_2 e o N_2 sejam isoeletrônicos e tenham dimensões moleculares iguais, o C_2H_2 é cerca de 65 vezes mais solúvel em água (BERGERSEN, 1970).
2. O C_2H_2 pode diferir do N_2 em suas habilidades de atravessar as membranas lipoproteicas (BERGERSEN, 1970).

3. Os substratos são metabolicamente diferentes, pois o NH_3 é convertido em proteínas e o C_2H_4 geralmente não é alterado (BERGERSEN, 1970), com excessão da sua oxidação pelas bactérias do metano (De BONT e MULDER, 1974) e da sua decomposição na rizosfera do arroz (DÖBEREINER, 1974).
4. A ausência da síntese de compostos nitrogenados intermediários e as concentrações muito baixas de NH_3 podem resultar em uma derepressão na síntese da nitrogenase, conduzindo a uma maior atividade enzimática e uma relação elevada $\text{C}_2\text{H}_2 : \text{N}_2$ (HARDY *et alii*, 1973; YATES e EADY, 1980).
5. O N_2 não satura a enzima nitrogenase (RIVERA-ORTIZ e BURRIS, 1975) e sob condições normais há a redução de H^+ e H_3O^+ a H_2 com gasto de energia e desvio de até 60% dos elétrons destinados à nitrogenase (SCHUBERT e EVANS, 1976). Essa reação ocorre simultaneamente com a redução de todos os substratos, exceto C_2H_2 , resultando em uma superestimativa do nitrogênio fixado, em altas relações $\text{C}_2\text{H}_2 : \text{N}_2$ (HARDY *et alii*, 1973; KNOWLES, 1981). Por outro lado, há relatos de decréscimo das relações $\text{C}_2\text{H}_2 : \text{N}_2$ com a idade da planta, atingindo valores entre 0,2 - 0,8, o que ainda exige mais estudos (KNOWLES, 1981).
6. O C_2H_2 inibe a hidrogenase independente de ATP de diversos microrganismos, prejudicando as bactérias que têm necessidade dessa fonte de energia para o seu crescimento (KNOWLES, 1981), embora RUIZ-ARGÜESO *et alii* (1979b) tenham verificado que em bacteróides de *Rhizobium* não houve inibição.
7. O C_2H_4 pode ser produzido por plantas, fungos e bactérias de solo, bem como existem bactérias capazes de oxidá-lo e causar o seu desaparecimento (De BONT e MULDER, 1974), sendo necessário controlar as condições do experimento.
8. A redução do C_2H_2 só mede a atividade enzimática momentânea, e o cálculo do N_2 fixado durante todo o ciclo da planta só pode ser realizado pela integração de muitos ensaios e sob as mesmas condições ambientais, portanto muito sujeito a erros (MASTERSON e MURPHY, 1980).

Apesar de todas essas desvantagens, deve-se salientar que o

método da redução do C_2H_2 representa um dos eventos mais importantes na pesquisa da fixação biológica do nitrogênio, uma vez que permitiu a rapidez das análises, o uso em larga escala sob condições de campo, a detecção de novos sistemas fixadores e forneceu valiosas informações sobre a ecologia dos organismos fixadores de nitrogênio (HARDY *et alii*, 1968; MASTERSON e MURPHY, 1980).

Deve-se tomar cuidado, porém, com a conversão para valores de N-fixado. Os valores $C_2H_2 : N_2$ mais frequentemente relatados estão próximos de 4:1 (HARDY *et alii*, 1973; BURRIS, 1975), alguns dos quais podem ser vistos na Tabela 3.

Tabela 3. Fator de conversão $C_2H_2 : N_2$ para algumas leguminosas fixando N_2 .

Espécie de leguminosa	Fator de conversão $C_2H_2:N_2$ reduzidos		Referência
	variação	média	
<i>Glycine max</i>	2,7-4,2	3,3	BERGERSEN (1970)
	5,4-8,4	6,6	HARDY <i>et alii</i> (1973)
<i>Pisum arvensis</i>	1,7-3,5	2,6	HARDY <i>et alii</i> (1973)
<i>Trifolium subterraneum</i>	1,5-2,7	2,6	HARDY <i>et alii</i> (1973)
<i>Pisum sativum</i>		2,9	MASTERSON e MURPHY (1976)
<i>Vicia faba</i>		2,9	MASTERSON e MURPHY (1976)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	7,3-8,3	7,8	SAITO <i>et alii</i> (1980b)

2.4. A economia de energia nos sistemas simbióticos fixadores de nitrogênio

Como já foi dito, na redução do N_2 a NH_3 ou NH_4^+ requer ATP e equivalentes redutores, que são fornecidos pelo metabolismo da planta hospedeira.

Há consideráveis evidências de que é o suprimento de fotossintatos para o sistema fixador de N_2 que frequentemente limita a capacidade de fixação dos sistemas simbióticos (HARDY e HAVELKA, 1974, 1975, 1976; HAVELKA e HARDY, 1974; CHING *et alii*, 1975). O processo de fixação do N_2 , por sua vez, é o responsável pelo desvio de 10-30% das fontes de carbono assimiladas pela planta, podendo reduzir consideravelmente a produção de matéria seca (SCHUBERT e RYLE, 1980). Desse modo, torna-se essencial aumentar a produção dos fotossintatos ou permitir o seu uso mais eficiente (HARDY e HAVELKA, 1976).

Dentre os fatores que apresentam um papel marcante na economia energética da fixação de N_2 , podemos citar: evolução do H_2 e presença de hidrogenase (HARDY e HAVELKA, 1975), respiração associada a fixação (MAHON, 1977a, 1977b) e tipo de composto nitrogenado exportado (MINCHIN *et alii*, 1981). A seguir serão discutidos os dois primeiros fatores.

2.4.1. O metabolismo do hidrogênio nos organismos fixadores de nitrogênio

2.4.1.1. A evolução do hidrogênio

Algumas propriedades do sistema nitrogenase foram descobertas antes mesmo de se conseguir o seu isolamento. Dentre as descobertas está a relatada por WILSON *et alii* (1937), de que o H_2 inibia a fixação do N_2 de um modo específico (pois inibia o uso do N_2 , mas não inibia o uso de N-combinado) e a de LEE e WILSON (1943), que relacionaram a atividade da hidrogenase com a fixação de N_2 em *Azotobacter vinelandii*. Apesar dessas primeiras observações sobre o metabolismo do hidrogênio e a fixação de nitrogênio, foram HOCH *et alii* (1957) que demonstraram, utilizando espectrometria de massa, que os nódulos de soja evoluíram H_2 em um processo dependente de oxigênio, o que também foi confirmado por BERGERSEN (1963).

Os estudos de caracterização do sistema nitrogenase de diversos organismos constatarem, posteriormente, que as enzimas nitrogenases purificadas de diferentes microrganismos reduzem o H^+ ou H_3O^+ , sempre dis-

poníveis em meio aquoso, havendo a formação de H_2 (BULEN *et alii*, 1965; BURNS e HARDY, 1975; WALKER e YATES, 1978). Essa redução utiliza elétrons e ATP que, de outro modo, seriam usados para a redução do N_2 , havendo uma considerável perda de energia quando o H_2 é liberado na atmosfera, essa reação sendo então denominada de "ciclo-fútil" (SCHUBERT e EVANS, 1977; BURRIS, 1979; YATES, 1980). Os estudos cinéticos mostram que, mesmo em pressões infinitas de N_2 ainda ocorre alguma produção de H_2 . O C_2H_2 é o único substrato que, em altas concentrações, consegue inibir completamente a redução de protons (RIVERA-ORTIZ e BURRIS, 1975).

Inicialmente BURNS e HARDY (1975) sugeriram que não haveria produção de H_2 dependente de ATP *in vivo*, mas SCHUBERT e EVANS (1976) evidenciaram que *in vivo*, a evolução do H_2 poderia provocar um desvio de 40%-60% dos elétrons destinados à nitrogenase. Embora esses valores tenham sido reduzidos posteriormente para 30% (EVANS *et alii*, 1977), representam uma considerável perda de energia não reutilizada (SCHUBERT e EVANS, 1976; SCHUBERT e EVANS, 1977; EVANS *et alii*, 1981), com a hidrólise de cerca de 4 ATP e $2e^-$ por mol de H_2 produzido (CHING *et alii*, 1975; WINTER e BURRIS, 1976; EVANS *et alii*, 1980; PATE *et alii*, 1981). A energia perdida por esse processo pode ser comparável à energia perdida pela fotorrespiração em plantas C_3 e, segundo BERGERSEN (1967) e DIXON (1972), haveria a produção de 1,5 moles H_2 : 1 mol NH_4 produzido.

Como o C_2H_2 inibe a evolução do H_2 (SMITH *et alii*, 1976) essa metodologia empregada no estudo da fixação de N_2 pode ser bastante falha e SCHUBERT e EVANS (1976) sugeriram que se utilizasse um novo parâmetro denominado "Eficiência Relativa" (ER), que representaria a fração dos elétrons destinados à nitrogenase e que realmente fossem utilizados na redução de N_2 . Alguns dos valores ER encontrados podem ser vistos na Tabela 4.

Tabela 4. Eficiência Relativa ^{a/} de alguns sistemas simbióticos.

Espécie	ER		Referência
	variação	média	
<i>Glycine max</i>		0,52	SCHUBERT e EVANS (1976)
	0,6-0,8	0,70	SMITH <i>et alii</i> (1976)
	0,41-1,0	0,70	CARTER <i>et alii</i> (1978)
<i>Medicago sativa</i>	0,65-0,83	0,74	RUIZ-ARGÜESO <i>et alii</i> (1979a)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	0,6-0,8	0,70	BETHLENFALVAL e PHILLIPS (1977)
	0,65-0,68	0,66	SAITO <i>et alii</i> (1980b)
<i>Phaseolus aureus</i>		0,82	SCHUBERT e EVANS (1976)
<i>Pisum sativum</i>	0,45-0,80	0,62	RUIZ-ARGÜESO <i>et alii</i> (1978)
<i>Trifolium subterraneum</i>	0,51-0,75	0,63	RUIZ-ARGÜESO <i>et alii</i> (1979c)
<i>Vigna unguiculata</i>		0,99	SCHUBERT e EVANS (1976)

$$\text{a/ } ER = 1 - \frac{H_2 \text{ evoluído (ar)}}{C_2H_2 \text{ reduzido}} \quad (\text{SCHUBERT e EVANS, 1976})$$

2.4.1.2. O papel da hidrogenase

PHELS e WILSON (1941) já citaram a existência de hidrogenase nos nódulos de ervilha. Diz-se que hidrogenase é a enzima que cataliza a remoção de elétrons do H_2 ou a redução do H_2 (YATES, 1980). Os estudos posteriores estabeleceram os seguintes papéis para as hidrogenases dos sistemas simbióticos:

1. Mecanismo auxiliatório de proteção respiratória, retirando o O_2 do ambiente próximo à nitrogenase (DIXON, 1972; EMERICH *et alii*, 1979; RUIZ-ARGÜESO *et alii*, 1979c), principalmente sob condições de baixo fornecimento de fontes de carbono (WALKER e YATES, 1978).
2. Impedir que o H_2 evoluído pela nitrogenase venha a inibi-la (DIXON,

1972), o que contudo não foi confirmado por WALKER e YATES (1978).

3. Melhorar a eficiência da nitrogenase, pois oxida o H_2 evoluído, em uma reação independente de ATP, resultado como produtos H^+ e ATP (DIXON, 1967, 1968, 1972, 1975; EMERICH *et alii*, 1979). Essa reciclagem de H_2 produzindo ATP representa, portanto, um mecanismo de economia dos substratos de carbono (Mc RAE *et alii*, 1978).

Esse terceiro papel será agora discutido, devido a sua grande importância, uma vez que pode recuperar parte da energia perdida pela evolução do H_2 (DIXON, 1972, 1976; EVANS *et alii*, 1980).

DIXON (1972), sugeriu que a hidrogenase de *Rhizobium* estaria localizada no nódulo ligada à membrana celular, numa reação dependente da absorção de O_2 sendo verificado posteriormente que ela está localizada dentro dos bacteróides e não no citossol (RUIZ-ARGUESO *et alii*, 1979b).

A importância da hidrogenase que capta o hidrogênio, realizando a sua oxidação e produzindo ATP (hidrogenase uptake-hup), parece ser importante principalmente em baixos níveis de irradiância (BETHLENFALVAY e PHILLIPS, 1977, 1979) ou qualquer outra condição de limitação de fotossintatos ou outra fonte de energia (DIXON, 1976, 1978). Segundo BETHLENFALVAY e PHILLIPS (1977), a diminuição da evolução do H_2 sob limitação de carbono poderia ocorrer devido a uma alocação mais eficiente de elétrons para a nitrogenase ou devido à maior atividade da hup.

A existência de uma hup ativa pode aumentar consideravelmente a fixação do N_2 e a produção de matéria seca, uma vez que mais fotossintatos estarão disponíveis para os nódulos e para a planta (BURNS e HARDY, 1975; HARDY e HAVELKA, 1976).

Acredita-se que a quantidade de H_2 evoluído dependa da estirpe de bactéria, uma vez que ela possui as informações genéticas para a síntese da nitrogenase e para a síntese da hidrogenase ativa dos nódulos (DIXON, 1967; SCHUBERT *et alii*, 1977, 1978; CARTER *et alii*, 1978; YATES, 1980). As estirpes de *Rhizobium* que nodulam *Vigna* sp., por exemplo, apre-

sentam baixa evolução de H_2 e uma ER de 0,99 (SCHUBERT e EVANS, 1976) provavelmente devido a uma hup muito ativa (EVANS *et alii*, 1980; YATES, 1980).

CARTER *et alii* (1978), trabalhando com duas cultivares de soja, verificaram que, quando a inoculação era feita com estirpes que possuíam hidrogenase ativa (hup^+) a ER ficava entre 0,96 e 1,00, enquanto que na inoculação com estirpes sem hidrogenase ativa (hup^-) a ER era de 0,41 - 0,80. Inoculando estirpes hup^+ e hup^- em sete cultivares de soja verificaram que a capacidade de reciclar H_2 parecia ser determinada pela estirpe de *Rhizobium*.

SCHUBERT *et alii* (1978) verificaram que em plantas de soja inoculadas com estirpes hup^+ a ER variou de 0,98 - 1,00, e com estirpes hup^- a ER foi de 0,53 - 0,82. A inoculação com estirpes hup^+ resultou em um incremento de 24% na produção de matéria seca total, 7% na %N e 31% no teor de N total. Os autores atribuíram esses aumentos exclusivamente à presença de hup, uma vez que a massa nodular e a respiração dos nódulos não foram alteradas.

ALBRECHT *et alii* (1979) trabalhando com cinco estirpes de *Rhizobium japonicum* hup^+ e cinco estirpes hup^- verificaram que a soja inoculada com as estirpes hup^+ apresentou uma superioridade de 16% na produção de matéria seca e 26% no teor de N-total dos tecidos. Ao levar esse experimento para o campo, houve confirmação dos resultados, com um incremento médio de 8,4% no teor de proteína bruta nos grãos das plantas inoculadas com estirpes hup^+ (HANUS *et alii*, 1981).

Ao estudar 15 estirpes de *Rhizobium leguminosarum* hup^+ e hup^- , RUIZ-ARGUESO *et alii* (1978) verificaram que, embora houvesse diferenças significativas na produção de H_2 pelas estirpes, a atividade da hidrogenase nas estirpes hup^+ não foi suficiente para reciclar todo o H_2 produzido. Os autores sugeriram que isso poderia ocorrer devido a uma limitação da quantidade de hidrogenase ativa, pela deficiência de algum componente intermediário na oxidação de H_2 ou porque a morfologia dos nódulos formados por algumas estirpes de *Rhizobium* pode conduzir à rápida difusão do H_2 , diminuindo a concentração do substrato para a atividade da hidrogenase.

Alguns resultados de experimentos com estirpes hup^+ e hup^- podem ser vistos na Tabela 5. Deve-se citar, também, que em alguns experimentos não foram encontradas diferenças na produção de matéria seca devido à inoculação com estirpes hup^+ e hup^- .

GIBSON *et alii* (1981) não encontraram diferenças na produção de matéria seca de *Trifolium subterraneum* inoculado com estirpes hup^+ e hup^- , verificando também uma relação inversa ($r = 0,65$) entre ER e efetividade simbiótica, isto é, quanto mais efetiva a bactéria, mais elétrons passavam pela nitrogenase e eram perdidos como H_2 , bem como também não encontraram diferenças na produção vegetal de soja, inoculada com estirpes hup^+ e hup^- .

RAINBIRD *et alii* (1981), que realizaram seus estudos com *Vigna unguiculata*, também não constatarem diferenças na produção de matéria seca entre plantas inoculadas com estirpes hup^+ e hup^- , havendo apenas um aumento no teor de C e N nas raízes inoculadas com estirpes hup^+ , que evoluíram quantidades negligíveis de H_2 . Verificaram, também, que as estirpes que evoluíam mais H_2 também evoluíam maiores quantidades de CO_2 , concluindo que na simbiose uma determinada quantidade fixa de fotossintatos é destinada ao sistema radicular e se ocorrer um gasto extra de energia, com a evolução do H_2 , a compensação ocorre na forma de crescimento reduzido da raiz.

De acordo com essas observações realizadas em diversos experimentos, a evolução do H_2 depende da estirpe de bactéria, mas DIXON (1972) sugeriu pela primeira vez que a síntese da hup talvez fosse controlada pela planta hospedeira, assim como ocorre com a síntese de leghemoglobina, uma vez que em seus experimentos foi verificado que a presença e quantidade de hup dependia da planta hospedeira.

SCHUBERT *et alii* (1977) ao estudarem duas cultivares de soja inoculadas com quatro estirpes, notaram um efeito da cultivar na perda de H_2 , salientando que, embora através de seus resultados não pudessem afirmar que a leguminosa apresentava um papel na expressão da hup, também não podiam vir a descartar essa hipótese. EVANS *et alii* (1980), porém, ten-

Tabela 5. Evolução do hidrogênio e atividade da nitrogenase em leguminosas noduladas.

Espécie	Hidrogenase	Peso seco da parte aérea (g/pl)	Peso seco dos nódulos (g/pl)	Atividade da nitrogenase 1/	Evolução do $\frac{2}{H_2}$	Eficiência Relativa	Referência
<i>Glycine max</i>	Hup ⁺	2,00	0,69	20,0	0,0	1,00	CARTER et alii (1978)
	Hup ⁻	1,27	0,58	18,9	4,3	0,74	
	Hup ⁺	5,90	1,04	3,18		0,99	ALBRECHT et alii (1979)
	Hup ⁻	5,10	1,18	2,98		0,69	
<i>Pisum sativum</i>	Hup ⁺	1,54	1,00	7,76	1,74	0,78	RUIZ-ARGÜESO et alii (1978)
	Hup ⁻	1,57	0,42	7,56	2,96	0,61	
	Hup ⁺			17,2	2,5	0,74	BETHLENFALVAY e PHILLIPS (1979)
	Hup ⁻			12,9	7,7	0,32	
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Hup ⁺	2,11	0,48	40,43			SAITO et alii (1980a)
	Hup ⁻	1,57	0,42	21,73			

$$\frac{1}{-} \mu \text{ moles } C_2H_4 \cdot g \text{ nod}^{-1} \cdot h^{-1}$$

$$\frac{2}{-} \mu \text{ moles } H_2 \cdot g \text{ nod}^{-1} \cdot h^{-1}$$

tando obter confirmação dessa hipótese, não encontraram efeito consistente do cultivar na perda de H_2 , ao comparar cultivares de trevo e alfafa inoculados com diversas estirpes.

GIBSON *et alii* (1981), verificaram que o genótipo de *Vigna* controlou o desenvolvimento da hidrogenase nos nódulos formados por duas estirpes (CB 756 e 32 HI). Em *Vigna radiata* os nódulos formados por essas estirpes não apresentaram hidrogenase ativa, mas em outras espécies de *Vigna* estudadas houve a formação de hup^+ . Realizando enxertia, os autores puderam verificar ainda que o principal fator na determinação da hidrogenase era o genótipo da raiz.

KEYSER *et alii* (1981) verificaram também a influência da leguminosa hospedeira na evolução do hidrogênio. Ao inocular duas estirpes de *Rhizobium japonicum* em soja, a ER variou de 0,08 a 0,46, enquanto que em caupi inoculado com as mesmas estirpes a ER variou entre 0,68 a 1,00.

Em termos energéticos, cerca de 4 ATP e $2e^-$ são utilizados na redução do H_2 , e assumindo-se que $2e^- = 2$ ATP (ORME-JOHNSON *et alii*, 1977), haveria um gasto mínimo de 6 ATP/mol de H_2 evoluído (EVANS *et alii*, 1977; EVANS *et alii*, 1981). Calcula-se que a reoxidação de 1 mol de H_2 pela hup^+ recuperaria 2 ATP (DIXON, 1976, 1978) a 3 ATP (MINCHIN, 1980; EVANS *et alii*, 1981). Deste modo, uma hidrogenase ativa poderia recuperar 9,1% (EVANS *et alii*, 1981) ou 12,5% (PHILLIPS, 1980) da energia total despendida na formação de 1 mol de NH_3 , ou poderia recuperar 33% (EVANS *et alii*, 1981) ou até 43% (PATE *et alii*, 1981) da energia perdida pela evolução de H_2 .

Há discussão entre alguns autores, sobre a utilização da energia recuperada pela hidrogenase. EVANS (1981) e EVANS *et alii* (1981) consideram que, nos sistemas simbióticos, os fotossintatos devem ser parcelados para todas as partes das plantas e que a reciclagem do H_2 recuperaria energia que seria utilizada na manutenção e fixação do nitrogênio, provocando diferenças de produção vegetal em relação às estirpes hup^+ e hup^- . GIBSON (1981a), porém, acredita que a energia recuperada pela hup seria destinada a todos os processos da planta e somente 10% do total recuperado se

ria utilizado pela fixação do N_2 , explicando resultados (GIBSON *et alii*, 1981) em que não encontrou diferenças de produção entre estirpes hup^+ e hup^- .

2.4.2. A respiração nos sistemas simbióticos

Nos estudos em que se procura avaliar a energia consumida na fixação do N_2 , pode-se utilizar apenas medidas indiretas, dentre as quais a da respiração. Deste modo, considera-se que o ATP e o poder redutor consumidos pelo sistema nitrogenase são derivados da oxidação completa dos açúcares da planta hospedeira, e as medidas da respiração refletem essa utilização de energia (BOND, 1941; MINCHIN e PATE, 1973).

Teoricamente, pode-se considerar a seguinte reação química de fixação do N_2 :

Haveria, portanto, um consumo mínimo de 1,6 mg de carboidrato/mol N_2 fixado, mas há relatos que vão de 3:1 até 62:1, e os valores mais comumente encontrados estão entre 6:1 e 20:1 (GIBSON, 1966). Essas variações ocorrem porque, em um sistema simbiótico, deve-se considerar também a energia necessária para o crescimento e manutenção dos nódulos. Há diferenças relacionadas com a estirpe de bactéria, atividade do nódulo, planta hospedeira e com os processos de crescimento, respiração e fotossíntese (GIBSON, 1966).

MINCHIN e PATE (1973) verificaram que, em ervilha, dos 32% de fotossintatos enviados aos nódulos, 12% foram consumidos na respiração, e em *Lupinus albus* houve o consumo de 51% dos fotossintatos líquidos da planta, dos quais 78% foram perdidos na respiração (PATE e HERRIDGE, 1978). De um modo geral, porém, as perdas de CO_2 para a atmosfera podem representar de 46-76% dos fotossintatos enviados aos nódulos. Os valores mais elevados representariam sistemas simbióticos extremamente ineficientes (MINCHIN *et alii*, 1981a).

Muitos métodos são utilizados para medir a respiração dos sistemas simbióticos. BOND (1941) e SILISBURY (1977), estudaram a respiração em plantas noduladas e plantas não noduladas. MINCHIN e PATE (1973) e HERRIDGE e PATE (1977) empregaram em seus estudos raízes noduladas e nódulos destacados. ATKINS *et alii* (1978) utilizaram nódulos destacados.

MAHON (1977a) procurou avaliar, além da respiração associada à fixação, a respiração associada ao crescimento e manutenção do sistema simbiótico. Em estudo realizado com *Pisum sativum*, o autor encontrou uma relação linear entre a respiração de raízes noduladas e a redução do C_2H_2 . A inclinação da reta indicaria a eficiência respiratória associada à fixação do N_2 e o ponto onde a reta corta a ordenada representaria a respiração basal de crescimento e manutenção do sistema simbiótico.

A partir desse experimento, MAHON (1977b, 1979), passou a estimar os gastos energéticos da fixação comparando plantas noduladas e plantas que receberam nitrogênio mineral. Há muita diversidade, porém, sobre os resultados obtidos por esse método. Segundo GIBSON (1966) e MINCHIN e PATE (1973), as necessidades energéticas para a assimilação do NO_3^- e para a fixação do N_2 são semelhantes, mas MAHON (1979), RYLE *et alii* (1979b), NEVES *et alii* (1981) verificaram que em ervilha, soja e trevo branco, a perda de CO_2 pelas raízes que receberam NO_3^- é consideravelmente menor do que nas raízes noduladas. Acredita-se que algumas plantas reduzam o nitrato assimilado principalmente em suas partes aéreas, onde os redutores da fotofosforilação podem ser suficientes para a fixação do carbono e a redução do nitrato sem gastos energéticos adicionais. NEYRA *et alii* (1977) também constataram a presença de nitrato redutase nas folhas de *Phaseolus vulgaris*.

Outros métodos empregados no estudo da respiração incluem o uso de micro-respirômetros (LAYZELL *et alii*, 1979), mas é restrito a um número pequeno de plantas. RYLE *et alii* (1979a) utilizaram raízes noduladas antes e após a remoção de uma subamostra de nódulos, mas tanto nesse método como no que utiliza nódulos destacados (MINCHIN e PATE, 1973) ao se destacar os nódulos podem ocorrer alterações fisiológicas que alterem a respiração (MINCHIN *et alii*, 1981).

Apesar das dificuldades de metodologia e da diversidade dos resultados, que vão de 0,4 a 22,6 mol CO₂ respirado/mol NH₃ fixado, todos os autores concluíram que a medida da respiração pode ser utilizada como indicadora do fluxo de elétrons para a nitrogenase. Os valores normalmente encontrados, porém, situam-se entre 4,5 e 6,8 mg C respirado/mg N fixado, para plantas normais e entre 9,3 e 13,3 para plantas sob estresse ou com muitas reservas. Alguns dos valores encontrados podem ser vistos na Tabela 6.

Tabela 6. Custo energético da fixação simbiótica do nitrogênio avaliado pela respiração em leguminosas noduladas.

Espécies	mg C/mg N	Referência
<i>Glycine max</i>	7,6 a	BOND (1941)
	6,3 a	RYLE <i>et alii</i> (1979a)
	6,7 a	MAHON (1979)
<i>Pisum sativum</i>	5,9 b	MINCHIN e PATE (1973)
	6,9 a	MAHON (1977b)
	1,5 b	ATKINS <i>et alii</i> (1978)
<i>Vigna unguiculata</i>	1,1 b	ATKINS <i>et alii</i> (1978)
	1,5 b	LAYZELL <i>et alii</i> (1979)
	10,28 a	HERRIDGE e PATE (1977)
	2,7 b	HERRIDGE e PATE (1977)
	6,8 a	RYLE <i>et alii</i> (1979a)
	2,4 b	NEVES <i>et alii</i> (1981)
	8,0 a	NEVES <i>et alii</i> (1981)
<i>Lupinus albus</i>	1,7 b	ATKINS <i>et alii</i> (1978)
	3,6 b	LAYZELL <i>et alii</i> (1979)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	6,1 a	MAHON (1979)

a/ C perdido (como CO₂) por raízes noduladas.

b/ C perdido (como CO₂) pelos nódulos.

A respiração pode diferir segundo a planta hospedeira ou a estirpe de bactéria. MAHON (1979) ao estudar quatro cultivares de ervilha e quatro inoculantes, encontrou variações de 0,14 - 0,31 mg CO₂/μ mol C₂H₂ reduzido, mas somente o genótipo da planta influenciou a respiração associado à redução do C₂H₂, não sendo encontrado também efeito da interação genótipo x inóculo. Os resultados de NEVES *et alii* (1981) também sugerem diferenças na respiração devido à cultivar de caupi. As diferenças entre plantas hospedeiras, como caupi e lupin, também podem estar associadas à presença de carboxilases, que são encontradas tanto nas raízes como nos nódulos (LAWRIE e WHEELER, 1973). A presença de carboxilases pode influenciar bastante a economia de carbono e nitrogênio dos sistemas simbióticos. BETHLENFALVAY *et alii* (1978b) encontraram uma alta correlação entre elevadas taxas de fixação e eficiência de carboxilação ($R^2 = 0,99$).

NEVES *et alii* (1981) verificaram que as diferenças na respiração radicular de caupi estavam relacionadas às estirpes de *Rhizobium*. As estirpes menos eficientes apresentaram uma maior relação C/N, associada à maior respiração radicular durante o último período vegetativo, quando ocorre uma queda na fixação do N₂.

Finalmente, deve-se considerar que o custo para a fixação de 1 mol de N₂ pode variar de 25,5 a 49 ATP equivalentes. Dentre os principais fatores que contribuem para a economia energética estão a evolução do hidrogênio pelos nódulos, a presença de hidrogenase e maior eficiência respiratória, que variam segundo a planta hospedeira e a estirpe de bactéria (MINCHIN, 1980).

2.5. Efeito do nitrogênio mineral na fixação biológica do N₂

O nitrogênio é o elemento absorvido em maior quantidade pela cultura do feijoeiro, havendo extração de cerca de 102 kg N/ha em uma plantação com 22.000 plantas/ha. Calcula-se que cerca de 66% desse nitrogênio é exportado pelos grãos (GALLO e MIYASAKA, 1961; COBRA NETO, 1967).

Desde as primeiras investigações sobre os sistemas simbióticos

cos, porém, os pesquisadores já verificaram que o nitrogênio mineral podia inibir a nodulação e fixação do N_2 (ORCUTT e WILSON, 1937). O grau de inibição varia com a leguminosa hospedeira e sabe-se que *Phaseolus vulgaris* é extremamente sensível ao N-mineral (RUSCHEL e REUSZNER, 1973a; RAGGIO *et alii*, 1965; CARTWRIGHT, 1967).

O N mineral pode afetar a fixação simbiótica do N_2 de diversos modos. O NH_4^+ afeta a síntese e regulação da nitrogenase, diminuindo-as quando há um acréscimo de NH_4^+ (YATES, 1980).

TANNER e ANDERSON (1963) e OGHOGHORIE e PATE (1971) sugeriram que o NO_3^- tem um efeito externo prejudicando o início da nodulação. Isso ocorre porque o *Rhizobium* reduz o nitrato a nitrito e este destrói o AIA, não havendo o encurvamento dos pelos radiculares, que é essencial ao início da nodulação. Segundo GIBSON (1981b), porém, o efeito externo do N parece estar associado a mudanças químicas na superfície dos pelos radiculares, de tal modo que poucas lecitinas ficam disponíveis para ligar o *Rhizobium*.

Em um estágio posterior, o nitrogênio afeta o desenvolvimento dos nódulos e a atividade da nitrogenase e essa se deve a alterações no metabolismo de C e N da planta hospedeira. Qualquer nitrogênio extra absorvido significa uma competição pelos fotossintatos disponíveis, prejudicando a síntese de proteínas na redução do N_2 (RAGGIO *et alii*, 1968; GIBSON e PAGAN, 1977; GIBSON, 1981b).

O grau de inibição causado pelo N, entretanto, depende da planta hospedeira (FRANCO e DÖBEREINER, 1967), da estirpe de *Rhizobium* (CARTWRIGHT, 1967; LIE, 1974), das condições estacionais, principalmente as que afetam as taxas fotossintéticas (OGHOGHORIE e PATE, 1971) e da forma de nitrogênio mineral aplicada (NETTLES, 1954; RUSCHEL *et alii*, 1979; VEIGA, 1980).

ORCUTT e WILSON (1937) já haviam verificado que a colocação de uma pequena dose inicial de nitrogênio pode ser favorável à planta hospedeira, que corresponderá com o envio de maiores quantidades de fotossintatos aos nódulos, resultando em melhor desenvolvimento do sistema simbiótico.

tico. Desse modo, a adubação inicial com pequenas doses de nitrogênio pode aumentar consideravelmente o N_2 fixado. GIBSON (1981b) salienta também a importância de se realizar a seleção de estirpes de *Rhizobium* sob pequenas quantidades de N, a fim de que elas possam se adaptar melhor sob condições de campo.

Há diversas citações sobre os benefícios da aplicação de pequenas doses de N. GUSS e DÖBEREINER (1972), ao aplicarem 23 ppm $N-NH_4NO_3$, observaram um melhor desenvolvimento da planta, aumento no teor de N total, peso e número de nódulos. RUSCHEL e RUSCHEL (1975) constataram um efeito aditivo da inoculação e adubação nitrogenada. O efeito sinérgico entre absorção de N mineral e fixação do N_2 também foi observado em *Phaseolus vulgaris* por RUSCHEL e SAITO (1977) e RUSCHEL *et alii* (1979).

BETHLENFALVAY *et alii* (1978a) estudaram a fixação de N_2 em *Pisum sativum* em função da aplicação de NH_4^+ . Em presença de 2 mM NH_4^+ houve um aumento de 65% na redução de C_2H_2 , de 149% no N_2 fixado e de 57% na ER, diminuindo em 28% o H_2 evoluído. A fixação de N_2 foi prejudicada com a aplicação de quantidades maiores do que 8 mM NH_4^+ .

MINCHIN *et alii* (1981b) compararam plantas de caupi inoculadas com e sem a aplicação diária de 20 ppm N - NO_3 na solução até o período de florescimento ou depois do florescimento. Houve um efeito positivo do fornecimento de N inorgânico durante o período vegetativo, estimulando a nodulação, a atividade da nitrogenase e aumentando a produção de sementes. A aplicação de N após o período vegetativo, porém, reduziu a atividade da nitrogenase e a longevidade simbiótica.

Como já foi visto, acredita-se que a fixação do N_2 seja limitada devido suprimento de carbono, e os experimentos de HARDY e HAVELKA (1974, 1976), que obtiveram grandes incrementos no N_2 fixado através do enriquecimento da atmosfera em CO_2 , fazem parte dos trabalhos que confirmam essa hipótese. Sabe-se, também, que as plantas noduladas apresentam um período inicial de deficiência de nitrogênio, que perdura até o estabelecimento do sistema simbiótico (GIBSON, 1974). Baseados nesses conhecimentos, PHILLIPS *et alii* (1981) realizaram um experimento com plantas de soja até

os 22 dias de idade, em concentrações normais ou elevadas de CO_2 e em presença de 0,1 e 8 mM NH_4 . O papel relevante do nitrogênio ficou constatado, pois com a aplicação de N sob concentrações normais de CO_2 , houve um aumento de 251% no peso seco e 287% no teor de N, ao passo que o efeito máximo obtido devido ao enriquecimento com CO_2 foi um aumento de 64% no peso seco e de 20% no teor de N, demonstrando que nas condições desse experimento a limitação primário foi o N e não o C. Os autores também comentam que, nos estudos sobre conservação de energia para aumentar a fixação de N_2 , os resultados podem não corresponder à realidade se não se levar em consideração o período de limitação de crescimento devido à deficiência de nitrogênio.

2.6. Seleção de sistemas simbióticos mais eficientes

2.6.1. Papel das estirpes de *Rhizobium*

O *Rhizobium* encerra as informações genéticas da fixação biológica do nitrogênio. Inicialmente acreditava-se que era necessária uma informação genética da leguminosa hospedeira para que o *Rhizobium* pudesse iniciar a fixação do N_2 . Hoje, entretanto, já se conseguiu isolar células livres de *Rhizobium* que, sob condições adequadas, conseguem reduzir o nitrogênio atmosférico (YATES, 1977).

A seleção de estirpes de *Rhizobium* deve abranger diversos aspectos, que vão desde a capacidade de competição e sobrevivência da bactéria no solo e sua habilidade na infecção e formação de nódulos (VIRTANAEN e MIETTINEN, 1969; VINCENT, 1974; DATE, 1976; POSTGATE e HILL, 1979), até a capacidade de estabelecer um metabolismo integrado e eficiente com a planta hospedeira (VINCENT, 1974; SPRENT, 1979). Outros critérios utilizados nos programas de seleção incluem a tolerância do *Rhizobium* a baixo pH e presença de elementos tóxicos (ANDREW, 1977) e seleção para nodulação em presença de nitrogênio mineral (GIBSON *et alii*, 1981).

Os estudos sobre a economia energética na fixação do N_2 vieram a confirmar o papel primordial do *Rhizobium* no estabelecimento de sis-

temas simbióticos eficientes ou ineficientes. GIBSON (1966) encontrou diferenças metabólicas no consumo de carboidratos entre estirpes de *Rhizobium* inoculadas com a mesma planta hospedeira (*Trifolium subterraneum*), com reflexos importantes na economia de carbono pelo sistema simbiótico. Resultados semelhantes foram obtidos em caupi (NEVES *et alii*, 1981) e *Pisum sativum* (BETHLENFALVAY *et alii*, 1978b).

A utilização mais eficiente dos carboidratos pode estar associada principalmente com a menor evolução do CO_2 . NEVES *et alii* (1981) encontraram diferenças na respiração radicular da mesma cultivar de *Vigna unguiculata* inoculada com duas estirpes de *Rhizobium*, havendo uma diferença de 13% na eficiência de consumo de carboidratos para a fixação de N_2 (mg C perdido como CO_2 /mg N fixado).

De acordo com muitos pesquisadores, a estirpe de *Rhizobium* é a responsável pela evolução do H_2 pela nitrogenase, em um processo dependente de ATP e responsável por grandes perdas de energia. A estirpe de *Rhizobium* também é responsável pela síntese da hidrogenase ativa, que reciclaría parte do H_2 evoluído em uma reação não dependente de ATP, recuperando parte da energia perdida (SCHUBERT e EVANS, 1977; CARTER *et alii*, 1978; YATES, 1980). A importância energética desse processo e a necessidade de selecionar estirpes que apresentem menor evolução do H_2 já foram discutidas no item 2.4.1.

A variação entre as estirpes em sua efetividade, isto é, habilidade do *Rhizobium* de formar nódulos que fixem N_2 , representa um grande potencial genético de seleção para se obter incrementos no N_2 fixado. Cabe aqui ressaltar, porém, que embora as estirpes sejam classificadas segundo o seu grau de efetividade, já foram constatadas variações na efetividade da mesma estirpe inoculada com diferentes plantas hospedeiras (GIBSON, 1966; VIRTANAEN e MIETTINEN, 1969).

Há diversos trabalhos relatando diferenças entre plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas com diferentes estirpes de *Rhizobium phaseoli*. SILVA (1951) foi um dos primeiros pesquisadores a se preocupar com a fixação do N_2 em feijoeiro, isolando estirpes de alguns solos de São Paulo

e conseguindo dobrar a produção com as estirpes mais eficientes.

Outros trabalhos com estirpes de *Rhizobium phaseoli* relatam diferenças no peso seco das plantas, N total acumulado, peso e eficiência nodular (BURTON *et alii*, 1954; FRANCO e DÖBEREINER, 1967; RUSCHEL e REUSZNER, 1973a; SAITO e RUSCHEL, 1976; RUSCHEL e SAITO, 1977; SAITO e CARDOSO, 1977; SAITO *et alii*, 1978; CASSINI, 1980; SAITO, 1980; SAITO *et alii*, 1980a).

As estirpes também podem apresentar grandes diferenças na atividade da enzima nitrogenase (redução do C_2H_2) (SAITO *et alii*, 1978; CASSINI, 1980; SAITO, 1980; SAITO *et alii*, 1980a).

Os resultados obtidos em alguns dos trabalhos citados estão na Tabela 7.

2.6.2. Papel da leguminosa hospedeira

NUTMAN (1946a e 1946b) foi o primeiro a realçar a importância das leguminosas hospedeiras, afirmando que há vários fatores genéticos da planta envolvidos na formação dos nódulos e no mecanismo da fixação. Estudos posteriores mostraram que em *Glycine max* a nodulação é controlada por um gen de hereditariedade simples (WILLIAMS e LYNCH, 1954) e que os genes com a maior responsabilidade pela nodulação em feijoeiro parecem residir na planta hospedeira (BURTON *et alii*, 1954).

Diversos trabalhos já indicaram que pode ocorrer grande variabilidade entre espécies e dentro de espécies de leguminosas na fixação de N_2 , constituindo um inesgotável material para seleções genéticas. De acordo com GRAHAM (1980a), a área mais importante no estudo das leguminosas hospedeiras é a grande variação natural na capacidade de fixar N_2 , o que permite que se obtenha um incremento no teor de nitrogênio fixado.

Já foi demonstrado que há grande variabilidade entre variedades e cultivares de *Phaseolus vulgaris*, refletindo em diferenças na produção de matéria seca, teor de N total, peso e número de nódulos (DÖBEREI-

Tabela 7. Fixação simbiótica do nitrogênio em *Phaseolus vulgaris* L. inoculado com diferentes estirpes de *Rhizobium phaseoli*.

local do experimento	Cultivar de <i>Phaseolus vulgaris</i>	Estirpe de <i>Rhizobium phaseoli</i>	parte aérea		M.S. dos nódulos a/	Redução c/ do C_2H_2	Referência
			M.S. a/	N-total b/			
casa-de-vegetação Carioca		C-05	3,174	64,017	0,369		SAITO e CAR- DOSO (1977)
		C-29	2,782	45,222	0,489		
casa-de-vegetação Carioca		C-05	1,649	51,885	0,201	10,73	CASSINI (1980)
		C-29	1,352	45,810	0,240	6,27	
		C-40	1,426	38,215	0,226	14,65	
		C-88	2,115	67,573	0,476	19,41	
		C-89	0,649	19,641	0,253	4,75	
casa-de-vegetação Venezuela-350		C-05	1,056	40,506	1,390	7,530	SAITO <i>et alii</i> (1978)
		C-19	1,320	57,476	1,136	11,636	
		C-29	0,931	35,430	1,438	5,589	
		C-89	0,428	18,350	0,954	2,190	

a/ g/planta

b/ mg/planta

c/ $\mu\text{moles } C_2H_4 \cdot \text{pl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$

NER e RUSCHEL, 1961; FRANCO e DÖBEREINER, 1967; GRAHAM e ROSAS, 1977; WESTERMAN e KOLAR, 1978; RUSCHEL *et alii*, 1979a; GRAHAM, 1980b; VEIGA, 1980), e diferenças na utilização do nitrogênio fixado (RUSCHEL e SAITO, 1977 ; RUSCHEL *et alii*, 1979a). Os resultados de alguns desses trabalhos podem ser observados na Tabela 8.

As leguminosas hospedeiras são plantas do ciclo C_3 , que se caracterizam por baixa taxa de fotossíntese líquida, elevada fotorrespiração e alto consumo de água para produção de matéria seca (MAGALHÃES, 1979), havendo consideráveis evidências de que a sua baixa produção de fotossintatos frequentemente limita a capacidade fixadora dos sistemas simbióticos (HARDY e HAVELKA, 1974, 1976; HAVELKA e HARDY, 1975). Por outro lado, durante o período de máxima fixação pode haver um desvio de 10 - 30% dos fotossintatos totais da planta, reduzindo diretamente o potencial das leguminosas (SCHUBERT e RYLE, 1980), devendo-se selecionar sistemas simbióticos que tenham maior eficiência na produção e utilização dos fotossintatos (BETHLENFALVAY e PHILLIPS, 1979a, 1979b). Desse modo, GRAHAM (1980a) afirma que é fundamental o conhecimento dos genes que controlam a fixação do N_2 e dos que influem na mobilização de reservas energéticas para os nódulos.

GRAHAM e HALLIDAY (1977) e ADAMS *et alii* (1978) encontraram diferenças entre cultivares de feijão quanto à habilidade de parcelar e mobilizar carboidratos. Embora possa-se encontrar quantidades iguais de carboidratos no sistema radicular, as cultivares com maior atividade fixadora de N_2 mantêm a maior proporção de seus carboidratos na forma solúvel, havendo diferenciação na utilização de carbono pelos nódulos (GRAHAM e HALLIDAY, 1977).

GRAHAM e ROSAS (1977) e GRAHAM (1980b) relatam que os cultivares de *Phaseolus vulgaris* de hábito trepador e crescimento indeterminado apresentam taxas de fixação de N_2 mais elevadas do que as cultivares rasteiras, e isso parece estar relacionado a diferenças na transferência dos carboidratos não estruturais para os nódulos. Outra explicação seria a de que os cultivares rasteiros recém germinados absorvem N mais rapidamente do solo, podendo diminuir o suprimento de carboidratos para os nódulos.

Tabela 8. Efeito da cultivar de *Phaseolus vulgaris* L. na fixação simbiótica do nitrogênio.

local do experi- mento	Cultivar de <i>Phaseolus</i> <i>vulgaris</i>	Hábito de crescimento	Peso sedo dos nódulos (mg/pl)	N total das plantas (mg/pl)	Produtividade das sementes (kg/ha)	Atividade da nitrogenase ^{a/}	Referência
campo	Bonus	semi-trepador		97,1	38,0		WESTERMAN e KOLAR (1978)
	R 275	trepador		120,1	33,6		
	UI-50	arbustivo		24,7	27,9		
campo	P 635	arbustivo	8,8			0,74 ^{b/}	GRAHAM (1980a)
	P 717	trepador	99,1			17,44	
	P 590	trepador	545,6			37,70	
campo	Venezuela			121,56	800,5		RUSCHEL et alii (1979a)
	Carioca			148,40	845,5		
casa-de- vegetação	Carioca		25,85	16,1		0,668	VEIGA (1980)
	Venezuela-350		18,25	14,0		0,366	
	Aroana		26,92	14,6		1,113	
	Moruna		47,95	14,7		1,846	
	Tibagi		8,65	13,3		0,125	

^{a/} $\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{pl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ^{b/} taxa máxima de fixação

los. A época de maturidade também pode ser de grande importância, uma vez que nas variedades mais tardias há uma prolongação do período de fornecimento de carboidratos para o desenvolvimento dos nódulos (RUSCHEL e REUZER, 1973b ; GRAHAM e ROSAS, 1977).

A seleção de sistemas simbióticos deve considerar também as diferenças no metabolismo assimilatório de nitrogênio da planta, uma vez que já se verificou que nem sempre as diferenças entre as variedades de *P. vulgaris* na produção de matéria seca e N total correlacionam com o teor de N das sementes (RUSCHEL *et alii*, 1979a) e isso também pode estar correlacionado com a excreção de compostos nitrogenados pelas plantas (VIRTANAEM e MIETINEM, 1969; RUSCHELL *et alii*, 1979b).

A leguminosa também pode alterar a eficiência energética do sistema simbiótico, pois os trabalhos de GIBSON *et alii* (1981) e KEYSER *et alii* (1981) indicam que a planta hospedeira pode ser a responsável pela atividade da hidrogenase independente de ATP que oxida parte do H₂ evoluído, recuperando energia que, de outro modo, seria perdida. MAHON (1977b) também encontrou diferenças entre cultivares de *Pisum sativum* na respiração de raízes noduladas.

Finalmente, deve-se considerar ainda que a seleção de plantas hospedeiras e estirpes de bactérias não deve ser realizada isoladamente, uma vez que já se verificou o efeito da interação entre variedades e estirpes na produção de matéria seca e N total da planta em *Vigna unguiculata* (MINCHIN *et alii*, 1978) e *Phaseolus vulgaris* (SAITO e RUSCHEL, 1976 ; ELKAN *et alii*, 1981).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram realizados quatro experimentos em câmara de crescimento e casa-de-vegetação no Centro de Energia Nuclear na Agricultura em Piracicaba, São Paulo, no período de fevereiro de 1980 a junho de 1981. Os experimentos foram conduzidos nas seguintes épocas: fevereiro/abril, 1980 (experimento I); maio/julho, 1980 (experimento II); setembro / novembro, 1980 (experimento III); março/junho, 1981 (experimento IV).

3.1. Plantas

Foram utilizadas cinco cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.): Aroana, Carioca, Moruna, Rio Tibagi, Venezuela-350. As sementes foram fornecidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão, pela Seção de Genética do CENA e pelo Instituto Agrônomo de Campinas.

A distribuição das cultivares em cada experimento foi a seguinte:

- Experimento I : Aroana, Carioca, Moruna, Rio Tibagi, Venezuela-350.
- Experimento II : Carioca e Venezuela-350.
- Experimento III : Aroana, Carioca, Moruna, Venezuela-350.
- Experimento IV : Aroana e Carioca.

3.2. Bactérias

3.2.1. Estirpes utilizadas

Foram utilizadas cinco estirpes de *Rhizobium phaseoli* com as seguintes procedências:

Nº CENA	Nº Original	Procedência
C-05	C-05	CENA, Piracicaba, SP
C-29	127 K-17	Nitragin Co, EUA
C-40	CIAT 255 (Z 272)	CIAT, Colômbia
C-88	SEMIA 487	IPAGRO, Porto Alegre, RS
C-89	CIAT 57 (CC 511)	CIAT, Colômbia

A distribuição das estirpes em cada cultivo foi a seguinte:

- Experimento I : C-05 e C-29
- Experimento II : C-05, C-29 e C-88
- Experimento III : C-05, C-40 e C-89
- Experimento IV : C-05, C-29 e C-88.

As bactérias foram mantidas em meio sólido YMA (FRED *et alii*, 1932) modificado, cuja composição está na Tabela 9. Logo após a incubação inicial a 28°C por 3-5 dias as bactérias foram conservadas a 5°C até o dia do preparo do inoculante.

3.2.2. Expressão da hidrogenase *in vivo*

Para testar a atividade da enzima hidrogenase nas estirpes de bactéria utilizou-se o meio LNB5 modificado (MAIER *et alii*, 1978), cuja composição está na Tabela 10, e que detecta as estirpes que oxidam H₂ através da redução do cloreto trifeniltetrazólio em um meio de agar. As estirpes foram repicadas para as placas de Petri contendo o meio de cultura e, após 4-5 dias, o aparecimento da coloração vermelho escura indicava a presença de hidrogenase ativa.

Tabela 9. Meios de cultura para *Rhizobium* (modificados de FRED *et alii*, 1932).

YMA (Yeast Mannitol Agar) - Meio sólido

Manitol	5,0 g
Glutamato de sódio	0,5 g
$\text{Na}_2 \text{HPO}_4$	0,08 g/ml
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	10,0 g/l
CaCl_2	40,0 g/l
FeCl_3	4,0 g/l
Extrato de levedura	0,5 g
Agar	12,0 g

Completar com água destilada até 1000 ml

YMB (Yeast Mannitol Broth) - Meio líquido

YMA sem a colocação de agar.

Tabela 10. Meio de cultura para detectar a atividade da hidrogenase em *Rhizobium* (MAIER *et alii*, 1978).

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	150 mg
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	150 mg
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	250 mg
Fe - EDTA	28 mg
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	10 mg
H_3BO_3	3 mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2 mg
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,25 mg
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,04 mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,025 mg
KI	0,78 mg
inositol	100 mg
hidroclorato tiamina	10 mg
ácido nicotínico	1 mg
HCl piridoxal	1 mg
sacarose	0,5 g
L-arabinose	1,0 g
gluconato de sódio	0,5 g
glutamato de sódio	0,5 g
extrato de levedura	0,1 g
agar	12 g
pH final = 5,5	
Diluição em 1000 ml de água destilada

- a - Tampa de vidro (placa de Petri) removida após a emergência
- b - Garrafa sem fundo
- c - Cobertura de areia grossa esterilizada
- d - Saco de papel resistente
- e - Vermiculita ou qualquer outro suporte inerte
- f - Elástico
- g - Frasco de boca larga
- h - Solução nutritiva
- i - Tampa de algodão

Figura 2. Vaso de "Leonard" modificado.

Figura 4. Câmara de incubação para análise de redução do acetileno pelas raízes noduladas destacadas.

3.3. Instalação do experimento

3.3.1. Local de condução do experimento

O experimento I foi conduzido em câmara de crescimento em regime de 13 horas de luz fornecidas por lâmpadas fluorescentes de gás neon e incandescentes (400-700 nm) que forneciam uma luminosidade correspondente a 35 W/m^2 ; a temperatura média foi de 26°C para o período luminoso e 23°C para o período escuro e umidade relativa do ar de 50% e 60%, respectivamente para o período claro e para o período escuro.

Os experimentos II, III e IV foram conduzidos em casa-de-vegetação onde as temperaturas médias diárias foram: experimento II - $26,5/24,3^\circ\text{C}$ (dia/noite); experimento III - $27,8/21,1^\circ\text{C}$ (dia/noite) e experimento IV - $28,2/22,3^\circ\text{C}$ (dia/noite).

3.3.2. Preparo dos vasos

Nos experimentos I e II utilizou-se vasos de Leonard modificados (VINCENT, 1970) (Figura 2), que receberam uma mistura de areia e vermiculita na proporção de 2:1 (v/v), previamente lavadas em água corrente por 48 horas e secas ao ar por 48 horas. Os vasos receberam 800 ml de solução nutritiva isenta de nitrogênio, modificada de Mc KNIGHT (1949), cuja composição química está na Tabela 11. Procedeu-se então à esterilização dos vasos em autoclave a 120°C por quatro horas.

Nos experimentos III e IV utilizou-se vasos de plástico com capacidade de 2,5 kg, que foram preenchidos com areia e vermiculita (1:3, v/v) previamente lavadas em água corrente por 48 horas, secas ao ar por 48 horas e esterilizadas em autoclave a 120°C por 4 horas. Cada vaso recebeu 250 ml de solução nutritiva isenta de nitrogênio, modificada de Mc KNIGHT (1949) e que também foi esterilizada em autoclave a 120°C por quatro horas.

No experimento IV foi estudado o efeito do N, sendo adicionadas duas doses de nitrogênio, de 7 ppm de N e 35 ppm de N, sob a forma de KNO_3 .

Tabela 11. Solução nutritiva, isenta de nitrogênio, para teste de nodulação (modificada de Mc KNIGHT, 1949).

$\text{CaSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	150 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	20 g
KH_2PO_4	20 g
KCl	30 g
Sol. A-Z	100 ml
Sol. D	100 ml
H_2O destilada	4700 ml
NaOH (1 M)	70 ml
pH final = 6,4	
Diluição em água destilada na proporção 1:10.	

Solução A-Z de micronutrientes

H_3BO_3	2,86 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	2,03 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,22 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,08 g
$\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,09 g
Diluição em 1000 ml de água destilada	

Solução D

FeCl_3 . sol.	16,8 ml
EDTA Na . $2 \text{H}_2\text{O}$	2,0 g
Diluição em 1000 ml de água destilada	

3.3.3. Preparo do inoculante

As estirpes que estavam em meio YMA foram inoculadas separadamente em Erlenmeyer de 250 ml contendo meio YMB, modificado de FRED *et alii* (1932) e cuja composição está na Tabela 9. Os frascos Erlenmeyer foram colocados em agitador rotatório por três dias à temperatura de 37°C, onde cresceram até a turbidez.

3.3.4. Inoculação das sementes

As sementes foram colocadas em álcool absoluto por 3 minutos, a fim de ocorrer a solubilização dos lipídeos. Após isso as sementes foram esterilizadas por cinco minutos com solução de sublimado corrosivo, 0,2% HgCl₂ acidificado, e lavadas dez vezes com água destilada esterilizada (VINCENT, 1970).

Procedeu-se então à inoculação das sementes, colocando-se 1 ml de inoculante/15 sementes (com cerca de 10⁸ células/ml). As sementes permaneceram em contato com o inóculo durante uma hora.

3.3.5. Semeadura e condução do experimento

As sementes inoculadas foram semeadas em número de 4 por vaso, tomando-se todos os cuidados para não haver contaminação. Os vasos receberam então uma camada de aproximadamente 0,5 cm de areia lavada e esterilizada, a fim de diminuir as perdas de água do solo por evaporação, bem como para diminuir a contaminação das estirpes. Distribuiu-se ao acaso 10-15 vasos com sementes sem inoculante, a fim de verificar se ocorria a contaminação dos inóculos utilizados. Aos oito dias realizou-se o desbaste, permanecendo 2 plantas/vaso.

Quando era necessário completava-se o volume de água dos vasos de Leonard com água destilada e esterilizada. Nos experimentos com vaso de plástico, fornecia-se água destilada diariamente às plantas, tomando-se como referência o peso dos vasos no início do experimento após o re-

cebimento de solução nutritiva. Fazia-se o sorteio, diariamente, de um vaso de cada tratamento, e a água era fornecida para as outras plantas do tratamento baseada na diferença de peso do vaso sorteado.

Aos 20 e 35 dias após a germinação (DAG) trocou-se a solução nutritiva dos vasos de Leonard, por uma nova solução igual à inicial. Aos vasos de plástico acrescentou-se, nessas mesmas épocas, 200 ml de solução nutritiva/vaso.

3.3.6. Colheita dos experimentos e determinação do teor de nitrogênio

A colheita das plantas foi realizada nas seguintes épocas: 45 DAG (experimento I); 15, 25, 35 e 45 dias DAG (experimento II); 25, 40 e 55 DAG (experimento III); 25, 45 e 65 DAG (experimento IV).

Separou-se a parte aérea das raízes na altura do colo da planta. A parte aérea foi colocada em sacos de papel e posta para secar em estufa a 70-80°C até atingir peso constante. As raízes e nódulos foram colocados em frascos de vidro para determinação da redução do acetileno e evolução dos gases, como será visto adiante. Após essas determinações as raízes foram cuidadosamente lavadas em água, para se retirar a areia e vermiculita, e os nódulos foram destacados, colocando-se o material em estufa a 70-80°C até atingir peso constante, determinando-se então o peso de matéria seca. O nitrogênio foi avaliado pelo método semi-micro Kjeldahl, conforme SARRUGE e HAAG (1974), determinando-se a %N na matéria seca dos tecidos.

Determinou-se o peso de matéria seca, %N e N total dos seguintes órgãos de planta:

- Experimento I e II - parte aérea, raiz e nódulos.
- Experimento III - parte aérea, raiz, nódulos e vagens.
- Experimento IV - parte aérea, raiz, nódulos, sementes e cascas das sementes.

3.4. Análise dos gases

3.4.1. Gases utilizados

Os gases utilizados foram: C_2H_2 e H_2 (White Martins Co.) , N_2 e Ar (Oxigênio do Brasil S.A.), padrões de C_2H_4 e C_3H_8 (99,95% pureza, Messer Griesheim, Hamburgo - Alemanha).

3.4.2. Cromatografia gasosa

As análises de redução do C_2H_2 foram feitas em cromatógrafo do tipo Beckman modelo GC-65 usando detector de chama de hidrogênio a $50^{\circ}C$ e coluna de vidro de 1/8 polegada (= 3,2 mm, diâmetro externo) x 0,50 m, contendo Porapak N de 100-120 mesh a $110^{\circ}C$. Como gás carregador foi utilizado o N_2 a um fluxo de 40 ml/min. Preparou-se padrões de C_2H_4 nas concentrações de 250-500-1000 vpm, a fim de verificar a linearidade da relação entre altura do pico de etileno e concentração de etileno. Para a determinação do pico padrão utilizou-se 500 vpm de C_2H_4 .

As análises de evolução do H_2 e do CO_2 foram feitas em cromatógrafo do tipo Beckman modelo GC-65, usando detector de condutividade térmica a $40^{\circ}C$ e coluna de metal de 1/8 polegada (= 3,2 mm, diâmetro externo) x 1,50 m, contendo Porapak Q de 80-100 mesh a $50^{\circ}C$. A escolha do gás carregador foi feita levando-se em consideração a condutividade térmica dos gases a $100^{\circ}C$: $H_2 = 49,94$ CGS e $CO_2 = 5,06$ CGS.

Os gases carregadores usados para a determinação do H_2 foram $N_2 = 7,18$ CGS (experimentos I e II) e Ar = 5,09 CGS (experimento III e IV) num fluxo de 20 ml/minuto. Para a determinação do CO_2 utilizou-se como gás carregador o $H_2 = 49,94$ CGS (experimento III e IV) num fluxo de 20 ml/minuto. Preparou-se padrões de H_2 nas concentrações de 100, 250 e 500 vpm e padrões de CO_2 nas concentrações de 250, 500 e 750 vpm para verificar a linearidade da relação entre altura do pico de H_2 e CO_2 e concentração de H_2 e CO_2 . Para a determinação dos picos padrões utilizou-se 250 vpm de H_2 e 500 vpm de CO_2 .

3.4.3. Espectrometria de massa

Na 2a. e na 3a. coletas o H_2 e o CO_2 foram analisados em espectrômetro de massa ATLAS-Varian-MAT modelo CH-4.

3.5. Procedimento para análise da redução de C_2H_2 e evolução de H_2 e de CO_2 pelos nódulos

3.5.1. Determinação da redução do C_2H_2 e evolução do H_2 usando sistemas intactos

Nas três primeiras medições do experimento I utilizou-se sistemas intactos (Figura 3), baseados em modificações de BALANDREAU e DOMERGUES (1973), BURRIS (1974b), BALANDREAU e DUCERF (1978) e SAITO (1978).

No dia das análises cobriu-se a parte superior do vaso com polietileno, deixando a descoberto a parte aérea das plantas. Introduziu-se no vaso um tubo oco de cobre de 5 mm de diâmetro, tendo na extremidade inferior um orifício de 2,5 cm e na extremidade superior uma borracha vedada, de tal modo que o orifício inferior ficasse em contato com a rizosfera. O sistema foi vedado na altura do colo das plantas com apiezon (James G. Bidle Co.) e nos frascos de vidro com fita isolante. A determinação do volume dos sistemas foi feita indiretamente injetando-se em uma amostragem de vasos, quantidades conhecidas do propano, que é um gás inerte, e cuja concentração pode ser determinada por cromatografia gasosa (BALANDREAU e DUCERF, 1978; BODDEY, 1980b). Após a determinação do volume médio dos sistemas injetou-se 10% de acetileno (HARDY *et alii*, 1968) e o propano foi utilizado como padrão interno para a determinação do volume de cada sistema. Após 30 minutos de incubação em temperatura ambiente (HARDY *et alii*, 1968), retirou-se as amostras gasosas em seringas de plástico descartáveis de 1 ml que haviam permanecido por 5 minutos em recipientes nos quais se fez vácuo. As amostras foram armazenadas em rolhas de borracha numeradas por um tempo máximo de uma hora, período esse em que a perda de gás não é significativa (SAITO, 1978). Injetou-se então 0,5 ml de cada amostra no cromatógrafo de gás.

Figura 3. Câmara de incubação para análise da redução do C_2H_2 e evolução do H_2 em sistemas intactos.

A análise do H_2 foi feita utilizando o mesmo sistema, apenas não se injetando acetileno, e as amostras da atmosfera rizosférica foram retiradas 60 minutos após a vedação do sistema.

3.5.2. Determinação da redução do C_2H_2 em raízes destacadas

Na última coleta do experimento I e em todas as coletas dos experimentos II, III e IV utilizou-se raízes destacadas. Seguiu-se as recomendações básicas para leguminosas dadas por HARDY *et alii* (1968), MAGUE e BURRIS (1972), BODDEY (1980a, 1980b).

A coleta era feita entre 8-9 horas da manhã, que é o período de máxima atividade da nitrogenase. A parte aérea foi separada da raiz na altura do colo da planta, a fim de diminuir o volume da amostra e possível formação de etileno pela parte aérea (HARDY *et alii*, 1968). As raízes foram levemente sacudidas para retirar a areia e vermiculita e foram colocadas em frascos de 500 ml e 1000 ml, onde ocuparam no máximo 20% do volume, a fim de não haver esgotamento de O_2 e alteração das reações enzimáticas (SPRENT, 1969; WAUGHMAN, 1972). As raízes destacadas foram utilizadas por diversos autores (HARDY *et alii*, 1968; HARDY *et alii*, 1973; MINCHIN e PATE, 1973), uma vez que são mais ativas do que os nódulos destacados (MASTERSON e MURPHY, 1980). Além disso, a distribuição dos nódulos é heterogênea e a retirada deles causaria perda da fonte de energia (glicose) que se encontra armazenada nas raízes, por isso não se recomenda que sejam destacados (HARDY *et alii*, 1968). Os vidros contendo as raízes noduladas foram fechados com tampas rosqueadas de alumínio que tinham na sua parte superior rolhas do tipo "serum cap" de 15 mm de diâmetro (Figura 4).

Sabe-se que geralmente uma $p\ C_2H_2$ de 0,1 - 0,2 atm é suficiente para saturar o sistema nitrogenase (HARDY *et alii*, 1968; MAGUE e BURRIS, 1972). Desse modo, realizou-se previamente um estudo com 20 plantas e determinou-se que uma $p\ C_2H_2 = 0,13$ saturava o sistema enzimático. A evolução do H_2 não foi detectada nessa atmosfera, pois é inibida em presença de C_2H_2 .

Baseando-se nessa determinação, injetou-se 13% de C_2H_2 nos vidros, tomando-se o cuidado de retirar previamente 13% da atmosfera do vidro, a fim de que a pressão não fosse alterada. Utilizou-se também 9 frascos correspondentes a três tipos de controle: frascos com raízes noduladas sem a adição de acetileno, a fim de verificar a produção de etileno pelo sistema; frascos com atmosfera local + 13% de acetileno, a fim de verificar a absorção e desaparecimento de C_2H_2 no sistema; frascos com atmosfera local, a fim de verificar a existência de etileno no local do experimento. Retirou-se quatro amostras do frasco com atmosfera local + C_2H_2 no início do experimento e quatro amostras após 30 minutos, a fim de se verificar a perda de gases das seringas. Após 30 minutos retirou-se as amostras em seringas de plástico descartáveis que haviam ficado por 5 minutos no vácuo. O tempo entre a coleta e a retirada das amostras não ultrapassou duas horas (HARDY *et alii*, 1968). As amostras foram armazenadas em rolhas de borracha e procedeu-se à injeção de 0,5 ml no cromatógrafo.

3.5.3. Determinação da evolução do CO_2 por raízes noduladas

O procedimento desde a coleta das raízes até a retirada da amostra de gases foi semelhante ao item 3.5.2., apenas não se injetando C_2H_2 . Foram usados frascos controle para determinar a presença de CO_2 no local do experimento.

3.5.4. Determinação da evolução do H_2 e do CO_2 pelos nódulos destacados

Utilizou-se nódulos destacados com pequenos segmentos radiculares (± 2 cm) para a determinação da evolução do H_2 (SCHUBERT *et alii*, 1977, 1978) e do CO_2 (MINCHIN e PATE, 1973; HERRIDGE e PATE, 1977). SCHUBERT e EVANS (1976) mostraram que não há diferenças entre as medidas de H_2 *in situ* e as medidas de nódulos destacados, o mesmo acontecendo com a evolução do CO_2 (MINCHIN e PATE, 1973). O segmento de raiz preso ao nódulo impede a injúria, permite um suprimento de energia e altera a evolução do CO_2 em cerca de 10% (LAYZELL *et alii*, 1979).

Os nódulos destacados foram colocados em frascos de vidro de 70 ml de tal modo que não ocupassem mais de 20% do seu volume. No fundo do frasco foi colocado um papel de filtro umidecido. Essas duas medidas procuraram evitar o estresse de oxigenação e dessecação (SPRENT, 1969; WAUGHMAN, 1972). Os frascos foram hermêticamente fechados com tampas de borracha e permaneceram em incubação por 30 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram retiradas em seringas de plástico de 1 ml e armazenadas em rolhas de borracha numeradas por tempo máximo de uma hora, injetando-se 5 ml da amostra no cromatógrafo. Foram usados frascos controle (branco), para controlar a produção de CO_2 e H_2 no local do experimento.

3.6. Delineamento estatístico

O delineamento estatístico utilizado foi blocos ao acaso.

O número de repetições foi: Experimento I: 4 (10 tratamentos e uma época de coleta = 40 vasos); Experimento II: 4 (6 tratamentos e 4 épocas de coleta = 96 vasos); Experimento III: 5 (12 tratamentos e 3 épocas de coleta = 180 vasos); Experimento IV: 3 repetições (1ª e 2ª coletas) e 4 repetições (última coleta), totalizando 180 vasos).

3.7. Cálculos

3.7.1. Cálculo do C_2H_4 , H_2 e CO_2 determinados por cromatografia gasosa

Primeiramente realizou-se a correção das amostras para condições normais de temperatura e pressão (C.N.T.P.)

$$\frac{760 \text{ mm Hg} \times 22.400 \text{ cm}^3}{273^\circ\text{K}} = \frac{714 \text{ mm} \times V_1}{298^\circ\text{K}}$$

$$V_1 = 26026 \text{ ml ou } 26,0 \text{ l}$$

Uma amostra de 0,5 ml de 500 vpm de C_2H_4 contém $0,25 \times 10^{-3}$ ml de C_2H_4 (0,5 ml C_2H_4 injetado $\times 0,5 \cdot 10^{-3}$ ml - concentração do padrão)

$$\begin{array}{rcl} 1 \text{ mol } C_2H_4 & \text{-----} & 26026 \text{ ml ou cm}^3 \\ y & \text{-----} & 0,25 \times 10^{-3} \text{ ml} \end{array}$$

$$y = 9,6 \text{ nmoles } C_2H_4/\text{amostra}$$

$$\begin{array}{rcl} 9,6 \text{ nmoles de } C_2H_4 & \text{-----} & H \text{ (mm)} \times A \times R \\ K & \text{-----} & 1 \text{ mm} \end{array}$$

$$K \text{ (nmoles } C_2H_4/\text{mm)} = \frac{\text{nmoles } C_2H_4}{H \times A \times R}$$

onde

H = altura do pico de C_2H_4 em mm

A = atenuação da leitura

R = range do aparelho

Para as amostras injetadas teremos:

$$C_2H_4 \text{ (nmoles/hora)} = K \times K' \times \frac{\text{volume do frasco}}{\text{volume injetado}} \times \frac{1}{\text{tempo de incubação}}$$

onde

$K' = \text{altura do pico da amostra (mm)} \times \text{atenuação} \times \text{range}$

Procedeu-se do mesmo modo para o H_2 e o CO_2

3.7.2. Cálculo do volume do frasco e do C_2H_4 produzido na presença de propano (usado como gás traçador)

(após a correção para C.N.T.P.)

$$Q = \frac{10^{-3}}{26,0} \cdot \frac{mp}{V} \cdot \frac{H'}{H} \cdot \frac{h}{h'} \quad (\text{BALANDREAU e DUCERF, 1978})$$

onde

Q = quantidade de C_2H_4 produzida ($\mu\text{moles } C_2H_4/h$)

m = volume do gás traçador propano (ml) injetado no sistema, e formado de p (ml) do propano diluidos em V (ml) de ar

H e H' = alturas dos picos padrões de etileno e propano (para quantidades iguais injetadas)

h e h' = alturas dos picos de etileno e propano nas amostras

3.7.3. Cálculo do H_2 e do CO_2 determinados por espectrometria de massa

Os picos do CO_2 e do H_2 foram medidos em mm, multiplicados pela voltagem da leitura e descontados os picos da contagem de fundo do aparelho.

A precisão dos picos do aparelho depende da concentração percentual de cada componente molecular. Deve-se, então, utilizar os fatores de correção a partir de amostras de composição conhecida para se obter a porcentagem real de cada componente. Os valores de N_2 , O_2 , CO_2 foram obtidos por CAMARGO (1971) e o de H_2 por SAITO (1978).

H_2	3,310
N_2	0,980
O_2	1,100
CO_2	0,995

3.7.4. Cálculo do N_2 (C_2H_2) fixado

As equações de reação do N_2 e do C_2H_2 podem ser expressas da seguinte maneira:

A relação teórica dos substratos é 3:1 podendo ser utilizada na equação de quantificação do N_2 fixado.

$$mg\ N = \frac{\text{mmoles } C_2H_4 \times 28}{3}$$

Somando-se as médias semanais de redução de acetileno temos a quantidade de N_2 (C_2H_2) fixada no ciclo (HARDY *et alii*, 1968).

3.7.5. Eficiência relativa dos elétrons destinados ao complexo enzimático da nitrogenase

O complexo nitrogenase, além de reduzir o N_2 , também catalisa a redução do H^+ ou H_3O^+ em uma reação dependente de ATP que pode representar grandes perdas energéticas (EVANS *et alii*, 1977). A eficiência relativa é uma relação que representa o fluxo de elétrons destinados ao complexo nitrogenase e que realmente são usados na redução de N_2 , pois o C_2H_2 usado para avaliar a atividade da nitrogenase inibe a evolução do H_2 (SMITH *et alii*, 1976), superestimando a quantidade de N_2 (C_2H_2) fixada.

$$ER = 1 - \frac{H_2 \text{ evoluído (ar)}}{C_2H_2 \text{ reduzido}} \quad (\text{SCHUBERT e EVANS, 1976})$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Experimento I

Neste experimento utilizou-se cinco cultivares de *Phaseolus vulgaris* (Carioca, Moruna, Venezuela-350, Tibagi e Aroana) e duas estirpes de *Rhizobium phaseoli* (C-05 e C-29 = 127 K-17). A análise da atividade da nitrogenase, avaliada pelo método da redução do C_2H_2 foi feita aos 15, 25 e 35 dias após a germinação (DAG) utilizando plantas inteiras em sistemas intactos, enquanto que aos 45 DAG foram utilizadas raízes noduladas destacadas.

A análise de variância encontra-se no Apêndice 3 e os resultados de peso de matéria seca e N total aos 45 DAG, a seguir discutidos, estão nas Tabelas 12 e 13 e na Figura 5.

Analisando-se o peso (de matéria seca) da parte aérea, verifica-se que maiores valores foram obtidos em Moruna e Carioca, que foram superiores aos das cultivares Aroana, Venezuela-350 e Tibagi, respectivamente em 43%, 52% e 80%. Essa superioridade pode estar relacionada a diferenças na capacidade fotossintética entre as plantas hospedeiras, ou também a diferenças no estabelecimento de um sistema simbiótico eficiente, uma vez que o suprimento adequado de nitrogênio favoreceria o crescimento da parte aérea.

Tabela 12. Interação entre cinco cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. e duas estirpes de *Rhizobium phaseoli* no peso de matéria seca (g/planta) da parte aérea, raiz e nódulos e na %N e N total (mg/planta) da parte aérea aos 45 dias após a germinação. Média de 4 repetições.

Estirpe de <i>R. phaseoli</i>	Cultivar de <i>P. vulgaris</i>	M.S. nódulos	M.S. raízes	parte aérea	
				M.S.	N total
C-05	Moruna	0,088 a*	0,321 ab	1,527 a	5,26 a
	Carioca	0,070 abc	0,267 abcd	1,402 ab	4,86 ab
	Aroana	0,069 abc	0,244 abcd	0,920 cd	4,67 abc
	Venezuela-350	0,076 a	0,307 abc	0,858 cd	3,92 d
	Tibagi	0,048 cd	0,238 bcd	0,750 d	4,68 abc
$\bar{X}$ da estirpe				1,091	4,68
C-29 (= 127 K-17)	Moruna	0,025 de	0,346 a	1,118 bc	4,52 bcd
	Carioca	0,049 bcd	0,255 abcd	1,265 ab	3,90 d
	Aroana	0,020 e	0,255 abcd	0,942 cd	3,99 cd
	Venezuela-350	0,073 ab	0,206 c	0,888 cd	3,82 d
	Tibagi	0,027 de	0,201 d	0,730 d	3,98 cd
$\bar{X}$ da estirpe				0,989	4,04
DMS ₁ (1%)				0,007	0,19
DMS ₂ (1%)				0,105	0,293
DMS ₂ (5%)				-	0,71

(*) Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente para DMS₂ pelo teste de Tukey ao nível indicado.

DMS₁... DMS p/ estirpe

DMS₂... DMS p/cultivar x estirpe

Tabela 13. Influência da cultivar de *Phaseolus vulgaris* L. na produção de matéria seca (g/planta) da parte aérea, raiz e nódulos e na %N e N total (mg/planta) da parte aérea aos 45 dias após a germinação. Média de 8 repetições.

Cultivar de <i>P. vulgaris</i>	M.S. nódulos	M.S. raízes	parte aérea		
			M.S.	%N	N total
Moruna	0,056 b*	0,334 a	1,332 a	4,89 a	65,80 a
Carioca	0,060 ab	0,261 ab	1,334 a	4,38 b	58,17 a
Aroana	0,044 bc	0,250 ab	0,931 b	4,33 b	40,26 b
Venezuela-350	0,074 a	0,256 ab	0,873 b	3,87 c	33,32 b
Tibagi	0,038 c	0,220 b	0,740 b	4,33 b	31,99 b
DMS (1%)	0,017	0,091	0,250	0,43	12,97

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

Figura 5. Valores de peso de matéria seca (g.pl^{-1}) e N total (mg.pl^{-1}) da parte aérea de cinco cultivares de *P. vulgaris* inoculadas com duas estirpes de *R. phaseoli* aos 45 dias após a germinação.

Em relação ao peso das raízes, houve diferença somente entre Moruna e Tibagi, com superioridade da primeira. Os maiores pesos de nódulos foram obtidos em Venezuela-350 e Carioca, enquanto que os menores ocorreram em Tibagi.

Observa-se, na Tabela 12, que as plantas inoculadas com a estirpe C-05 apresentaram maior peso de parte aérea e de nódulos do que as inoculadas com C-29, não ocorrendo, porém, diferença no peso das raízes.

Verificou-se o efeito da interação cultivar x estirpe em todos os parâmetros de peso de matéria seca analisados. O efeito da estirpe só foi notado na cultivar Aroana que, inoculada com C-05, mostrou superioridade no peso da parte aérea (36%), e peso dos nódulos (252%) em relação à simbiose com C-29. O sistema simbiótico mais eficiente, Moruna x C-05, superou em 109% o peso da parte aérea do sistema menos eficiente, Tibagi x C-29.

Os teores mais elevados de N total da parte aérea foram encontrados em Moruna e Carioca (Tabela 13), não havendo diferença estatística para as cultivares Aroana, Tibagi e Venezuela-350. Moruna acumulou, aos 45 DAG, 105% a mais do que Tibagi, 97% a mais do que Venezuela-350 e 63% a mais do que Aroana. VEIGA (1980), trabalhando com feijoeiro em solução nutritiva, não encontrou diferenças nos teores de N total entre essas cultivares, o que talvez tenha ocorrido devido às menores produções de matéria seca obtidas pelo referido autor.

Moruna produziu os nódulos mais eficientes na fixação, que apresentaram taxas de fixação de 1175 mg N/g de nódulo aos 45 DAG, ao passo que em Venezuela-350 os nódulos fixaram 450 mg N/g de nódulo. A maior massa nodular de Venezuela-350, portanto, não correspondeu a uma maior fixação do nitrogênio.

Os estudos de GRAHAM e ROSAS (1977) e GRAHAM e HALLIDAY (1977) mostraram que as cultivares de *P. vulgaris* de hábito trepador apresentaram maior fixação de nitrogênio do que as cultivares de hábito prostrado, e isso ocorre devido a diferenças na habilidade de parcelas e mobilizar carboidratos para o sistema radicular. Embora as quantidades de car

boidratos sejam semelhantes nas cultivares de hábito trepador e nas de hábito prostrado, as primeiras mantêm maior proporção deles na forma solúvel. Essa hipótese explicaria a superioridade de Carioca sobre Aroana, Venezuela-350 e Tibagi no peso da parte aérea e N total, uma vez que Carioca possui crescimento do tipo indeterminado 3, isto é, prostrado com tendência a trepador, enquanto que as demais são do tipo indeterminado 2, prostrado (SILVA, 1981). Essa teoria, porém, não se aplica a Moruna, que apresentou os maiores teores de N na parte aérea, embora seja de crescimento do tipo indeterminado 2. RENNIE e KEMP (1980) também não correlacionaram o peso de matéria seca e Nitrogênio fixado em cultivares de *Phaseolus vulgaris* com o hábito de crescimento da planta.

Observa-se, na Tabela 12, que as plantas inoculadas com a estirpe C-05 apresentaram teor de N na parte aérea 30% superior ao das plantas inoculadas com C-29. Essa diferença, porém, só foi significativa, pelos testes estatísticos na cultivar Moruna, que apresentou 61% a mais de N total da parte aérea quando foi inoculado com C-05. A superioridade da estirpe C-05 sobre C-29 está de acordo com os trabalhos de SAITO e CARDOSO (1977), SAITO *et alii* (1978) e CASSINI (1980).

Os dados referentes à redução do C_2H_2 , evolução de H_2 e eficiência relativa dos elétrons destinados à nitrogenase (ER) encontram-se nas Tabelas 14 e 15, e estão representadas nas Figuras 6 e 7.

A análise da evolução do H_2 é fundamental para avaliar-se a eficiência dos sistemas fixadores de nitrogênio. Isso ocorre porque os prótons H^+ e H_3O^+ , sempre presentes em meio aquoso, são um segundo substrato natural para a enzima nitrogenase, que reduz o H^+ concomitantemente com a redução do N_2 (HWANG *et alii*; BURRIS, 1979). O C_2H_2 , substrato alternativo da enzima nitrogenase largamente empregado nos estudos sobre detecção e quantificação da fixação de nitrogênio, é um inibidor não competitivo do N_2 (RIVERA-ORTIZ e BURRIS, 1975), mas também inibe a evolução do H_2 (HWANG *et alii*, 1973). Após os estudos realizados por SCHUBERT e EVANS (1976) e EVANS *et alii* (1977), ficou evidente que o desvio de elétrons para a evolução do H_2 ocorre *in vivo* e pode representar uma considerável perda da energia, uma vez que são utilizados cerca de 4 ATP e $2e^-$ /mol de

Tabela 14. Efeito da interação entre cinco cultivares de *Phaseolus vulgaris* e duas estirpes de *Rhizobium phaseoli* na redução de C_2H_2 ($\mu\text{moles} \cdot \text{pl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), evolução de H_2 pelos nódulos ($\mu\text{moles} \cdot \text{pl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) e eficiência relativa (ER) dos elétrons destinados à nitrogenase. Aos 15, 25 e 35 dias após a germinação (DAG) utilizou-se sistemas inteiros e aos 45 DAG utilizou-se raízes destacadas. Média de 4 repetições.

Estirpe de <i>R. phaseoli</i>	Cultivar de <i>P. vulgaris</i>	Redução de C_2H_2	Evolução de H_2	ER $\frac{a}{b}$	Redução de C_2H_2	Evolução de H_2	ER $\frac{a}{b}$
		15 dias			25 dias		
C-05	Moruna	3,771 de	0,649 f	0,83 a	5,368 c	0,840 c	0,84 a
	Carioca	4,054 bc	0,833 d	0,80 ab	8,191 a	1,249 a	0,85 a
	Aroana	7,436 a	1,493 a	0,80 ab	6,726 b	1,202 a	0,82 ab
	Venezuela-350	3,907 cd	1,005 c	0,74 bc	3,940 d	1,046 b	0,74 cd
	Tibagi	3,235 f	0,946 cd	0,71 cd	3,606 de	1,027 b	0,72 d
	$\bar{x}$ da estirpe	4,481	0,985	0,78	5,566	1,073	0,79
C-29 (= 127 K-17)	Moruna	2,930 g	0,662 ef	0,78 ab	2,750 def	0,835 c	0,70 d
	Carioca	3,620 e	0,884 cd	0,76 bc	3,718 de	0,830 c	0,78 bc
	Aroana	4,240 b	1,283 b	0,70 cd	3,560 de	1,273 a	0,64 e
	Venezuela-350	3,033 fg	1,000 c	0,67 d	2,554 ef	0,930 bc	0,64 e
	Tibagi	2,237 h	0,801 de	0,65 d	1,997 f	0,778 c	0,61 e
	$\bar{x}$ da estirpe	3,212	0,926	0,71	2,916	0,929	0,67
	DMS ₁ (1%)	0,158	0,059	0,02	0,325	0,040	0,02
	DMS ₂ (1%)	0,221	0,151	0,07	1,234	0,154	0,05
		35 dias			45 dias		
C-05	Moruna	4,726 b	0,896 cd	0,81 a	2,315 b	0,636 c	0,73 a
	Carioca	5,183 a	1,196 b	0,77 b	2,414 b	0,663 c	0,73 a
	Aroana	4,467 c	1,686 a	0,62 e	2,464 a	0,974 a	0,60 cd
	Venezuela-350	3,108 d	0,985 bc	0,68 cd	2,324 de	0,960 a	0,59 d
	Tibagi	2,771 e	0,976 bc	0,65 de	2,189 f	0,950 a	0,57 d
	$\bar{x}$ da estirpe	4,051	1,148	0,71	2,341	0,837	0,64
C-29 (= 127 K-17)	Moruna	2,478 f	0,723 de	0,71 c	1,535 g	0,517 d	0,66 b
	Carioca	3,275 d	0,993 bc	0,70 c	2,385 bc	0,860 b	0,64 bc
	Aroana	2,446 f	1,011 bc	0,59 f	2,355 cd	1,013 a	0,57 d
	Venezuela-350	2,169 g	0,927 cd	0,57 fg	1,196 h	0,668 c	0,45 e
	Tibagi	1,320 h	0,609 e	0,54 g	1,165 h	0,654 c	0,44 e
	$\bar{x}$ da estirpe	2,338	0,853	0,62	1,727	0,742	0,55
	DMS ₁ (1%)	0,071	0,061	0,01	0,028	0,020	0,01
	DMS ₂ (1%)	0,232	0,231	0,04	0,033	0,075	0,05

(*) Valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 1%, para DMS₂.

$$\frac{a}{b} \text{ ER} = 1 - \frac{H_2 \text{ (ar)}}{C_2H_2 \text{ reduzida}}$$

(SCHUBERT e EVANS, 1976).

DMS₁ ... DMS p/ estirpe
DMS₂ ... DMS p/ cultivar x estirpe

Tabela 15. Influência da cultivar de *Phaseolus vulgaris* L. na redução de C_2H_2 ($\mu\text{moles} \cdot \text{pl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), evolução do H_2 pelos nódulos ($\mu\text{moles} \cdot \text{pl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) e eficiência relativa (ER) dos elétrons destinados à nitrificação. Aos 15, 25 e 35 dias após a germinação utilizou-se sistemas intactos e aos 45 DAG utilizou-se raízes destacadas. Médias de 8 repetições.

Cultivar de <i>P. vulgaris</i>	Redução de C ₂ H ₂	Evolução de H ₂		ER $\frac{a}{b}$	Redução de C ₂ H ₂	Evolução de H ₂		ER $\frac{a}{b}$
		15 dias	25 dias			45 dias	55 dias	
Moruna	3,350 c*	0,656 d	0,80	0,80	4,059 b	0,838 d	0,77 b	0,77 b
Carioca	3,837 b	0,858 c	0,78	0,78	5,954 a	1,040 b	0,82 a	0,82 a
Aroana	5,838 a	1,388 a	0,75	0,75	5,143 a	1,238 a	0,73 c	0,73 c
Venezuela-350	3,470 c	1,002 b	0,70	0,70	3,247 bc	0,988 bc	0,69 d	0,69 d
Tibagi	2,736 d	0,874 bc	0,68	0,68	2,802 c	0,902 cd	0,66 e	0,66 e
DMS (1%)	0,189	0,129	-	-	1,055	0,131	0,03	0,03
		35 dias				45 dias		
Moruna	3,602 b	0,810 c	0,76 a	0,76 a	1,925 b	0,576 c	0,70 a	0,70 a
Carioca	4,229 a	1,094 b	0,74 b	0,74 b	2,400 a	0,762 b	0,68 a	0,68 a
Aroana	3,456 b	1,348 a	0,60 d	0,60 d	2,410 a	0,994 a	0,58 b	0,58 b
Venezuela-350	2,777 c	0,956 bc	0,62 c	0,62 c	1,760 c	0,814 b	0,52 c	0,52 c
Tibagi	2,046 d	0,792 c	0,60 d	0,60 d	1,677 d	0,802 b	0,50 c	0,50 c
DMS (1%)	0,229	0,198	0,02	0,02	0,028	0,064	0,03	0,03

(*) Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível indicado.

$$\frac{a/}{ER} = 1 - \frac{H_2 \text{ (ar)}}{C_2H_2 \text{ reduzido}} \quad (\text{SCHUBERT e EVANS, 1976}).$$

Figura 6. Variação da atividade da nitrogenase (redução do C_2H_2) e evolução do H_2 durante o ciclo de cinco cultivares de *P. vulgaris* inoculadas com duas estirpes de *R. phaseoli*. Aos 15, 25 e 35 dias após a germinação (DAG) as medidas foram feitas em plantas inteiras intactas e aos 45 DAG utilizou-se raízes noduladas destacadas (redução de C_2H_2) e nódulos destacados (evolução do H_2).

Cultivar de *P. vulgaris* Estirpe de *R. phaseoli*

- 1- NORUNA
2- CARIOCA
3- ARJOANA
4- VENEZUELA-390
5- TIBAGI
- C-05
▨ C-29(=127 K-17)

Figura 7. Mudanças na eficiência relativa dos elétrons destinados à nitrogenase durante o ciclo de cinco cultivares de *P. vulgaris* inoculadas com duas estirpes de *R. phaseoli*.

H_2 evoluído (CHING *et alii*, 1975; EVANS *et alii*, 1981), energia esta que pode ser perdida para o meio ambiente. Desse modo, o método da redução do C_2H_2 pode resultar em uma superestimativa do nitrogênio fixado e em altas relações $C_2H_2 : N_2$ reduzido (HARDY *et alii*, 1973).

Observa-se, na Tabela 14, o efeito da estirpe nas taxas de redução do C_2H_2 , que foram mais elevadas nas plantas inoculadas com a estirpe C-05. Essas plantas também apresentaram maior evolução do H_2 , exceto aos 45 DAG, mas a ER sempre foi superior à das plantas inoculadas com C-29. A ER média das quatro épocas de análise foi de 0,73 para a estirpe C-05 e de 0,64 para C-29.

Diversos autores afirmam que a evolução do H_2 depende exclusivamente da estirpe de bactéria (DIXON, 1967; SCHUBERT e EVANS, 1977; CARTER *et alii*, 1978; EVANS *et alii*, 1980). O papel da estirpe de bactéria na evolução do H_2 , estaria relacionado principalmente com a informação genética para a síntese da enzima hidrogenase unidirecional independente de ATP, que oxidaria o H_2 evoluído, recuperando até 33% da energia perdida nessa reação (EVANS *et alii*, 1981; PATE *et alii*, 1981).

As estirpes utilizadas neste experimento, porém, não apresentaram hidrogenase ativa em meio de cultura pelo teste de MAIER *et alii* (1978). O efeito da estirpe na ER vem a indicar, portanto, que mesmo na ausência de hidrogenase, a estirpe influi na proporção dos elétrons destinados ao complexo da nitrogenase e que são perdidos na evolução do H_2 .

Verifica-se, na Tabela 15, que houve efeito da cultivar na redução do C_2H_2 , e na evolução do H_2 . Aos 15 DAG, Aroana apresentou maior redução do C_2H_2 , Moruna e Venezuela-350 ocuparam uma posição intermediária e Tibagi foi inferior às demais. Aroana apresentou a maior taxa de evolução de H_2 , e a menor, ocorreu em Moruna, resultando em uma ER de 0,80 na cultivar Moruna, enquanto que em Aroana, Tibagi e Carioca as ER foram respectivamente 0,75, 0,68 e 0,78.

Aos 25 DAG, Aroana ainda apresentou a maior taxa de redução do C_2H_2 e maior evolução do H_2 , com uma ER de 0,73, enquanto que em Carioca e Moruna as ER foram respectivamente, 0,82 e 0,77. Moruna não diferiu

de Carioca na redução do C_2H_2 , mas evoluiu 66% a menos de H_2 , indicando a existência de um sistema energeticamente mais econômico, que desviou 16% a menos dos elétrons destinados à nitrogenase. Aos 45 DAG as maiores taxas de redução do C_2H_2 ocorreram em Carioca e Aroana, e a maior evolução do H_2 ocorreu em Aroana.

Como já foi dito, muitos autores acreditam que a evolução do H_2 depende exclusivamente da estirpe de bactéria. DIXON (1972) e SCHUBERT *et alii* (1977) sugeriram, porém, que a planta hospedeira poderia apresentar um papel na evolução do H_2 , talvez pela indução da síntese de uma hidrogenase ativa. Recentemente, GIBSON *et alii* (1981) e KEYSER *et alii* (1981), verificaram que a evolução do H_2 dependia do genótipo da planta hospedeira, o que também está de acordo com os resultados encontrados neste experimento.

Na Tabela 14, observa-se o efeito da interação cultivar x estirpe na redução do C_2H_2 , evolução do H_2 e ER. O pico da atividade da nitrogenase ocorreu, quando as cultivares estavam inoculadas com C-05, aos 25 DAG, mas quando Moruna e Aroana foram inoculadas com C-29, o pico ocorreu aos 35 DAG, como pode ser visto na Figura 6.

Comparando-se os dados de redução de C_2H_2 , ER e N total da parte aérea, verifica-se que Moruna e Carioca apresentaram os maiores teores de N total na parte aérea, embora Aroana tenha apresentado as maiores taxas de redução do C_2H_2 . A maior evolução de H_2 em Aroana conduziu à menor ER e menores teores de N fixado. Carioca também apresentou taxas de redução do C_2H_2 mais elevadas do que Moruna, mas a maior evolução do H_2 fez com que a ER diminuísse, não implicando em diferenças no teor de N total.

A média dos valores de ER nas cinco cultivares foi: Carioca - 0,76; Moruna - 0,76; Aroana - 0,66; Venezuela-350 - 0,63 e Tibagi - 0,61, observando-se que a ER foi relacionada com o N total, uma vez que Moruna e Carioca apresentaram os maiores teores de N na parte aérea. A ER média das quatro épocas em C-05 foi de 0,73, e em C-29 foi de 0,63, havendo uma relação positiva com os teores de nitrogênio fixado.

BETHLENFALVAY e PHILLIPS (1977) realizando experimento com

P. vulgaris, verificaram que a ER variou de 0,6 a 0,8, e SAITO *et alii* (1980b) encontraram valores entre 0,65 e 0,68. Neste experimento, embora os resultados estejam de acordo com os dos autores mencionados, encontrou-se sistemas mais eficientes, como Carioca x C-05 (ER = 0,85 aos 25 DAG) e menos eficientes, como Tibagi x C-29 (ER = 0,44 aos 45 DAG).

Apesar de muitos autores terem encontrado uma boa correlação entre os valores de redução do C_2H_2 e o teor de N total da planta, neste experimento isso não ocorreu, provavelmente devido à evolução do H_2 . Como o C_2H_2 inibe a evolução do H_2 , se não fosse feita a análise desse gás haveria um erro de até 56% na estimativa do nitrogênio fixado. A interpretação dos resultados da redução do C_2H_2 nos apontaria a cultivar Aroana como a mais promissora na fixação do nitrogênio, quando na verdade os melhores desempenhos foram obtidos por Moruna e Carioca. RENNIE e KEMP (1980) e SAITO *et alii* (1980b) também não encontraram boa correlação entre C_2H_2 reduzido e N total em *P. vulgaris*.

4.2. Experimento II

Neste experimento foram utilizadas duas cultivares de *P. vulgaris* (Carioca e Venezuela-350) e três estirpes de *R. phaseoli*, sendo que duas delas (C-05 e C-29 = 127 K-17) não apresentaram hidrogenase ativa, que esteve presente em C-88 (= SEMIA 487), de acordo com o método de MAIER *et alii* (1978).

A enzima hidrogenase oxida o H_2 , em uma reação independente de ATP, resultando na produção de H^+ e ATP (DIXON, 1967; 1968; 1972; 1975; EVANS *et alii*, 1980). Essa reciclagem representa um mecanismo de economia de carbono (Mc RAE *et alii*, 1978) e pode recuperar parte da energia perdida na evolução do H_2 pelo sistema nitrogenase.

A análise de variância do experimento II está no apêndice 4 e os resultados de pesos (de matéria seca) a seguir discutidos estão nas Tabelas 16 e 17 e na Figura 8.

Observa-se, na Tabela 16, que a partir dos 25 DAG houve um

Tabela 16. Valores de peso da matéria seca (g/planta) da parte aérea, raiz e nódulos, da Z e do N total (mg/planta) da parte aérea e da redução de C_2H_2 , evolução de H_2 e eficiência relativa da nitrogenase em duas cultivares de *Phaseolus vulgaris* inoculadas com três estirpes de *Rhizobium phaseoli*. Plantas coletadas aos 15, 25, 35 e 45 dias após a germinação. Média de 4 repetições.

Cultivar de <i>P. vulgaris</i>	Estirpe de <i>R. phaseoli</i>	M.S. nódulos	M.S. raiz	parte aérea		N total	Redução do $\frac{a}{C_2H_2}$	Evolução do $\frac{a}{H_2}$	E.N. $\frac{b}{a}$
				M.S.	ZN				
ÉPOCA DE ANOSTRAGEM = 15 dias									
Carioca	C-05	0,102 ab*	0,477	1,623 bc	3,94	63,925 bc	28,916 a	4,891	0,83
	C-88 (= SEMIA 487)	0,108 a	0,496	2,114 a	4,08	86,275 a	30,773 a	3,421	0,89
	C-29 (= 127 K-17)	0,091 ab	0,489	1,328 c	3,04	40,375 d	21,346 bc	4,836	0,77
	$\bar{X}$ da cultivar	0,101	0,487	1,689	3,69	63,525	27,012	4,383	0,83
Venezuela -350	C-05	0,074 b	0,476	1,565 bc	3,34	52,325 cd	20,270 c	5,600	0,72
	C-88 (= SEMIA 487)	0,103 ab	0,505	1,846 ab	3,93	72,625 ab	23,550 b	5,134	0,78
	C-29 (= 127 K-17)	0,116 a	0,493	1,600 bc	2,78	44,600 d	15,793 d	6,093	0,61
	$\bar{X}$ da cultivar	0,098	0,492	1,697	3,35	56,517	19,871	5,609	0,70
	DM ₁ (**) (1%)	-	-	-	-	-	1,109	0,577	0,04
	DM ₂ (***) (1%)	0,030	-	0,434	-	15,940	-	-	-
	DM ₂ (5%)	-	-	-	-	-	2,643	-	-
ÉPOCA DE ANOSTRAGEM = 25 dias									
Carioca	C-05	0,132	0,652	2,714 a	3,92 ab	106,275 b	40,210 a	8,871 b	0,78 a
	C-88 (= SEMIA 487)	0,188	0,660	3,050 a	4,06 a	123,650 a	43,733 a	9,796 ab	0,78 a
	C-29 (= 127 K-17)	0,185	0,671	2,098 bc	3,55 c	74,500 cd	39,773 a	11,800 ab	0,70 b
	$\bar{X}$ da cultivar	0,185	0,661	2,620	3,84	101,475	41,239	10,156	0,75
Venezuela -350	C-05	0,180	0,576	1,835 c	3,73 bc	63,375 d	50,002 a	14,038 ab	0,72 ab
	C-88 (= SEMIA 487)	0,186	0,636	2,268 b	3,89 ab	83,200 c	40,622 a	9,763 ab	0,76 ab
	C-29 (= 127 K-17)	0,170	0,628	2,112 bc	2,52 d	53,350 e	22,891 b	9,477 ab	0,59 c
	$\bar{X}$ da cultivar	0,179	0,613	2,072	3,37	69,975	37,838	11,093	0,69
	DM ₁ (1%)	-	0,036	0,152	0,12	6,042	-	-	0,04
	DM ₂ (1%)	-	-	0,361	0,30	14,399	12,630	4,736	-
	DM ₂ (5%)	-	-	-	-	-	-	-	0,08

- continua -

Tabela 16. (continuação)

Cultivar de <i>P. vulgaris</i>	Estirpe de <i>R. phaseoli</i>	M.S. nódulos	M.S. raiz	parte aérea		N total	Redução de $\frac{a}{C_2H_2}$	Evolução de $\frac{a}{H_2}$	E.R. $\frac{b}{a}$
				M.S.	ZN				
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 35 dias									
Carioca	C-05	0,144 b	0,851	4,441	4,76 a	211,675 ab	22,539 bc	6,814 c	0,70 a
	C-88 (= SEMIA 487)	0,181 a	0,825	4,776	4,99 a	238,325 a	29,691 a	7,853 b	0,74 a
	C-29 (= 127 K-17)	0,160 ab	0,852	3,816	3,66 c	139,475 d	20,270 cd	8,862 a	0,56 c
	$\bar{X}$ da cultivar	0,162	0,843	4,344	4,47	196,492	24,167	7,843	0,66
Venezuela -350	C-05	0,164 ab	0,748	4,098	4,20 b	172,025 c	21,346 c	8,137 b	0,62 b
	C-88 (= SEMIA 487)	0,176 a	0,810	4,336	4,33 b	187,950 bc	23,550 b	8,976 a	0,62 b
	C-29 (= 127 K-17)	0,157 ab	0,798	3,561	3,53 c	125,525 d	19,236 d	9,375 a	0,54 c
	$\bar{X}$ da cultivar	0,166	0,785	3,998	4,02	161,833	21,377	8,829	0,59
	DMS ₁ (1Z)	-	0,039	0,180	0,20	11,884	1,089	0,340	0,02
	DMS ₂ (1Z)	0,031	-	-	-	28,323	1,540	-	0,06
	DMS ₂ (5Z)	-	-	-	0,39	-	-	0,651	-
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 45 dias									
Carioca	C-05	0,135 ab	0,893 a	5,872 a	4,86 b	285,360 a	14,394 ab	5,801 ab	0,60 a
	C-88 (= SEMIA 487)	0,186 ab	0,840 ab	6,024 a	5,41 a	325,375 a	16,939 a	6,341 a	0,62 a
	C-29 (= 127 K-17)	0,170 c	0,840 ab	4,857 b	3,75 d	182,050 c	11,167 c	6,189 a	0,44 b
	$\bar{X}$ da cultivar	0,181	0,858	5,584	4,67	264,428	14,167	6,110	0,55
Venezuela -350	C-05	0,173 bc	0,811 ab	4,533 b	4,29 c	194,325 bc	12,155 bc	5,579 ab	0,54 a
	C-88 (= SEMIA 487)	0,183 abc	0,799 b	4,835 b	4,62 b	224,082 b	12,490 bc	4,762 b	0,62 a
	C-29 (= 127 K-17)	0,192 a	0,896 a	4,629 b	3,52 d	163,215 c	12,976 bc	6,047 a	0,53 ab
	$\bar{X}$ da cultivar	0,183	0,835	4,666	4,14	193,874	12,540	5,462	0,56
	DMS ₁ (1Z)	-	-	0,400	0,13	17,562	1,072	0,555	-
	DMS ₂ (1Z)	0,014	0,089	0,954	0,31	41,577	22,556	-	0,10
	DMS ₂ (5Z)	-	-	-	-	-	-	1,063	-

a/ μ moles $\cdot$ pl⁻¹ $\cdot$ h⁻¹b/ ER = 1 - $\frac{H_2 \text{ evoluído (ar)}}{C_2H_2 \text{ reduzido}}$

(SCHUBERT e EVANS, 1976)

(*) Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente para DMS₂ pelo teste de Tukey ao nível indicado.(**) DMS₁ ... DMS₂, para cultivar(***) DMS₂ ... DMS₂, para cultivar x estirpe

Tabela 17. Influência de três estirpes de *Rhizobium phaseoli* na produção de matéria seca (g/planta) da parte aérea, raiz, nódulos, na ΣN e ΣN total (mg/planta) da parte aérea e na redução de C_2H_2 , evolução de H_2 e eficiência relativa (ER) da nitrogenase em *Phaseolus vulgaris*, coletado aos 15, 25, 35 e 45 dias após a germinação. Média de 4 repetições.

Estirpe de <i>R. phaseoli</i>	M.S. nódulos	M.S. raiz	parte aérea		Redução $\frac{a}{de}$ C_2H_2	Evolução $\frac{a}{de}$ H_2	$\frac{b}{ER}$	
			M. S.	ΣN				
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 15 dias								
C-05	0,088 b*	0,476	1,594 b	3,64 a	58,125 b	24,593 b	5,246 a	0,77 b
C-88 (= SEMIA 487)	0,104 ab	0,500	1,980 a	4,00 a	79,450 a	27,162 a	4,278 b	0,83 a
C-29 (= 127 K-17)	0,106 a	0,491	1,504 b	2,91 b	42,487 c	18,569 c	5,465 a	0,69 c
DMS (1%)	0,018	-	0,258	0,46	9,042	1,568	0,817	0,06
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 25 dias								
C-05	0,181	0,614	2,274 b	3,82 a	87,325 b	45,106 a	11,455	0,75 a
C-88 (= SEMIA 487)	0,187	0,648	2,659 a	3,97 a	105,925 a	42,177 a	10,639	0,77 a
C-29 (= 127 K-17)	0,178	0,649	2,105 b	3,03 b	63,925 c	31,332 b	9,779	0,64 b
DMS (1%)	-	-	0,214	0,18	8,545	7,495	-	0,05
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 35 dias								
C-05	0,154 b	0,800	4,269 b	4,48 a	191,850 b	21,942 b	7,476 c	0,66 a
C-88 (= SEMIA 487)	0,178 a	0,817	4,556 a	4,66 a	213,137 a	26,621 a	8,414 b	0,68 a
C-29 (= 127 K-17)	0,159 b	0,825	3,689 c	3,60 b	132,500 c	19,753 c	9,118 a	0,55 b
DMS (1%)	0,018	-	0,256	0,29	16,809	1,540	0,481	0,03
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 45 dias								
C-05	0,179	0,852 ab	5,202 ab	4,57 b	239,842 b	13,275 ab	5,690	0,57 b
C-88 (= SEMIA 487)	0,184	0,819 b	5,429 a	5,01 a	274,979 a	14,715 a	5,551	0,62 a
C-29 (= 127 K-17)	0,182	0,868 a	4,743 b	3,64 c	172,632 c	12,071 b	6,118	0,49 c
DMS (1%)	-	-	0,566	0,18	24,556	1,516	-	0,05
DMS (5%)	-	0,041	-	-	-	-	-	-

a/ μ moles $\cdot$ $pl^{-1} \cdot h^{-1}$

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

(SCHUBERT e EVANS, 1976)

(*) Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível indicado.

Figura 8. Acúmulo de matéria seca (g.pl^{-1}) na parte aérea, raiz e nódulos durante o ciclo de duas cultivares de *P. vulgaris* inoculadas com três estirpes de *R. phaseoli*.

efeito da cultivar no peso da parte aérea. Os maiores pesos foram obtidos por Carioca, que superou Venezuela-350 em 24%, 8% e 19%, respectivamente aos 25, 35 e 45 DAG,. Apesar da pouca diferença nos pesos das raízes, deve-se lembrar que um experimento conduzido por ADAMS *et alii* (1978) e GRAHAM e HALLIDAY (1977), foi demonstrado que, embora os cultivares de *P. vulgaris* apresentasse os mesmos teores de carboidratos nas raízes noduladas, portanto igualdade de peso de matéria seca, havia diferenças de até 100% no teor de carboidratos solúveis, aumentando a disponibilidade de carbono para os nódulos e as taxas de fixação do N_2 . Não houve efeito da cultivar no peso dos nódulos.

Analisando-se o efeito da estirpe de bactéria no peso da parte aérea (Tabela 17), verifica-se que os maiores valores foram encontrados em plantas inoculadas com C-88, enquanto que os menores pesos ocorreram com C-29. Só se verificou o efeito favorável da estirpe C-88 no peso das raízes aos 45 DAG.

Aos 15 e 35 DAG, obteve-se os maiores pesos de nódulos nas plantas inoculadas com C-88, havendo uma correspondência com os teores mais elevados de N total. Na estirpe C-29, porém, o peso dos nódulos foi maior do que em C-05 aos 15 DAG, embora esta última tenha apresentado teores mais elevados de N total, o que também foi observado por SAITO e CARDOSO (1977), SAITO *et alii* (1978) e CASSINI (1980). A eficiência dos nódulos na fixação do nitrogênio, aos 45 DAG, foi de 1340 mg N . g nod⁻¹ na estirpe C-05, 1494 mg N . g nod⁻¹ na C-88 e 948 mg N . g nod⁻¹ na C-29.

Observa-se na Tabela 16, que houve efeito da interação cultivar x estirpe no peso da parte aérea aos 15, 25 e 45 DAG. A estirpe de bactéria aos 15 DAG pareceu ser a principal responsável pelas diferenças entre os sistemas, pois os maiores pesos foram obtidos nas cultivares Carioca e Venezuela-350 inoculadas com a estirpe C-88. A partir dos 25 DAG, porém, os maiores pesos foram obtidos na cultivar Carioca inoculada com C-88 e C-05, destacando o papel da planta hospedeira.

Verificou-se o efeito da estirpe e da interação cultivar x estirpe no teor de N total da planta em todas as épocas de coleta, e o

efeito da cultivar aos 25, 35 e 45 DAG.

Na Tabela 16 observa-se que a cultivar Carioca sempre apresentou os teores mais elevados de nitrogênio na parte aérea, acumulando aos 45 DAG uma média de $264 \text{ mg N. pl}^{-1}$, contra $193 \text{ mg N. pl}^{-1}$ em Venezuela-350. A superioridade da cultivar Carioca sobre Venezuela-350 está de acordo com a teoria de GRAHAM e HALLIDAY (1977), já discutida.

Na Figura 9 pode-se visualizar um exemplo do efeito da cultivar no acúmulo de N total durante o ciclo da planta. As duas cultivares representadas foram inoculadas com a estirpe mais eficiente na fixação do nitrogênio e aos 45 DAG Carioca acumulou 45% a mais de nitrogênio do que Venezuela-350. As diferenças entre cultivares de *P. vulgaris* no teor de N já haviam sido relatadas por diversos autores, como DÖBEREINER e RUSCHEL (1961), FRANCO e DÖBEREINER (1967), GRAHAM e ROSAS (1977), RUSCHEL e SAITO (1976), VEIGA (1980).

O efeito da estirpe no teor de N total da parte aérea mostrou que C-88 apresentou o melhor desempenho nas quatro épocas de estudo (Tabela 17), e aos 45 DAG acumulou 14% a mais de N do que C-05 e 59% a mais do que C-29, enquanto que C-05 superou C-29 em 40%. As maiores diferenças, porém, ocorreram aos 15 DAG, quando C-88 foi superior a C-05 e C-29, respectivamente em 37% e 87%.

Como já foi dito, C-88 é uma estirpe hup^+ , enquanto as demais são hup^- . A superioridade das estirpes hup^+ no teor de N total das plantas também foi verificado por CARTER *et alii* (1978), ALBRECHT *et alii* (1979), ZABLOWICZ *et alii* (1980) e HANUS *et alii* (1981) em soja.

Na Figura 10, pode-se visualizar um exemplo do efeito da estirpe de *R. phaseoli* no acúmulo de N total da planta. A cultivar Carioca mostrou um efeito favorável da inoculação com a estirpe hup^+ no acúmulo de N total da parte aérea, que aos 45 DAG superou em 79% o teor de N total das plantas inoculadas com uma estirpe hup^- .

A interação cultivar x estirpe (Tabela 16) mostrou que, inicialmente, predominou o efeito da estirpe, uma vez que o maior acúmulo de

Figura 9. Acúmulo de nitrogênio ($\text{mg} \cdot \text{pl}^{-1}$) na parte aérea de duas cultivares de *P. vulgaris* inoculadas com a estirpe C-88.

Figura 10. Acúmulo de nitrogênio ($\text{mg} \cdot \text{pl}^{-1}$) na parte aérea da cultivar Carioca inoculada com duas estirpes de *R. phaseoli*.

Figura 11. Nitrogênio total ($\text{mg} \cdot \text{pl}^{-1}$) da parte aérea de duas cultivares de *P. vulgaris* inoculadas com três estirpes de *R. phaseoli* aos 45 dias após a germinação.

N ocorreu em Carioca e Venezuela-350 inoculadas com C-88. Já a partir dos 25 DAG, porém, a cultivar passou a desempenhar um papel mais importante, visto que os teores mais elevados de N foram obtidos em Carioca inoculada com C-88 e C-05.

Na Tabela 18 verifica-se que as maiores taxas de assimilação de nitrogênio ocorreram no período de 25-35 DAG, quando Carioca x C-88 chegou a fixar $11,46 \text{ mg N. pl}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$, contra $7,21 \text{ mg N. pl}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$ em Venezuela-350 x C-29.

Os dados sobre redução de C_2H_2 , evolução do H_2 e ER estão nas Tabelas 16 e 17 e foram representados nas Figuras 12, 13 e 14.

Houve efeito da cultivar, da estirpe e da interação cultivar x estirpe na redução do C_2H_2 em todas as épocas de análise, com exceção da cultivar aos 25 DAG.

Constata-se, na Tabela 16, que a cultivar Carioca apresentou as taxas de redução do C_2H_2 mais elevadas em todas as épocas analisadas, mas a maior diferença na atividade da nitrogenase entre Carioca e Venezuela-350 ocorreu aos 15 DAG, quando a primeira superou a segunda em 36%.

O efeito da cultivar na evolução do H_2 foi notado aos 15,35 e 45 DAG, o que está de acordo com os resultados recentemente encontrados por GIBSON *et alii* (1981) e KEYSER *et alii* (1981), os quais afirmaram que a planta hospedeira também desempenha um papel na evolução do H_2 , provavelmente porque possui a informação genética para a indução da atividade da hidrogenase.

Quanto ao efeito da estirpe (Tabela 17), as maiores taxas de redução do C_2H_2 ocorreram nas raízes noduladas com a estirpe C-88 em todas as épocas e com C-05 aos 25 e 45 DAG.

Verificou-se o efeito da estirpe na evolução do H_2 aos 15 e 35 DAG. Aos 15 DAG, embora as raízes noduladas com a estirpe C-88 apresentasse as maiores taxas de redução do C_2H_2 , houve menor evolução do H_2 pelos seus nódulos, contribuindo para a economia energética na época do esta

Tabela 18. Taxas de assimilação de nitrogênio ($\text{mg N} \cdot \text{pl}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$) durante o crescimento de *Phaseolus vulgaris* cv. Carioca e cv. Venezuela-350 inoculado com três estirpes de *Rhizobium phaseoli*.

Cultivar de <i>P. vulgaris</i>	Estirpe de <i>R. phaseoli</i>	$\text{mg N fixado} \cdot \text{planta}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$				Média
		dias após a germinação				
		0-15	15-25	25-35	35-45	
Carioca	C-05	4,26	4,23	10,54	7,36	6,59
	C-88(=SEMIA 487)	5,75	3,73	11,46	8,76	7,42
	C-29(= 127 K-17)	2,69	3,41	6,49	4,25	4,21
Venezuela-350	C-05	3,96	1,60	10,36	2,23	4,53
	C-88(=SEMIA 487)	4,84	1,55	9,97	3,61	4,99
	C-29(= 127 K-17)	3,50	0,87	7,21	3,76	3,83

Tabela 19. Taxas de assimilação de nitrogênio ($\text{mg N} \cdot \text{g nod}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$) durante o crescimento de *Phaseolus vulgaris* cv. Carioca e cv. Venezuela-350 inoculado com três estirpes de *Rhizobium phaseoli*.

Cultivar de <i>P. vulgaris</i>	Estirpe de <i>R. phaseoli</i>	mg N fixado . g nod ⁻¹ . dia ⁻¹				Média
		dias após a germinação				
		0-15	15-25	25-35	35-45	
Carioca	C-05	41,76	23,24	73,19	39,78	44,49
	C-88(=SEMIA 487)	53,24	19,84	63,31	47,09	45,87
	C-29(=127 K-17)	26,63	18,43	40,56	25,00	27,65
Venezuela-350	C-05	53,51	8,88	63,17	12,89	34,61
	C-88(=SEMIA 487)	46,99	8,33	56,64	19,73	32,92
	C-29(= 127-K-17)	30,17	5,11	45,92	19,58	25,19

Figura 12. Variação da atividade da nitrogenase (redução do C_2H_2) e evolução do H_2 durante o ciclo de duas cultivares de *P. vulgaris* inoculadas com três estirpes de *R. phaseoli*. As medidas foram feitas utilizando-se raízes noduladas destacadas (redução do C_2H_2) e nódulos destacados (evolução do H_2).

Figura 13. Efeito da estirpe de *R. phaseoli* na atividade da nitrogenase (redução do C_2H_2) e evolução do H_2 durante o ciclo de duas cultivares de *P. vulgaris*. As medidas foram feitas utilizando raízes noduladas destacadas (redução do C_2H_2) e nódulos destacados (evolução do H_2).

Figura 14. Eficiência Relativa dos elétrons destinados à nitrogenase em duas cultivares de *P. vulgaris* inoculadas com três estirpes de *R. phaseoli* aos 15, 25, 35 e 45 dias após a germinação.

belecimento do sistema simbiótico. Observa-se na Figura 13, que as menores taxas de redução do C_2H_2 ocorreram com a estirpe C-29, embora esta apresentasse, em algumas épocas, as maiores taxas de evolução do H_2 , caracterizando a baixa eficiência dessa estirpe.

Observa-se, pela Tabela 17, que C-88 apresentou maior evolução de H_2 do que C-05 aos 35 DAG, embora a primeira seja hup^+ e a segunda hup^- . Isso pode ter ocorrido porque, entre 25 e 35 DAG, houve a taxa de acúmulo de matéria seca mais elevada, sendo provavelmente a época de maior atividade fotossintética. Desse modo, pode-se dizer que havia disponibilidade de fotossintatos para a fixação do nitrogênio. Isso explicaria as taxas elevadas de evolução do H_2 por C-88 nessa época pois, segundo WALKER e YATES (1978) e BETHLENFALVAY e PHILLIPS (1979), a reciclagem do H_2 pela hidrogenase ocorre principalmente sob condições de limitação de carbono.

A evolução do H_2 pela estirpe C-88, hup^+ , pode estar relacionada com as observações de RUIZ-ARGÜESO *et alii* (1978), que verificaram que as estirpes de *R. leguminosarum* hup^+ também evoluíam H_2 , uma vez que sua hidrogenase não era capaz de reciclar todo o H_2 produzido.

Deve-se considerar também que a eficiência da estirpe C-05 na fixação do nitrogênio e sua baixa evolução de H_2 , quando comparada com a estirpe hup^+ , pode estar relacionada à indução da hup^+ pela planta hospedeira (GIBSON *et alii*, 1981; KEYSER *et alii*, 1981), ou porque a estirpe C-05 não conseguiu expressar a atividade da sua hidrogenase no meio de MAIER *et alii* (1978).

Na Tabela 16, pode-se observar que em todas as épocas houve efeito da interação entre cultivar e estirpe na redução de C_2H_2 , o que está de acordo com as observações de ELKAN *et alii* (1981) em *Arachis* sp. Verificou-se, também o efeito dessa interação na evolução do H_2 .

As Figuras 12 e 13, indicam que as maiores taxas de redução de C_2H_2 ocorreram aos 25 DAG, mas nessa época não foi possível detectar as diferenças entre os tratamentos, verificando-se apenas a inferioridade do sistema Venezuela-350 x C-29. O sistema Venezuela-350 x C-05 apresentou, nessa época, a maior taxa de redução do C_2H_2 , embora fosse um dos me-

nos eficientes na fixação de nitrogênio. A interpretação dos resultados de redução do C_2H_2 aos 25 DAG poderia levar a muitos erros, pois, foi justamente nesse período de maior atividade da nitrogenase que ocorreu a menor correlação com o teor de N fixado.

Desse modo, deve-se ser cauteloso com a utilização do método de redução do C_2H_2 , pois o mesmo avalia somente a atividade enzimática momentânea, e a correlação com o nitrogênio fixado só pode ser feita com a realização de muitas determinações sob as mesmas condições ambientais (MASTERSON e MURPHY, 1980). A baixa correlação entre redução do C_2H_2 e N_2 fixado em *P. vulgaris* também foi constatada por RENNIE e KEMP (1980).

Como pode ser visto na Figura 12, a evolução do H_2 parece seguir a mesma curva da taxa de redução do C_2H_2 , ao contrário do encontrado em *P. vulgaris* por BETHLENFALVAY e PHILLIPS (1979), que observaram que o pico da evolução do H_2 ocorreu de 7 a 14 dias antes do pico de máxima redução do C_2H_2 . ER foi máxima aos 15 DAG, decrescendo até o final do ciclo o que está de acordo com os resultados de SCHUBERT *et alii* (1978). A ER na cultivar Carioca sempre foi superior à da cultivar Venezuela-350.

Quanto ao efeito da estirpe, C-88 sempre apresentou as maiores ER, a estirpe C-05 igualou-se a C-88 aos 25 e 35 DAG e C-29 foi inferior em todas as épocas. Os valores de ER mostram que houve um desvio de 11 a 56% dos elétrons destinados à nitrogenase, reforçando a importância de se realizar a análise da evolução do H_2 , uma vez que a redução do C_2H_2 pode mascarar a relação com o teor de N_2 fixado.

Os valores da ER, neste experimento, concordam com os encontrados por BETHLENFALVAY e PHILLIPS (1977) em *P. vulgaris*, onde houve variação entre 0,6 e 0,8. Os sistemas Carioca x C-88 e Carioca x C-05, porém, chegaram a apresentar ER de 0,89 a 0,83, mostrando-se como os mais eficientes nessa espécie. Deve-se considerar, porém que a hidrogenase de C-88 não é tão ativa quanto a encontrada em *R. japonicum* (ALBRECHT *et alii*, 1980) em em *Rhizobium* do grupo Cowpea (SCHUBERT e EVANS, 1976) onde a ER foi de 0,99. Por outro lado, as estirpes hup⁺ em estudo com *Pisum sativum* apresentaram uma ER máxima de 0,8 (RUIZ-ARGÜESO *et alii*, 1978) e em *Medica*

go sativa e *Trifolium subterraneum* a ER máxima foi de 0,83 (RUIZ-ARGÜESO *et alii*, 1979c). Talvez a eficiência da hidrogenase esteja relacionada à planta hospedeira,

A ER aos 25 e 35 DAG correlacionou com os teores de N total da planta aos 45 DAG.

Quando a enzima nitrogenase realiza a redução do C_2H_2 , há um gasto de $2 e^-$, e na redução do N_2 há um gasto de $6e^-$. Deste modo, a relação teórica de conversão do $C_2H_2 : N_2$ reduzido seria de 3:1 (HARDY *et alii*, 1968), embora os valores encontrados normalmente sejam de 4:1 (HARDY *et alii*, 1973; BURRIS, 1975).

As relações $C_2H_2 : N_2$ reduzidos encontradas neste experimento (Apêndice 1), apresentaram uma variação de 3,4 : 1 em Carioca x C-05 e Carioca x C-88, até 7,3 : 1 em Venezuela-350 x C-05.

RENNIE e KEMP (1980) observaram que em *P. vulgaris* a relação $C_2H_2 : N_2$ reduzido variou de 1,94 a 3,41, havendo um decréscimo da relação até o final do ciclo, quando chegou a atingir 0,58 : 1. Nos estudos de SAITO *et alii* (1980b), também em *P. vulgaris*, a relação variou entre 7,91 e 8,3.

O decréscimo da relação com a maturidade também ocorreu neste experimento, atingindo valores de até 0,91. De acordo com KNOWLES (1981), são comuns os relatos de que, com a idade da planta, encontra-se valores de 0,2 a 0,8, mas não se sabe ainda porque isso ocorre.

4.3. Experimento III

No experimento III utilizou-se quatro cultivares de *Phaseolus vulgaris* (Venezuela-350, Aroana, Moruna e Carioca), inoculadas com três estirpes de *Rhizobium phaseoli*: C-05, C-89 (= CIAT 57) hup⁻ e C-40 (= CIAT 255), hup⁺.

A análise de variância desse experimento encontra-se nos

Apêndices 5 e 6, e os dados relativos aos pesos (de matéria seca) da parte aérea, raiz, nódulos e vagens a seguir discutidos, estão nas Tabelas 20 a 23, e foram representados na Figura 15.

Realizou-se as coletas aos 25, 40 e 55 dias após a germinação (DAG).

Observa-se, na Tabela 21, que aos 25 e 40 DAG a cultivar Carioca apresentou maior peso da parte aérea e Venezuela-350 apresentou as menores produções. Aos 55 DAG, porém, somente Venezuela-350 apresentou-se inferior às demais cultivares, com um peso de parte aérea 26% menor do que Carioca. Venezuela-350 também apresentou menor peso de raízes do que as outras cultivares, que toda via não diferiram entre si. Notou-se também um efeito da cultivar no peso dos nódulos, que sempre foi maior em Carioca e correspondeu aos maiores teores de N fixado.

Pode-se observar na Tabela 22, que aos 25 DAG as plantas inoculadas com a estirpe C-40 apresentaram o maior peso de parte aérea e que os menores pesos ocorreram pela inoculação com C-05. A partir dos 40 DAG o efeito da estirpe C-05 (que apresentou um peso da parte aérea 38% menor que C-40 aos 25 DAG) permitiu um grande desenvolvimento da parte aérea, chegando a superar C-40 em 14%, e permanecendo com os maiores pesos até o final do ciclo.

Aos 40 DAG verificou-se o efeito da estirpe no peso das raízes, que foram menores em C-89, não havendo diferença entre C-05 e C-40. Os maiores pesos de nódulos foram obtidos nas plantas inoculadas com C-89, mas estas apresentaram os menores pesos de matéria seca e acumularam os menores teores de nitrogênio, deduzindo-se que essa bactéria produz nódulos ineficientes na fixação de nitrogênio. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por SAITO *et alii* (1978, 1980a).

Houve interação cultivar x estirpe (Tabela 20) no peso da parte aérea em todas as épocas analisadas. Aos 55 DAG, os maiores valores foram obtidos por Carioca, Moruna e Aroana inoculadas com C-05. Na cultivar Venezuela-350, porém, não houve efeito da estirpe.

Tabela 20. Efeito da interação entre quatro cultivares de *Phaseolus vulgaris* e três estirpes de *Rhizobium phaseoli* no peso de matéria seca (g/planta) da parte aérea, raiz, nódulo e vagem coletados aos 25, 40 e 55 dias após a germinação. Média de cinco repetições.

Cultivares de <i>P. vulgaris</i>	Estirpe de <i>R. phaseoli</i>	M.S. da parte aérea (folhas + hastes)	M.S. da raiz	M.S. do nódulo	M.S. da vagem	M.S. total (folhas + hastes + raízes + nódulos + vagens)
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 25 dias						
Venezuela-350	C-05	0,977 g*	0,573	0,1027 d		1,653 f
	C-89 (= CIAT-57)	1,032 g	0,605	0,1210 c		1,758 f
	C-40 (= CIAT-255)	1,198 fg	0,629	0,0913 d		1,918 f
Aroana	C-05	1,664 de	0,670	0,0964 d		2,430 de
	C-89 (= CIAT-57)	1,915 cd	0,664	0,1030 d		2,682 cde
	C-40 (= CIAT-255)	1,944 cd	0,667	0,1015 d		2,712 cde
Moruna	C-05	1,544 ef	0,654	0,1250 c		2,323 e
	C-89 (= CIAT-57)	1,996 cd	0,654	0,1206 c		2,771 cd
	C-40 (= CIAT-255)	2,115 bc	0,689	0,1203 c		2,924 bc
Carioca	C-05	2,075 bc	0,707	0,1308 bc		2,913 bc
	C-89 (= CIAT-57)	2,420 b	0,646	0,1483 a		3,214 b
	C-40 (= CIAT-255)	3,397 a	0,649	0,1439 ab		4,190 a
	DMS ** (1%)	0,366	-	0,0156		0,390
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 45 dias						
Venezuela-350	C-05	3,454 bc	1,453 def	0,1879 e		5,095 cd
	C-89 (= CIAT-57)	3,329 c	1,337 f	0,2506 a		4,917 d
	C-40 (= CIAT-255)	3,332 c	1,418 ef	0,2285 b		4,978 d
Aroana	C-05	4,438 a	1,826 a	0,1897 e		8,161 a
	C-89 (= CIAT-57)	3,172 c	1,462 de	0,2100 cd		4,844 d
	C-40 (= CIAT-255)	3,411 bc	1,665 bc	0,1951 de		5,271 cd
Moruna	C-05	4,430 a	1,585 c	0,1965 de		7,980 a
	C-89 (= CIAT-57)	3,213 c	1,559 cd	0,2355 ab		5,008 d
	C-40 (= CIAT-255)	3,772 b	1,558 cd	0,2247 bc		5,555 c
Carioca	C-05	4,482 a	1,828 a	0,2198 bc		6,530 b
	C-89 (= CIAT-57)	3,343 c	1,461 de	0,2500 a		5,054 d
	C-40 (= CIAT-255)	4,153 a	1,737 ab	0,2340 b		6,124 b
	DMS (1%)	0,369	-	0,0160		0,463
	DMS (5%)	-	0,209	-		-
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 55 dias						
Venezuela	C-05	4,201 cdef	1,528	0,2303 d	1,128 g	7,087 e
	C-89 (= CIAT-57)	3,528 f	1,504	0,2510 bc	0,742 h	6,025 f
	C-40 (= CIAT-255)	3,939 def	1,570	0,2521 ab	0,952 gh	6,713 ef
Aroana	C-05	5,987 a	1,810	0,2316 c	2,959 bc	10,988 ab
	C-89 (= CIAT-57)	4,140 def	1,642	0,2702 ab	2,342 f	8,394 d
	C-40 (= CIAT-255)	4,393 cde	1,647	0,2320 cd	2,575 de	8,847 d
Moruna	C-05	5,682 ab	1,796	0,2266 d	2,756 cd	10,461 bc
	C-89 (= CIAT-57)	3,951 def	1,647	0,2524 ab	2,326 f	8,176 d
	C-40 (= CIAT-255)	4,652 cd	1,675	0,2303 d	2,465 ef	9,022 d
Carioca	C-05	5,888 a	1,825	0,2613 ab	3,616 a	11,590 a
	C-89 (= CIAT-57)	3,859 ef	1,623	0,2718 a	2,523 ef	8,277 d
	C-40 (= CIAT-255)	4,944 bc	1,710	0,2596 ab	3,151 b	10,065 c
	DMS (1%)	0,756	-	-	0,217	0,862
	DMS (5%)	-	-	0,0200	-	-

(*) Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível indicado.

(**) DMS para cultivar d/ estirpe.

Tabela 21. Efeito da cultivar de *Phaseolus vulgaris* L. na produção de matéria seca (g/planta) da parte aérea, raiz, nódulo e vagem, coletados aos 25, 40 e 55 dias após a germinação. Média de 15 repetições.

Cultivar de <i>P. vulgaris</i>	M.S. da parte aérea	M.S. da raiz	M.S. do nódulo	M.S. da vagem	M.S. total
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 25 dias					
Venezuela-350	1,069 c*	0,603 b	0,105 c		1,777 c
Aroana	1,841 b	0,667 a	0,100 c		2,608 b
Moruna	1,885 b	0,666 a	0,122 b		2,673 b
Carioca	2,630 a	0,668 a	0,141 a		3,439 a
DMS (1%)	0,212	0,061	0,009		0,225
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 40 dias					
Venezuela-350	3,372 c	1,402 b	0,222 b		4,996 c
Aroana	3,673 b	1,651 a	0,198 c		5,522 b
Moruna	3,805 a	1,567 ab	0,219 b		5,591 b
Carioca	3,992 a	1,675 a	0,234 a		5,901 a
DMS (1%)	0,213	0,149	0,009		0,267
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 55 dias					
Venezuela-350	3,889 b	1,534 b	0,244 b	0,940 c	6,607 c
Aroana	4,840 a	1,700 a	0,245 b	2,625 b	9,410 b
Moruna	4,762 a	1,706 a	0,236 b	2,515 b	9,219 b
Carioca	4,897 a	1,720 a	0,264 a	3,096 a	9,977 a
DMS (1%)	0,436	0,137	0,012	0,125	0,498

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

Tabela 22. Efeito da estirpe de *Rhizobium phaseoli* na produção de matéria seca (g/planta) da parte aérea, raiz, nódulo e vagem de *Phaseolus vulgaris* aos 25, 40 e 55 dias após a germinação. Média de 20 repetições.

Estirpe de <i>R. phaseoli</i>	M.S. da parte aérea	M.S. da raiz	M.S. do nódulo	M.S. da vagem	M.S. total
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 25 dias					
C-05	1,565 c*	0,651	0,1137 b		2,329 c
C-89(=CIAT-57)	1,841 b	0,643	0,1232 a		2,607 b
C-40(=CIAT-255)	2,164 a	0,658	0,1142 b		2,936 a
DMS (1%)	0,170		0,0072		0,181
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 40 dias					
C-05	4,201 a	1,673 a	0,1984 c		6,072 a
C-89(=CIAT-57)	3,264 c	1,455 b	0,2365 a		4,956 c
C-40(=CIAT-255)	3,667 b	1,594 a	0,2205 b		5,482 b
DMS (1%)	0,167	0,120	0,0074		0,215
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 55 dias					
C-05	5,439 a	1,740 a	0,2374 b	2,614 a	10,030 a
C-89(=CIAT-57)	3,870 c	1,604 b	0,2613 a	1,983 c	7,718 c
C-40(=CIAT-255)	4,482 b	1,650 ab	0,2435 b	2,285 b	8,660 b
DMS (1%)	0,352	0,110	0,0144	0,101	0,401

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

Em todas as épocas de análise, houve interação entre cultivar e estirpe no peso dos nódulos (Tabela 20), mas não se verificou correlação entre peso dos nódulos e N total em nenhuma coleta. Esses resultados estão de acordo com os encontrados em *P. vulgaris* por RENNIE e KEMP (1980).

Os maiores pesos de matéria seca das vagens foram obtidos por C-05, que superou C-40 e C-89 em 14% e 32%. A interação cultivar x estirpe apontou Carioca x C-05 como o sistema simbiótico mais eficiente na produção de vagens, superando em 387% o sistema menos eficiente, que foi Venezuela-350 x C-89. A estirpe C-05 proporcionou maiores produções em todas as cultivares exceto em Venezuela-350, onde não houve diferença entre C-05 e C-40.

Como já foi dito, a estirpe C-40 é hup^+ , e C-05 hup^- . Era esperado que a inoculação com a estirpe hup^+ produzisse maior peso de parte aérea e peso de vagem, como foi observado por ALBRECHT *et alii* (1979), ZABLOTOWICZ *et alii* (1980), HANUS *et alii* (1981), em soja. Deve-se considerar, porém, que embora alguns autores tenham verificado um efeito global favorável das estirpes hup^+ , em *Pisum sativum* (RUIZ-ARGÜESO *et alii*, 1978) e em *Phaseolus vulgaris* (SAITO *et alii*, 1980a), a produção de matéria seca em plantas inoculadas com algumas estirpes hup^- superou a de algumas estirpes hup^+ . Por outro lado, há trabalhos em que não se verificou nenhum efeito favorável pela inoculação com estirpe hup^+ (GIBSON *et alii*, 1981; RAINBIRD *et alii*, 1981).

Em relação ao peso total das plantas, verifica-se nas Tabelas 20 a 22, que aos 55 DAG a cultivar Carioca superou Venezuela-350, Aroana e Moruna, respectivamente em 104%, 30% e 29% e que a estirpe C-05 superou C-89 e C-40 respectivamente em 30% e 16%.

Calculando-se a porcentagem do peso das vagens em relação ao peso total das plantas, encontra-se os seguintes valores: Venezuela-350 - 14%; Aroana - 27%; Moruna - 28% e Carioca - 31%. Há portanto, uma grande diferença entre as cultivares na produção e transporte de carboidratos e nitrogênio para a formação das vagens, não se verificando o efeito das

estirpes nesse parâmetro.

Os valores de %N e N total da planta a seguir discutidos estão nas Tabelas 23 a 26 e nas Figuras 16 a 19.

Houve efeito da interação cultivar x estirpe (Tabela 24) , da cultivar (Tabela 25) e da estirpe (Tabela 26) no acúmulo de N total na parte aérea em todas as épocas analisadas.

Aos 25 DAG verifica-se (Tabela 25) que a cultivar Carioca apresentou maiores teores de N total do que Venezuela-350, Aroana e Moruna, respectivamente de 150%, 17% e 22%.

Essa superioridade pode estar relacionada a uma maior atividade fotossintética inicial ou então a maior produção seria devido à hipótese de GRAHAM e HALLIDAY (1977), já discutida. Como Carioca é a única cultivar de hábito prostrado com tendência a trepador, ocorreria maior porcentagem de carboidratos solúveis prontamente disponíveis nas raízes noduladas, permitindo maior fixação de nitrogênio e maior crescimento da parte aérea. O efeito da cultivar no teor de N total das raízes e dos nódulos foi semelhante ao da parte aérea.

Na Tabela 26 verifica-se que aos 25 DAG a estirpe C-40 superou C-89 e C-05 em 25% e 35% no teor de N total da parte aérea. A análise aos 40 DAG, porém, mostra que houve um grande incremento causado pela estirpe C-05, que continuou superior às demais até o final do ciclo, acumulando aos 55 DAG 80% a mais de N total do que C-89 e 34% a mais do C-40. O teor de N nos nódulos também foi maior em C-05.

No experimento II, verificou-se que a estirpe C-88, hup^+ , sempre apresentou maiores teores de N total da parte aérea do que as estirpes C-05 e C-29, hup^- . Neste experimento, porém, verificou-se que C-40, hup^+ , foi superada por C-05, hup^- , embora tenha sido sempre superior a C-89, hup^- .

Tentando-se formular algumas hipóteses, poder-se-ia dizer que C-88 (=SEMIA 487, RS) e C-05 (CENA) são melhor adaptadas às nossas con

Tabela 23. Efeito da interação entre quatro cultivares de *Phaseolus vulgaris* e três estirpes de *Rhizobium phaseoli* na ΣN da parte aérea, raiz, nódulo e vagem coletados aos 25, 40 e 55 dias após a germinação. Média de cinco repetições.

Cultivares de <i>P. vulgaris</i>	Estirpe de <i>R. phaseoli</i>	ΣN da parte aérea (folhas + hastes)	ΣN da raiz	ΣN dos nódulos	ΣN das vagens
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 25 dias					
Venezuela-350	C-05	2,71 d*	1,32 h	4,45 e	
	C-89 (= CIAT-57)	3,22 bc	1,88 efg	3,79 f	
	C-40 (= CIAT-255)	3,19 bcd	2,27 bc	4,11 f	
Aroana	C-05	3,69 ab	1,90 efg	5,23 ab	
	C-89 (= CIAT-57)	3,66 ab	2,09 cde	5,03 bc	
	C-40 (= CIAT-255)	3,95 a	2,46 ab	4,89 cd	
Moruna	C-05	3,57 ab	1,75 g	5,50 a	
	C-89 (= CIAT-57)	3,48 abc	2,01 def	4,08 f	
	C-40 (= CIAT-255)	3,58 abc	2,50 ab	4,98 bc	
Carioca	C-05	3,61 ab	1,82 fg	5,27 ab	
	C-89 (= CIAT-57)	2,70 d	2,22 cd	4,57 de	
	C-40 (= CIAT-255)	3,10 cd	2,52 a	4,77 cde	
	DMS ** (1%)	0,51	0,24	0,34	
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 40 dias					
Venezuela-350	C-05	2,78	1,91 c	4,35 c	
	C-89 (= CIAT-57)	2,33	1,53 e	2,98 e	
	C-40 (= CIAT-255)	2,60	1,63 e	3,90 d	
Aroana	C-05	2,88	2,58 a	4,98 b	
	C-89 (= CIAT-57)	2,35	2,10 bc	4,38 c	
	C-40 (= CIAT-255)	2,65	2,26 b	4,09 cd	
Moruna	C-05	3,02	2,67 a	5,27 ab	
	C-89 (= CIAT-57)	2,60	1,67 de	4,13 cd	
	C-40 (= CIAT-255)	2,86	2,31 b	4,33 c	
Carioca	C-05	3,32	2,80 a	5,44 a	
	C-89 (= CIAT-57)	2,60	1,89 cd	4,27 cd	
	C-40 (= CIAT-255)	2,93	1,97 c	4,91 b	
	DMS (1%)	-	0,23	0,42	
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 55 dias					
Venezuela-350	C-05	2,36 bcd	1,37 fg	4,23 c	2,81 de
	C-89 (= CIAT-57)	2,04 def	1,16 h	3,02 f	2,27 f
	C-40 (= CIAT-255)	2,38 bcd	1,27 fgh	3,71 e	2,75 e
Aroana	C-05	2,32 bc	1,89 ab	4,72 b	3,28 bc
	C-89 (= CIAT-57)	1,96 ef	1,21 gh	3,92 de	3,10 cd
	C-40 (= CIAT-255)	2,05 def	1,42 ef	4,03 cd	3,11 c
Moruna	C-05	2,42 b	1,82 bc	4,87 b	3,41 b
	C-89 (= CIAT-57)	1,78 f	1,30 fgh	4,00 cd	3,22 bc
	C-40 (= CIAT-255)	2,10 cde	1,54 de	4,78 b	3,30 bc
Carioca	C-05	2,87 a	1,99 a	5,78 a	4,70 a
	C-89 (= CIAT-57)	2,03 def	1,38 fg	4,04 cd	3,29 bc
	C-40 (= CIAT-255)	2,52 b	1,67 cd	5,69 a	3,50 b
	DMS (1%)	0,31	-	0,28	0,29
	DMS (5%)	-	0,16	-	-

(*) Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível indicado.

(**) DMS para cultivar d/ estirpe.

Tabela 24. Efeito da interação entre quatro cultivares de *Phaseolus vulgaris* e três estirpes de *Rhizobium phaseoli* no N total (mg/planta) da parte aérea, raiz, nódulo e vagem coletados aos 25, 40 e 55 dias após a germinação. Média de cinco repetições.

Cultivar de <i>P. vulgaris</i>	Estirpe de <i>R. phaseoli</i>	N total da parte aérea (folhas + hastes)	N total das raízes	N total dos nódulos	N total das vagens	N total das plantas (folhas + hastes + raízes + nódulos + vagens)
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 25 dias						
Venezuela-350	C-05	26,518 e*	7,543 f	4,562 d		38,623 h
	C-89 (= CIAT-57)	33,262 e	11,502 e	4,597 d		49,361 g
	C-40 (= CIAT-255)	38,144 e	14,166 cd	3,753 e		56,063 f
Aroana	C-05	61,472 cd	12,734 de	5,032 d		79,238 d
	C-89 (= CIAT-57)	69,970 bc	13,887 d	5,187 cd		89,044 c
	C-40 (= CIAT-255)	76,880 b	16,415 ab	4,964 d		98,259 b
Moruna	C-05	55,006 d	11,464 e	6,873 a		73,343 e
	C-89 (= CIAT-57)	69,328 bc	13,164 de	5,881 bc		88,373 c
	C-40 (= CIAT-255)	75,692 b	17,276 a	5,990 b		98,962 b
Carioca	C-05	75,264 b	12,795 de	6,903 a		94,962 b
	C-89 (= CIAT-57)	64,600 bcd	14,361 bcd	6,780 a		85,740 c
	C-40 (= CIAT-255)	104,920 a	16,365 abc	6,871 a		128,156 a
	DMS** (1%)	13,571	2,274	0,789		4,660
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 40 dias						
Venezuela-350	C-05	96,050 de	27,719 e	8,171 fg		131,941 ef
	C-89 (= CIAT-57)	77,624 ef	20,380 f	7,450 g		105,455 g
	C-40 (= CIAT-255)	86,206 ef	22,978 f	8,900 ef		118,094 efg
Aroana	C-05	126,590 bc	47,188 a	9,436 e		183,220 b
	C-89 (= CIAT-57)	74,448 f	30,453 de	9,197 e		114,100 fg
	C-40 (= CIAT-255)	90,684 def	37,421 c	7,980 g		136,081 de
Moruna	C-05	133,684 ab	42,402 b	10,352 cd		186,438 b
	C-89 (= CIAT-57)	84,050 ef	26,030 e	9,717 de		119,800 efg
	C-40 (= CIAT-255)	107,982 cd	36,019 c	9,729 de		153,730 cd
Carioca	C-05	148,838 a	51,175 a	11,753 a		211,770 a
	C-89 (= CIAT-57)	86,864 ef	27,566 e	10,660 bc		125,090 ef
	C-40 (= CIAT-255)	121,690 bc	34,016 cd	11,477 ab		167,190 bc
	DMS (1%)	20,798	4,477	0,881		20,219
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 55 dias						
Venezuela-350	C-05	97,234 cd	20,828 de	9,737 cd	31,618 f	159,428 fg
	C-89 (= CIAT-57)	71,860 e	17,397 e	7,571 e	16,829 g	113,660 h
	C-40 (= CIAT-255)	93,780 cd	19,982 de	9,360 d	26,216 f	149,335 g
Aroana	C-05	138,764 b	34,200 a	10,930 bc	96,377 c	280,730 b
	C-89 (= CIAT-57)	80,972 cde	19,950 de	10,604 bc	72,474 e	184,001 de
	C-40 (= CIAT-255)	89,800 cde	23,447 cd	9,374 d	80,135 de	202,758 cd
Moruna	C-05	137,494 b	34,732 a	11,020 b	94,017 c	277,262 b
	C-89 (= CIAT-57)	70,422 e	21,419 d	10,100 bcd	74,990 de	176,930 ef
	C-40 (= CIAT-255)	97,800 c	25,787 c	11,000 b	81,440 de	216,050 c
Carioca	C-05	169,410 a	36,390 a	15,132 a	169,837 a	390,770 a
	C-89 (= CIAT-57)	78,280 de	22,235 cd	10,990 b	82,877 d	194,380 cde
	C-40 (= CIAT-255)	124,726 b	29,677 b	14,776 a	110,192 b	279,380 b
	DMS (1%)	19,420	3,703	1,194	9,569	23,092

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

(**) DMS para cultivar d/ estirpe.

Tabela 25. Efeito da cultivar de *Phaseolus vulgaris* L. na ΣN e N total (mg/planta) da parte aérea, raiz, nódulos e vagens coletados aos 25, 40 e 55 dias após a germinação. Média de 15 repetições.

Cultivar de <i>P. vulgaris</i>	parte aérea		raiz		nódulo		vagem		p. aérea + raiz + nódulo+vagem	
	ΣN	N total	ΣN	N total	ΣN	N total	ΣN	N total	ΣN	N total
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 25 dias										
Venezuela-350	3,04 b*	32,641 c	1,82 b	11,070 b	4,12 c	4,301 d			48,012 c	
Aroana	3,77 a	69,440 ab	2,15 a	14,342 a	5,05 ab	5,058 c			88,840 b	
Moruna	3,54 a	66,675 b	2,09 a	13,968 a	5,12 a	6,248 b			86,890 b	
Carioca	3,14 b	81,593 a	2,18 a	14,507 a	4,87 b	6,851 a			102,284 a	
DMS (1%)	0,30	7,835	0,14	1,313	0,19	0,455			7,652	
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 40 dias										
Venezuela-350	2,57 b	86,627 c	1,69 b	23,693 c	3,74 c	8,174 d			118,493 c	
Aroana	2,62 b	97,240 b	2,22 a	38,354 a	4,48 b	8,870 c			144,464 b	
Moruna	2,83 ab	108,571 ab	2,22 a	34,817 b	4,58 b	9,932 b			153,321 b	
Carioca	2,95 a	119,131 a	2,31 a	37,586 a	4,87 a	11,363 a			168,077 a	
DMS (1%)	0,30	12,007	0,13	2,585	0,24	0,509			11,673	
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 55 dias										
Venezuela-350	2,24 b	87,625 c	1,27 c	19,402 c	3,65 d	8,890 c	2,61 c	24,888 c	140,803 c	
Aroana	2,11 b	103,179 b	1,51 b	25,867 b	4,22 c	10,302 b	3,16 b	83,149 b	222,496 b	
Moruna	2,10 b	101,905 b	1,55 b	27,313 ab	4,55 b	10,706 b	3,31 b	83,482 b	223,406 b	
Carioca	2,48 a	124,139 a	1,68 a	29,434 a	5,17 a	13,632 a	3,83 a	120,969 a	288,381 a	
DMS (1%)	0,18	11,212	0,09	2,138	0,16	0,690	0,17	5,524	13,332	

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

Tabela 26. Efeito da estirpe de *Rhizobium phaseoli* na ΣN e N total (mg/planta) da parte aérea, raiz, nódulo e vagem de *Phaseolus vulgaris* aos 25, 40 e 55 dias após a germinação. Média de 20 repetições.

Estirpe de <i>R. phaseoli</i>	parte aérea		raiz		nódulo		vagem		p. aérea+raiz + nódulo+vagem	
	ΣN	N total	ΣN	N total	ΣN	N total	ΣN	N total	ΣN	N total
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 25 dias										
C-05	3,39	54,565 b*	1,70 c	11,134 c	5,11 a	5,843 a			71,542 c	
C-89 (= CIAT-57)	3,26	59,289 b	2,05 b	13,226 b	4,57 b	5,606 ab			78,120 b	
C-40 (= CIAT-255)	3,46	73,908 a	2,44 a	16,055 a	4,69 b	5,395 b			95,359 a	
DMS (1%)	-	6,311	0,11	1,078	0,16	0,367			6,163	
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 40 dias										
C-05	3,00 a	126,290 a	2,49 a	42,121 a	5,01 a	9,978 a			178,390 a	
C-89 (= CIAT-57)	2,47 c	80,745 c	1,80 c	26,108 c	3,94 c	9,256 b			116,109 c	
C-40 (= CIAT-255)	2,76 b	101,640 b	2,04 b	32,608 b	4,31 b	9,521 b			143,768 b	
DMS (1%)	0,24	9,671	0,11	2,082	0,19	0,324			9,402	
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 55 dias										
C-05	2,49 a	135,725 a	1,77 a	31,537 a	4,90 a	11,705 a	3,55 a	98,078 a	277,045 a	
C-89 (= CIAT-57)	1,95 c	75,383 c	1,48 b	20,251 c	3,75 c	11,128 b	2,97 c	61,792 c	168,241 c	
C-40 (= CIAT-255)	2,26 b	101,526 b	1,26 c	24,724 b	4,55 b	9,815 c	3,17 b	74,496 b	211,029 b	
DMS (1%)	0,14	9,031	0,07	1,722	0,13	0,555	0,14	4,450	10,738	

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

Figura 15. (continua)

Figura 15. Acúmulo de matéria seca (g. pl⁻¹) na parte aérea, raiz e nódulos durante o ciclo de quatro cultivares de *P. vulgaris* inoculadas com três estirpes de *R. phaseoli*.

Figura 16. (continua)

Figura 16. Acúmulo de nitrogênio ($\text{mg} \cdot \text{pl}^{-1}$) na parte aérea, raiz e nódulos durante o ciclo de quatro cultivares de *P. vulgaris* e três estirpes de *R. phaseoli*.

Figura 17. (continua)

(continuação)

Figura 17. Teor de N total ($\text{mg} \cdot \text{pl}^{-1}$) da parte aérea, raiz e nódulos, acrescido do N total das vagens (área achureada) em quatro cultivares de *P. vulgaris* inoculadas com três estirpes de *R. phaseoli* aos 25, 40 e 55 dias após a germinação.

Figura 18. Valores de matéria seca (g.pl^{-1}) e N total (mg.pl^{-1}) das vagens de quatro cultivares de *P. vulgaris* inoculadas com três estirpes de *R. phaseoli* aos 55 dias após a germinação.

Figura 19. Valores de N total (mg . pl⁻¹) da parte aérea + raiz + nódulos + vagens de quatro cultivares de *P. vulgaris* inoculadas com três estirpes de *R. phaseoli* aos 55 dias após a germinação.

dições ambientais do que C-40 (= CIAT 255), vinda da Colômbia, o que superaria a existência de uma hidrogenase ativa. Deve-se considerar também as observações de KEYSER *et alii* (1981) e de GIBSON *et alii* (1981), de que a planta hospedeira induziria a atividade da hidrogenase. Deve-se considerar também que, embora existam estirpes hup^+ e estirpes hup^- , já foi constatada uma escala de eficiência na fixação de nitrogênio entre elas e algumas estirpes hup^- podem superar algumas hup^+ no peso de matéria seca ou N acumulado (RUIZ-ARGÜESO *et alii*, 1978; SAITO *et alii*, 1980a). Isso talvez também explique porque alguns autores não encontraram diferenças na fixação de nitrogênio entre plantas inoculadas com estirpes hup^+ e com hup^- (GIBSON *et alii*, 1981; RAINBIRD *et alii*, 1981).

Os resultados encontrados nesse experimento, porém, estão de acordo com os de CASSINI (1980), que encontrou que nas plantas inoculadas com C-88 a produção de matéria seca foi maior do que com C-05, que por sua vez foi maior do que com C-40. SAITO (1980), também verificou que C-88 era uma estirpe muito eficiente, acumulando 77% a mais de nitrogênio de que C-40.

Verificou-se o efeito da interação cultivar x estirpe no acúmulo de N total da parte aérea em todas as épocas de análise (Tabela 24). Inicialmente, a estirpe pareceu desempenhar o papel principal, visto que os maiores teores de N foram encontrados em Carioca, Moruna e Aroana inoculadas com C-40, mas na cultivar Venezuela-350, não houve diferença entre as estirpes.

Aos 55 DAG, porém, observa-se que os maiores teores de N foram encontrados em Carioca, Aroana e Moruna inoculadas com C-05, e em Carioca inoculada com C-40. Percebe-se, desse modo, que a seleção de cultivares de feijoeiro e estirpes de *R. phaseoli* não deve ser feita isoladamente, uma vez que há um grau elevado de interação entre planta hospedeira e simbiote.

Constatou-se um efeito espetacular da cultivar de feijoeiro no acúmulo de N total nas vagens (Tabela 25), havendo superioridade de Carioca sobre Aroana e Moruna, e os teores mais baixos foram encontrados

em Venezuela-350. Carioca acumulou 386% a mais de N total na vagem do que Venezuela-350, e 45% a mais do que Aroana e Moruna.

A estirpe C-05 foi responsável por uma superioridade no teor de N total da vagem de 59% em relação à C-89 e 32% em relação à C-40 (Tabela 26). O efeito da estirpe fica evidente na cultivar que apresentou melhor desenvolvimento, a Carioca, e que quando inoculada com C-05 aumentou em 54% o teor de N da vagem em relação à inoculação com C-40 e aumentou em 105% em relação à C-89. Já na cultivar Venezuela-350, não se detectou diferenças entre C-05 e C-40, enquanto que em Aroana e Moruna não se detectou diferenças entre C-89 e C-40. Os maiores teores de N total nas vagens foram encontrados em Carioca x C-05 e Carioca x C-40. A simbiose mais eficiente na fixação do nitrogênio, Carioca x C-05 acumulou 909% a mais de N total nas vagens do que a simbiose menos efetiva, Venezuela-350 x C-89. Do mesmo modo como foi verificado para o transporte de carboidratos para o desenvolvimento das vagens, aqui também se verificou que houve um controle do transporte de N total para as vagens pela cultivar de feijoeiro e que foi mais marcante do que o transporte de carboidratos.

Os maiores valores de N total das plantas (Tabela 24) também corresponderam aos maiores valores de N total das vagens, embora a diferença entre o sistema mais eficiente e o sistema menos eficiente fosse de 243%, indicando deficiência na translocação do N em Venezuela-350.

Na Tabela 31 estão as taxas de assimilação de nitrogênio pelos diversos sistemas simbióticos, e os valores médios ficaram entre 2,09 e 7,84 mg N . pl⁻¹ . dia⁻¹. Na cultivar Venezuela-350 houve uma queda acentuada na fixação de nitrogênio no período de 40 - 55 DAG, provavelmente relacionada a uma baixa taxa fotossintética da planta. Adicionando-se a isso a baixa eficiência de translocação do nitrogênio por essa cultivar, pode-se explicar os menores teores de N nas vagens nela encontrados.

Verificou-se em todas as épocas o efeito da cultivar, da estirpe e da interação cultivar x estirpe na redução do C₂H₂, evolução do H₂ e ER (exceto cultivar x estirpe aos 55 DAG). A análise de variância encontra-se no apêndice 7, e os dados estão nas Tabelas 27 a 29 e nas Figuras 20 a 22.

Tabela 27. Valores de redução do C_2H_2 , evolução de H_2 e eficiência relativa dos elétrons destinados à nitrogenase em quatro cultivares de *Phaseolus vulgaris* inoculadas com três estirpes de *Rhizobium phaseoli*, aos 25, 40 e 55 dias após a germinação.

Cultivar de <i>P. vulgaris</i>	Estirpe de <i>R. phaseoli</i>	Redução de $\frac{a}{C_2H_2}$ ($\mu\text{moles} \cdot \text{pl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Evolução de $\frac{b}{H_2}$ ($\mu\text{moles} \cdot \text{g nod}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	ER $\frac{c}{d}$	Redução de $\frac{a}{C_2H_2}$ ($\mu\text{moles} \cdot \text{g nod}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Evolução de $\frac{b}{H_2}$ ($\mu\text{moles} \cdot \text{g nod}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	ER $\frac{c}{d}$
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 25 dias							
Venezuela-350	C-05	7,929 f*	3,013 j	0,62 i	77,055 e	29,743 f	0,62 d
	C-89 (= CIAT 57)	11,968 e	4,308 i	0,64 hi	98,098 e	36,050 f	0,63 d
	C-40 (= CIAT 255)	13,319 e	4,528 h	0,66 gh	141,691 d	52,651 de	0,63 d
Aroana	C-05	21,791 d	6,973 ef	0,60 efg	242,122 bc	66,984 abc	0,72 c
	C-89 (= CIAT 57)	26,412 c	7,395 d	0,72 cd	269,510 ab	67,227 abc	0,75 bc
	C-40 (= CIAT 255)	30,387 bc	7,293 d	0,76 b	289,400 a	75,969 a	0,74 bc
Moruna	C-05	19,334 d	6,380 g	0,67 fgh	151,047 d	53,613 cde	0,65 d
	C-89 (= CIAT 57)	27,127 bc	7,867 b	0,71 de	229,889 c	66,109 abcd	0,71 c
	C-40 (= CIAT 255)	30,644 b	7,661 c	9,75 bc	259,695 b	62,284 abcd	0,77 ab
Carioca	C-05	29,520 bc	7,085 e	0,76 b	252,308 bc	56,680 bcde	0,78 ab
	C-89 (= CIAT 57)	30,520 b	9,156 a	0,70 def	236,589 c	69,364 ab	0,71 c
	C-40 (= CIAT 255)	34,550 a	6,910 f	0,80 a	241,608 c	47,986 e	0,80 a
	DMS (1%)	3,997	0,163	0,04	27,833	14,080	0,05
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 40 dias							
Venezuela-350	C-05	29,245 f	6,434 e	0,78 de	156,350 e	34,406 c	0,78 d
	C-89	21,332 g	7,040 j	0,67 h	84,316 g	28,048 d	0,67 g
	C-40	23,632 g	6,617 k	0,72 g	101,425 f	29,806 d	0,71 f
Aroana	C-05	46,192 b	7,853 g	0,83 b	244,402 b	41,201 a	0,83 b
	C-89	31,109 f	9,022 a	0,71 g	149,562 e	42,357 a	0,72 f
	C-40	39,602 d	8,316 e	0,79 d	202,051 c	43,312 a	0,79 cd
Moruna	C-05	48,578 b	8,258 f	0,83 b	249,118 b	41,707 a	0,83 b
	C-89	34,555 e	8,639 d	0,75 f	148,944 e	35,996 bc	0,76 e
	C-40	43,555 c	8,711 c	0,80 cd	191,031 cd	39,595 ab	0,80 c
Carioca	C-05	60,152 a	7,820 h	0,87 a	275,927 a	35,225 c	0,87 a
	C-89	37,008 e	8,882 b	0,76 ef	146,857 e	35,960 bc	0,76 e
	C-40	42,150 c	7,587 i	0,82 bc	178,602 d	32,013 cd	0,82 b
	DMS (1%)	2,497	0,022	0,03	15,876	-	-
	DMS (5%)	-	-	-	-	4,16	0,02

continua -

Tabela 27. (continuação)

Cultivar de <i>P. vulgaris</i>	Estirpe de <i>R. phaseolis</i>	Redução de $\frac{a}{C_2H_2}$ ($\mu\text{moles} \cdot \text{pl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Evolução de $\frac{b}{H_2}$ ($\mu\text{moles} \cdot \text{pl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	ER $\frac{c}{\text{ER}}$	Redução de $\frac{a}{C_2H_2}$ ($\mu\text{moles} \cdot \text{g nod}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Evolução de $\frac{b}{H_2}$ ($\mu\text{moles} \cdot \text{g nod}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	ER $\frac{c}{\text{ER}}$
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 55 dias							
Venezuela-350	C-05	4,928 e	2,168 b	0,56	21,241 g	19,345 g	0,56
	C-89	2,723 f	1,416 e	0,48	11,345 i	5,364 i	0,53
	C-40	3,973 ef	1,827 i	0,54	15,766 h	7,337 h	0,54
Aroana	C-05	15,679 b	5,488 c	0,65	67,292 b	23,965 b	0,64
	C-89	8,001 cd	3,600 e	0,55	29,415 f	13,433 e	0,54
	C-40	8,178 cd	3,026 i	0,63	35,712 e	12,822 ef	0,64
Moruna	C-05	15,905 b	5,567 b	0,65	67,970 b	25,773 a	0,62
	C-89	7,583 d	3,498 f	0,54	30,825 f	13,313 e	0,57
	C-40	9,552 c	3,343 g	0,65	40,820 d	14,991 d	0,63
Carioca	C-05	25,510 a	6,378 a	0,75	98,876 a	23,977 b	0,76
	C-89	7,984 cd	3,194 h	0,60	29,461 f	11,743 f	0,60
	C-40	16,775 b	4,697 d	0,72	63,542 c	17,927 c	0,72
DMS (1%)		1,703	0,032	-	2,841	1,129	-

a/ Média de 3 repetições

b/ Média de 2 repetições

c/ Média de 2 repetições ;

$$ER = 1 - \frac{H_2 \text{ (ar)}}{C_2H_2}$$

(SCHUBERT e EVANS, 1976).

* Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível indicado

Tabela 28. Influência da cultivar de *Phaseolus vulgaris* L. na redução do C_2H_2 , evolução do H_2 e eficiência relativa dos elétrons destinados à nitrogenase. Plantas colhidas aos 25, 40 e 55 dias após a germinação.

Cultivar de <i>P. vulgaris</i>	Redução do $\frac{1}{C_2H_2}$ ($\mu\text{moles} \cdot \text{pl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Evolução do $\frac{2}{H_2}$ ($\mu\text{moles} \cdot \text{pl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Eficiência $\frac{3}{\text{relativa}}$	Redução do $\frac{1}{C_2H_2}$ ($\mu\text{moles} \cdot \text{pl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Evolução do $\frac{2}{H_2}$ ($\mu\text{moles} \cdot \text{pl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Eficiência $\frac{3}{\text{relativa}}$
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 25 dias						
Venezuela-350	11,072 c*	3,950 c	0,64 c	105,615 d	39,481 c	0,63 d
Aroana	26,197 b	7,220 b	0,72 b	267,011 a	70,060 a	0,74 b
Moruna	25,702 b	7,303 b	0,71 b	213,544 c	60,669 b	0,71 c
Carioca	31,530 a	7,717 a	0,75 a	243,502 b	58,010 b	0,76 a
DMS (1%)	2,308	0,163	0,02	16,070	6,208	0,02
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 40 dias						
Venezuela-350	24,736 d	6,697 d	0,72 d	144,044 b	30,753 d	0,72 d
Aroana	38,968 c	8,397 b	0,78 c	198,672 a	42,290 a	0,78 c
Moruna	42,229 b	8,536 a	0,79 b	196,364 a	39,099 b	0,80 b
Carioca	46,437 a	8,096 c	0,82 a	200,462 a	34,399 c	0,82 a
DMS (1%)	1,442	0,022	0,01	9,166	1,834	0,02
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 55 dias						
Venezuela-350	3,875 c	1,804 d	0,53 c	16,117 d	7,349 c	0,54 c
Aroana	10,619 b	4,038 c	0,61 b	44,140 c	16,740 b	0,61 b
Moruna	11,013 b	4,133 b	0,61 b	46,538 b	18,026 a	0,61 b
Carioca	16,756 a	4,756 a	0,69 a	63,960 a	17,882 a	0,69 a
DMS (1%)	0,492	0,018	0,02	1,64	0,652	0,03

1/ Média de 9 repetições;

2/ Média de 6 repetições;

3/ Média de 6 repetições, $ER = 1 - \frac{H_2 \text{ (ar)}}{C_2H_2}$

(SCHUBERT e EVANS, 1976).

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

Tabela 29. Influência da estirpe de *Rhizobium phaseoli* na redução do C_2H_2 , evolução de H_2 e eficiência relativa dos elétrons destinados à nitrogenase em *Phaseolus vulgaris* coletado aos 25, 40 e 55 dias após a germinação.

Estirpe de <i>R. phaseoli</i>	Redução de $\frac{1}{C_2H_2}$ ($\mu\text{moles} \cdot \text{pl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Evolução de $\frac{2}{H_2}$ ($\mu\text{moles} \cdot \text{pl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Eficiência relativa $\frac{3}{}$	Redução de $\frac{1}{C_2H_2}$ ($\mu\text{moles} \cdot \text{pl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Evolução de $\frac{2}{H_2}$ ($\mu\text{moles} \cdot \text{pl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Eficiência relativa $\frac{3}{}$
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 25 dias						
C-05	19,644 c*	5,863 c	0,68 b	180,633 c	51,755 b	0,69 b
C-89 (= CIAT-57)	24,007 b	7,182 a	0,69 b	208,522 b	59,688 a	0,70 b
C-40 (= CIAT-255)	27,225 a	6,598 b	0,74 a	233,098 a	59,722 a	0,74 a
DMS (1%)	1,804	0,127	0,02	12,596	4,826	-
DMS (5%)	-	-	-	-	-	0,02
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 40 dias						
C-05	46,042 a	7,591 c	0,83 a	231,459 a	38,135 a	0,83 a
C-89 (= CIAT-57)	31,001 c	8,396 a	0,72 c	132,420 c	35,590 b	0,73 c
C-40 (= CIAT-255)	37,235 b	7,808 b	0,78 b	168,277 b	36,182 b	0,78 b
DMS (1%)	1,130	0,017	0,01	7,185	1,426	0,01
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 55 dias						
C-05	15,506 a	4,900 a	0,65 a	63,845 a	20,765 a	0,64 a
C-89 (= CIAT-57)	6,573 c	2,924 c	0,54 b	25,262 c	10,963 c	0,56 c
C-40 (= CIAT-255)	9,620 b	3,223 b	0,64 a	38,960 b	13,269 b	0,62 b
DMS (1%)	0,386	0,014	0,02	1,286	0,506	-
DMS (5%)	-	-	-	-	-	0,02

1/ média de 12 repetições;

2/ média de 8 repetições;

3/ média de 8 repetições;

$$ER = 1 - \frac{H_2 \text{ (ar)}}{C_2H_2}$$

(SCHUBERT e EVANS, 1976)

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

Figura 20. Efeito da cultivar de *P. vulgaris* na atividade da nitrogenase (redução do C_2H_2) e evolução do H_2 aos 25, 40 e 55 dias após a germinação. As medidas foram feitas utilizando-se raízes noduladas destacadas (redução do C_2H_2) e nódulos destacados (evolução do H_2)

Figura 21. Efeito da estirpe de *R. phaseoli* na atividade da nitrogenase (redução do C₂H₂) e evolução do H₂ aos 25, 40 e 55 dias após a germinação. As medidas foram feitas utilizando-se raízes noduladas destacadas (redução do C₂H₂) e nódulos destacados (evolução do H₂).

ESTIPE DO *Rhizobium phaseoli*

- 1 - VENEZUELA - 350
2 - AROANA
3 - MORUNA
4 - CARIACA
- C-05
C-89 (= CIAT-57)
C-40 (= CIAT-255)

Figura 22. Variação da eficiência relativa dos elétrons destinados à nitrogenase durante o ciclo de quatro cultivares de *P. vulgaris* inoculadas com três estirpes de *R. phaseoli*.

O efeito da cultivar (Tabela 28), na redução do C_2H_2 e evolução do H_2 está representado na Figura 20, onde se observa que a maior atividade da nitrogenase ocorreu em Carioca e a menor em Venezuela-350. Embora as maiores taxas de evolução do H_2 também ocorressem na Carioca aos 25 e 55 DAG, essa cultivar apresentou a maior ER em todas as épocas. Por outro lado, embora Venezuela-350 apresentasse a menor taxa de evolução do H_2 em todas as épocas, o maior desvio de elétrons destinados à nitrogenase ocorreu nessa cultivar. Observa-se que a maior taxa de redução do C_2H_2 e ER mais elevada em cada época foi relacionada com o maior acúmulo de nitrogênio na planta. O pico da atividade nitrogenase e a maior ER ocorreram aos 40 DAG.

O efeito da estirpe (Tabela 29) nesses parâmetros está representado na Figura 21. Observa-se que a atividade da nitrogenase em C-05 passou a ter um grande incremento a partir dos 25 DAG, permanecendo mais ativa até o final do ciclo. Aos 40 DAG, embora C-05 apresentasse a maior taxa de redução do C_2H_2 , também evoluiu menos H_2 , apresentando uma ER de 0,83.

A estirpe C-40, hup^+ , apresentou, em comparação com as demais estirpes, maior ER aos 25 e 55 DAG, e a menor ER aos 40 DAG. Esses resultados podem estar relacionados com as observações de BETHLENFALVAY e PHILLIPS (1979) e SCHUBERT e RYLE (1980), de que a hidrogenase desempenharia seu papel na oxidação do H_2 principalmente sob condições de limitação de carbono, ou seja, no início e no final do ciclo. A estirpe C-89 apresentou as menores taxas de redução do C_2H_2 e as maiores taxas de evolução do H_2 , demonstrando uma grande ineficiência energética.

Comparando-se as Tabelas de redução do C_2H_2 (27, 28, 29) e N total da planta (24, 25, 26), verifica-se que a maior ER dos sistemas simbióticos sempre correspondeu aos teores de nitrogênio mais elevados, tanto ao nível de cultivar, como de estirpe e de interação cultivar x estirpe.

No Apêndice 2 estão as relações $C_2H_2 : N_2$ reduzidos encontradas nesse experimento. Houve uma variação de 2,81 : 1 até 6,22 : 1, e

portanto são intermediários aos encontrados por RENNIE e KEMP (1980) e SAI TO *et alii* (1980a). As relações mais baixas corresponderam à estirpe C-05 e as mais altas à estirpe C-89.

As taxas de evolução do CO_2 pelas raízes noduladas e nódulos destacados estão na Tabela 30.

Verifica-se que as menores taxas de evolução de CO_2 pelas raízes noduladas ocorreram, aos 25 dias, nas plantas inoculadas com a estirpe C-05. As maiores taxas ocorreram nas cultivares Venezuela-350, Aroana e Moruna inoculadas com C-89 e em Carioca inoculada com C-40.

Comparando-se as taxas respiratórias com a atividade enzimática da nitrogenase, verifica-se que a evolução do CO_2 nas raízes noduladas com C-40 esteve associada à maior taxa de redução do C_2H_2 e ao menor desvio de elétrons nesse sistema (ER) mostrando respiração relacionada com a fixação de nitrogênio. Isso fica evidente quando se observa, na Tabela 32, que as menores relações mg C respirado (como CO_2) pelas raízes noduladas mg N fixado^{-1} , no período de 0-25 DAG, foram encontradas nas plantas inoculadas com C-40 e variaram de 5,5 a 6,9.

Por outro lado, a maior respiração das raízes noduladas com C-89, pareceu estar associada aos gastos energéticos com a evolução do H_2 e não com a fixação de nitrogênio. Deste modo, este sistema foi o menos eficiente na utilização da energia obtida pela oxidação dos carboidratos e destinada à fixação do nitrogênio. A variação nessas raízes noduladas foi de 6,5 a 8,0 mg de C respirado por mg N fixado.

Segundo MAHON (1977a), a respiração nas raízes noduladas estaria associada ao crescimento e manutenção das raízes e nódulos e nos sistemas simbióticos haveria um terceiro componente relacionado ao processo de fixação do N_2 . Na Tabela 22, verificá-se que, aos 25 DAG, não houve diferença no peso das raízes relacionada às estirpes e embora o maior peso de nódulos tenha ocorrido nas plantas inoculadas com C-89, foi apenas 10 mg superior ao das demais estirpes. Deste modo, as diferenças na respiração estiveram relacionadas principalmente com maiores gastos de ATP com a atividade da nitrogenase, provavelmente pela evolução do H_2 .

Tabela 30. Perdas de CO_2 na respiração de raízes noduladas e nódulos destacados de quatro cultivares de *Phaseolus vulgaris* inoculadas com três estirpes de *Rhizobium phaseoli* aos 25, 40 e 55 dias após a germinação.

Cultivar de <i>P. vulgaris</i>	Estirpe de <i>R. phaseoli</i>	mg CO_2 . planta ⁻¹ . h ⁻¹								
		dias após a germinação								
		25			40			55		
		(a)	(b)	(c)	(a)	(b)	(c)	(a)	(b)	(c)
Venezuela-350	C-05	1,81	0,32	(18)	5,95	1,31	(22)	1,95	0,49	(25)
	C-89(=CIAT-57)	2,43	0,63	(26)	4,16	1,25	(30)	0,62	0,16	(26)
	C-40(=CIAT-255)	2,38	0,40	(17)	4,59	1,19	(26)	2,21	0,55	(25)
Aroana	C-05	3,03	0,57	(19)	6,42	1,61	(25)	5,82	1,10	(19)
	C-89	3,57	0,78	(22)	2,01	0,60	(30)	4,82	1,06	(22)
	C-40	3,52	0,60	(17)	2,52	0,63	(25)	4,25	0,89	(21)
Moruna	C-05	2,85	0,54	(19)	6,75	1,69	(25)	5,02	1,00	(20)
	C-89	3,54	0,74	(21)	2,24	0,63	(28)	3,26	0,91	(28)
	C-40	3,48	0,63	(18)	3,60	0,90	(25)	3,93	0,79	(20)
Carioca	C-05	3,58	0,72	(20)	6,01	1,32	(22)	11,05	2,21	(20)
	C-89	3,49	0,80	(23)	2,59	0,70	(27)	4,63	1,02	(22)
	C-40	4,35	0,83	(19)	2,49	0,55	(22)	7,27	1,45	(20)

(a) CO_2 perdido na respiração das raízes noduladas.

(b) CO_2 perdido na respiração dos nódulos.

(c) porcentagem do CO_2 evoluído pela raiz nodulada.

Tabela 31. Taxas de assimilação de nitrogênio ($\text{mg N} \cdot \text{pl}^{-1} \cdot \text{dia}^{-1}$) durante o crescimento de quatro cultivares de *Phaseolus vulgaris* inoculadas com três estirpes de *Rhizobium phaseoli*.

Cultivares de <i>P. vulgaris</i>	Estirpe de <i>R. phaseoli</i>	mg N fixado . planta ⁻¹ . dia ⁻¹			Média
		dias após a germinação			
		0-25	25-40	40-55	
Venezuela-350	C-05	1,54	6,22	1,83	3,20
	C-89 (= CIAT 57)	1,97	3,74	0,55	2,09
	C-40 (= CIAT 255)	2,24	4,13	2,08	2,82
Aroana	C-05	3,17	6,93	6,50	5,53
	C-89	3,56	1,67	4,66	3,30
	C-40	3,93	2,52	4,44	3,63
Moruna	C-05	2,93	7,54	6,05	5,51
	C-89	3,53	2,10	3,81	3,15
	C-40	3,96	3,65	4,15	3,92
Carioca	C-05	3,80	7,79	11,93	7,84
	C-89	3,43	2,62	4,62	3,56
	C-40	5,13	2,60	7,48	5,07

Na Tabela 30 encontram-se também os dados relativos à respi
ração dos nódulos destacados e os valores entre parêntesis indicam a % da
respiração dos nódulos em relação à respiração total das raízes noduladas.
Verifica-se que na estirpe C-29, hup⁻⁻⁻, que se caracterizou por apresentar
altas taxas de evolução do H_2 e CO_2 , embora a respiração fosse mais eleva-
da, não houve oxidação diferencial dos carboidratos das raízes, mas sim con
sumo de uma maior parcela de fotossintatos destinados às raízes nodula-
das. A maior evolução do CO_2 não correspondeu ao maior crescimento, dedu-
zindo-se que a energia obtida pela oxidação do C não foi eficientemente a-
proveitada na fixação de nitrogênio, uma vez que ocorreram taxas de C res-
pirado/N fixado mais elevadas. A perda de energia pela evolução de H_2 pro-
vavelmente foi uma das principais causas dessa respiração diferencial.

Desse modo, houve maior dispêndio de energia que deveria ser
utilizada para o crescimento das plantas, contribuindo provavelmente para
o menor peso de matéria seca encontrado nessas plantas.

Quanto às cultivares, verificou-se que em Aroana, Moruna e
Venezuela-350 a relação C respirado/N fixado das raízes noduladas foi seme-
lhante, de 6,1 a 6,2. Em Carioca, porém, essa relação foi de 7,5 e nos n^o
dulos destacados a relação foi: Venezuela-350 - 1,52; Aroana - 1,19; Moru-
na - 1,19; Carioca - 1,26 (Tabelas 32 e 33).

Pode-se dizer, portanto, que houve um efeito da cultivar, e
Venezuela-350 influenciou a eficiência da respiração das raízes noduladas.

MAHON (1979), ao estudar o efeito de 4 cultivares de ervi-
lha e 4 inoculantes encontrou que o genótipo da planta foi o único respon-
sável pelas diferenças na respiração associada à redução do C_2H_2 , não sen-
do encontrado efeito relacionado à cultivar ou à interação cultivar x in^o-
culo. Neste experimento, além do efeito da cultivar verificou-se o efeito
da estirpe. Este efeito da estirpe na eficiência respiratória foi mencio-
nado por estudos de NEVES *et alii* (1981), onde esteve relacionado com as
diferenças respiratórias durante o último período vegetativo. Neste expe-
rimento, porém, verificou-se diferenças entre as estirpes desde a fase ini
cial do crescimento.

Tabela 32. Relação C respirado (como CO_2) por raízes noduladas: N_2 fixado durante o crescimento de quatro cultivares de *Phaseolus vulgaris* inoculadas com três estirpes de *Rhizobium phaseoli*.

Cultivar de <i>P. vulgaris</i>	Estirpe de <i>R. phaseoli</i>	mg C . mg N ⁻¹			Média
		dias após a germinação			
		0-25	25-40	40-55	
Venezuela-350	C-05	7,6	6,2	6,9	6,9
	C-89 (= CIAT 57)	8,0	7,2	7,3	7,5
	C-40 (= CIAT 255)	6,9	7,2	6,9	7,0
Aroana	C-05	6,2	6,0	5,8	6,0
	C-89	6,5	7,8	6,7	7,0
	C-40	5,8	6,5	6,2	6,2
Moruna	C-05	6,3	5,8	5,9	6,0
	C-89	6,5	6,9	6,7	6,7
	C-40	5,7	6,4	6,5	6,2
Carioca	C-05	6,1	5,0	6,0	5,7
	C-89	6,6	6,4	6,5	6,5
	C-40	5,5	6,2	6,3	6,0

Tabela 33. Relação C respirado (como CO_2) pelos nódulos: N_2 fixado, durante o crescimento de quatro cultivares de *Phaseolus vulgaris* inoculadas com três estirpes de *Rhizobium phaseoli*.

Cultivar de <i>P. vulgaris</i>	Estirpe de <i>R. phaseoli</i>	mg C . mg N ⁻¹			Média
		dias após a germinação			
		0-25	25-40	40-55	
Venezuela-350	C-05	1,35	1,36	1,74	1,48
	C-89(= CIAT 57)	2,04	2,16	1,89	2,03
	C-40(= CIAT 255)	1,16	1,87	1,71	1,58
Aroana	C-05	1,16	1,50	1,29	1,32
	C-89	1,42	2,33	1,47	1,74
	C-40	0,99	1,62	1,30	1,30
Moruna	C-05	1,19	1,45	1,07	1,24
	C-89	1,36	1,94	1,22	1,54
	C-40	1,03	1,60	1,23	1,29
Carioca	C-05	1,23	1,10	1,20	1,18
	C-89	1,51	1,73	1,43	1,56
	C-40	1,05	1,37	1,26	1,23

Aos 40 DAG, verifica-se na Tabela 30 que a maior evolução do CO_2 ocorreu em C-05, e os menores valores foram encontrados em C-89. Nesta época ocorreu o pico da atividade da nitrogenase (Figuras 20 e 21), quando se verificou um efeito favorável da estirpe C-05 na fixação do nitrogênio. Observa-se, desse modo, que, embora C-05 tenha superado em até três vezes a evolução de CO_2 por C-89, essa respiração foi relacionada ao aumento da fixação e não à ineficiência respiratória dessa estirpe. A relação C respirado/N fixado no período 25-40 DAG, nas raízes noduladas por C-05, estiveram entre 5,0 e 6,2. A estirpe C-89, embora apresentasse as menores taxas de evolução do CO_2 , apresentou a menor atividade da nitrogenase e a maior relação C respirado/ N_2 fixado, estando entre 6,4 a 7,8 (Tabela 30).

A estirpe C-40, hup^+ , como já foi visto (Tabela 29) evoluiu H_2 em quantidades consideráveis nessa época, o que foi atribuído à maior disponibilidade de fotossintatos, diminuindo o papel da hidrogenase ativa (BETHLENFALVAY e PHILLIPS, 1979) e isso provavelmente explica porque a relação C respirado : N_2 fixado foi maior em C-40 do que em C-05.

As plantas inoculadas com C-89 apresentaram, no período de 25-40 DAG, a menor eficiência respiratória do seu ciclo, podendo-se relacionar essa respiração às taxas máximas de evolução do H_2 encontradas nessas plantas nesse mesmo período.

A análise da evolução do CO_2 aos 40 DAG mostrou que houve um aumento da respiração dos nódulos em relação à respiração das raízes noduladas, chegando a representar 30% da respiração total do sistema radicular nodulado.

Também se verificou um efeito da cultivar, e Carioca apresentou a maior eficiência respiratória, tanto das raízes noduladas como dos nódulos destacados. As relações C respirado : N_2 fixado das raízes noduladas (e nódulos destacados) encontradas foram: Venezuela-350 - 6,8 (1,8); Aroana - 6,7 (1,8); Moruna - 6,3 (1,6) e Carioca - 5,8 (1,4).

No período de 40-55 DAG, percebe-se que a maior e a menor eficiência respiratória foram relacionadas respectivamente à estirpe C-05

e C-89, enquanto que na cultivar a menor eficiência ocorreu em Venezuela -350 (Tabelas 32 e 33).

SCHUBERT *et alii* (1978) haviam verificado que o efeito da reciclagem do hidrogênio pela hidrogenase não estava relacionado à massa nodular e respiração, que não foram afetadas. Neste experimento, porém, verificou-se que as diferenças na eficiência respiratória causadas pelas diferenças entre estirpes (Tabelas 32 e 33) estiveram relacionadas com a ER (evolução do H_2) dessas estirpes em todas as épocas analisadas (Tabela 29). Também se observou relação entre a eficiência respiratória das cultivares e a ER das mesmas (Tabela 28). Isso mostra que deve haver alguma relação entre metabolismo do H_2 e do CO_2 .

Os valores encontrados neste experimento estão próximos do obtido por MAHON (1979) em *Phaseolus vulgaris*, que encontrou uma relação mg C/mg N de 6,1 (C perdido como CO_2 pelas raízes noduladas) e próximos aos encontrados em nódulos destacados de algumas leguminosas por ATKINS *et alii* (1978), como pode ser visto na Tabela 6.

As diferenças encontradas na eficiência respiratória foram relacionadas, neste experimento à ER dos sistemas, mas não se pode esquecer que essas diferenças provavelmente também estão associadas à presença de carboxilasés, que são encontradas tanto nas raízes como nos nódulos (LAWRIE e WHEELER, 1973), tendo já sido observado uma alta correlação entre altas taxas de fixação e eficiência de carboxilação ($R^2 = 0,99$) (BETHLENFALVAY *et alii*, 1978b).

4.4. Experimento IV

Neste experimento utilizou-se duas cultivares de *P. vulgaris* (Carioca e Aroana) e três estirpes de *R. phaseoli*, C-05 e C-29 (= 127 K 17), hup⁻, e C-88 (= SEMIA 487), hup⁺. Incluiu-se como tratamento a aplicação de três níveis de nitrogênio mineral, sob a forma de KNO_3 : 0, 7 e 35 ppm de N. As plantas foram coletadas aos 25, 45 e 65 dias após a germinação (DAG). A análise de variância encontra-se nos Apêndices 7 e 8.

Pode-se verificar, nas Tabelas 34 a 36 e nas Figuras 23 e 24 que houve efeito da cultivar no peso de matéria seca da parte aérea, raiz e nódulos em todas as épocas de coleta, exceto no peso dos nódulos aos 45 DAG.

Os maiores pesos de parte aérea (folhas + hastes) ocorreram em Carioca em todas as épocas analisadas, sendo superior a Aroana em 26%, 25% e 40%, respectivamente aos 25, 45 e 65 DAG. O maior peso das raízes ocorreu em Aroana, aos 25 DAG e em Carioca aos 45 e 65 DAG.

Quanto ao peso dos nódulos, a diferença entre as cultivares, aos 25 DAG, foi de apenas 7 mg, não houve diferença aos 45 DAG, mas na última coleta a massa nodular de Carioca foi superior à da Aroana em 70%. Isso indica que a cultivar Carioca provavelmente permitiu o aparecimento de uma população secundária de nódulos, enquanto que na cultivar Aroana isso não ocorreu. Essa hipótese fica mais evidente quando se verifica que houve um aumento de 74% na massa nodular de Carioca nos períodos de 45 a 65 DAG, ao passo que em Aroana não ocorreu alteração de peso. O aparecimento de uma população secundária de nódulos pode estar relacionado à maior capacidade fotossintética dessa cultivar, dispondo mais carboidratos para o crescimento e desenvolvimento dos nódulos, bem como pode estar associada ao hábito de crescimento de Carioca, prostrado com tendência a trepador, que mantém maior proporção de seus carboidratos em formas disponíveis (GRAHAM e HALLIDAY, 1977; GRAHAM e ROSAS, 1977), permitindo o aparecimento de uma população secundária de nódulos.

A queda no peso da parte aérea aos 65 DAG, foi relacionada à grande queda de folhas senescentes verificadas nessa época, o que não havia sido verificado nos experimentos anteriores, uma vez que as coletas tinham sido feitas anteriormente a essa época.

Também houve efeito da cultivar no acúmulo de nitrogênio na parte aérea, raiz e nódulos (Tabelas 37 a 39), o que pode ser visualizado nas Figuras 25 e 26.

Tabela 34. Valores de peso de matéria seca (g/planta) da parte aérea, raiz, nódulos e matéria seca total de duas cultivares de *Phaseolus vulgaris* inoculadas com três estirpes de *Rhizobium phaseoli* e que receberam três doses de nitrogênio (0, 7 e 35 ppm de N). Plantas coletadas aos 25 dias. após a germinação. Média de 3 repetições.

Cultivar de <i>P. vulgaris</i>	Estirpe de <i>R. phaseoli</i>	Dose de N	M.S. da parte aérea (folhas + hastes)	M.S. da raiz	M.S. dos nódulos	M.S. total (parte aérea + raiz + nódulos)
Carioca	C-05	N ⁰	2,939	0,358	0,139	3,435
		N ¹	3,663	0,381	0,150	4,403
		N ²	4,010	0,426	0,139	4,574
	C-88 (=SEMIA 487)	N ⁰	3,872	0,373	0,167	4,412
		N ¹	3,984	0,441	0,149	4,574
		N ²	4,110	0,432	0,129	4,672
	C-29 (= 127 K-17)	N ⁰	2,566	0,383	0,164	3,113
		N ¹	3,042	0,475	0,162	3,679
		N ²	2,769	0,450	0,164	3,383
X da cultivar			3,439	0,413	0,152	4,027
Aroana	C-05	N ⁰	2,559	0,420	0,235	3,214
		N ¹	2,613	0,308	0,164	3,085
		N ²	3,431	0,423	0,157	4,011
	C-88 (=SEMIA 487)	N ⁰	2,329	0,828	0,172	3,328
		N ¹	2,745	0,556	0,182	3,482
		N ²	3,642	0,568	0,155	4,364
	C-29 (=127 K-17)	N ⁰	2,131	0,418	0,122	2,671
		N ¹	2,366	0,667	0,142	3,175
		N ²	2,631	0,509	0,106	3,246
X da cultivar			2,716	0,522	0,159	3,397
DMS * (1%)		0,210	0,036	-	0,200	
DMS (5%)		-	-	0,007	-	

(*) DMS para cultivar

Tabela 35. Produção de matéria seca (g/planta) da parte aérea, raiz, nódulos e matéria seca total de duas cultivares de *Phaseolus vulgaris* inoculadas com três estirpes de *Rhizobium phaseoli* e recebendo três doses de nitrogênio (0, 7 e 35 ppm de N). Plantas coletadas aos 45 dias após a germinação. Média de 3 repetições.

Cultivar de <i>P. vulgaris</i>	Estirpe de <i>R. phaseoli</i>	Dose de N	M.S. da parte aérea (folhas + hastes)	M.S. das raízes	M.S. dos nódulos	M.S. total (p. aérea + raiz + nódulos)
Carioca	C-05	N ⁰	6,642	0,770	0,172	7,584
		N ¹	7,047	0,643	0,201	7,891
		N ²	8,262	0,649	0,153	9,064
	C-88 (=SEMIA 487)	N ⁰	6,482	0,714	0,198	7,393
		N ¹	7,466	0,712	0,216	8,394
		N ²	8,406	0,854	0,177	9,438
	C-29 (=127 K-17)	N ⁰	4,098	0,588	0,111	4,797
		N ¹	4,161	0,629	0,149	4,939
		N ²	4,692	0,633	0,123	5,448
<hr/>						
X̄ da cultivar			6,362	0,688	0,167	7,216
Aroana	C-05	N ⁰	5,222	0,574	0,219	5,015
		N ¹	5,765	0,601	0,215	6,580
		N ²	5,739	0,659	0,192	6,589
	C-88 (=SEMIA 487)	N ⁰	5,148	0,613	0,205	5,966
		N ¹	5,152	0,643	0,201	5,996
		N ²	6,169	0,755	0,168	7,093
	C-29 (=127 K-17)	N ⁰	4,024	0,430	0,130	4,584
		N ¹	4,013	0,531	0,129	4,673
		N ²	4,543	0,689	0,112	5,344
<hr/>						
X̄ da cultivar			5,086	0,610	0,174	5,760
<hr/>						
DMS * (1%)			0,186	0,045	-	0,363

(*) DMS para cultivar

Tabela 36. Valores de peso da matéria seca (g/planta) da parte aérea, raiz, nódulos e matéria seca total de duas cultivares de *Phaseolus vulgaris* inoculadas com 3 estirpes de *Rhizobium phaseoli* e três níveis de nitrogênio (0, 7 e 35 ppm). Plantas coletadas aos 65 dias após a germinação. Média de 4 repetições.

Cultivar de <i>P. vulgaris</i>	Estirpe de <i>R. phaseoli</i>	Dose de N	M.S. da parte aérea (fôlhas + hastes)	M.S. da raiz	M.S. do nódulo	M.S. total (p. aérea + raiz + nódulos + vagens)	
Carioca	C-05	N ⁰	5,610	0,915	0,326	11,176	
		N ¹	6,076	1,004	0,436	12,657	
		N ²	6,858	1,079	0,299	13,413	
	C-88(=SEMIA 487)	N ⁰	5,626	0,893	0,359	11,774	
		N ¹	6,097	0,992	0,441	12,830	
		N ²	6,732	0,947	0,307	14,531	
	C-20(=127 K-7)	N ⁰	3,906	0,617	0,136	6,915	
		N ¹	4,203	0,767	0,164	8,077	
		N ²	4,075	0,743	0,150	8,636	
	$\bar{X}$ da cultivar			5,443	0,884	0,291	11,112
	Aroana	C-05	N ⁰	4,318	0,606	0,151	8,241
			N ¹	4,413	0,678	0,232	9,082
N ²			4,615	0,567	0,219	9,787	
C-88(=SEMIA 487)		N ⁰	3,969	0,659	0,161	7,859	
		N ¹	4,449	0,603	0,177	8,735	
		N ²	4,880	0,710	0,171	10,407	
C-20(=127 K-7)		N ⁰	2,572	0,598	0,119	5,795	
		N ¹	2,833	0,600	0,170	6,761	
		N ²	2,950	0,594	0,139	7,224	
$\bar{X}$ da cultivar			3,889	0,624	0,171	8,210	
DMS*(1%)			0,167	0,049	0,014	0,305	

(*) DMS para cultivar

Figura 23. Valores de peso de matéria seca (g.pl^{-1}) da parte aérea, raiz, nódulos e peso total das plantas de *P. vulgaris* cv. Carioca inoculadas com três estirpes de *R. phaseoli* e sob três níveis de nitrogênio mineral aos 25, 45 e 65 dias após a germinação (DAG).

Figura 24. Valores de peso de matéria seca (g.pl^{-1}) da parte aérea, raiz, nódulos e peso total das plantas de *P. vulgaris* cv. Aroana inoculadas com três estirpes de *R. phaseoli* e sob três níveis de nitrogênio mineral aos 25, 45 e 65 dias após a germinação (DAG).

Tabela 37. Valores de ZN e N total (mg/planta) da parte aérea, raiz e nódulos de duas cultivares de *Phaseolus vulgaris* inoculadas com três estirpes de *Rhizobium phaseoli* e recebendo três doses de nitrogênio (0, 7 e 35 ppm de N). Plantas coletadas aos 25 dias de idade após a germinação. Média de 3 repetições.

Cultivar de <i>P. vulgaris</i>	Estirpe de <i>R. phaseoli</i>	Dose de N	parte aérea		raiz		nódulo		N total da planta (p.aérea + raiz + nódulo)
			ZN	N total	ZN	N total	ZN	N total	
Carioca	C-05	N ₀	2,74	80,528	2,21	7,912	3,61	5,018	93,458
		N ₁	3,50	128,205	1,90	7,239	3,51	5,265	140,709
		N ₂	3,54	141,195	2,08	8,861	3,36	4,670	155,726
	C-88 (= SEMIA 487)	N ₀	3,89	150,621	2,09	7,796	3,80	6,346	164,763
		N ₁	3,87	154,181	2,17	9,570	3,11	4,634	168,385
		N ₂	3,54	145,494	2,64	11,405	3,23	4,167	161,066
	C-29 (= 127 K-17)	N ₀	3,24	83,138	2,28	8,732	3,21	5,264	97,134
		N ₁	2,86	87,001	2,32	11,020	3,20	5,184	103,205
		N ₂	3,10	85,839	2,68	12,060	3,29	5,396	103,295
$\bar{X}$ da cultivar			3,36	117,356	2,26	9,399	3,38	5,105	131,971
Aroana	C-05	N ₀	3,22	82,400	2,55	10,710	3,86	9,070	102,180
		N ₁	2,81	73,425	2,66	8,193	3,68	6,035	87,653
		N ₂	3,37	115,625	2,39	10,110	3,51	5,511	131,246
	C-88 (= SEMIA 487)	N ₀	3,50	81,513	2,04	16,891	3,67	6,312	104,718
		N ₁	3,47	95,252	2,35	13,066	3,27	5,951	114,269
		N ₂	3,34	121,643	1,91	10,849	3,18	4,929	137,421
	C-29 (= 127 K-17)	N ₀	3,44	73,306	2,30	9,614	3,87	4,721	87,641
		N ₁	3,03	71,690	2,27	15,141	3,20	4,544	91,375
		N ₂	2,73	71,826	1,99	10,129	3,54	3,752	85,807
$\bar{X}$ da cultivar			3,21	87,076	2,43	11,634	3,53	5,647	104,701
DMS * (12)			0,10	5,485		0,778	0,02	0,355	5,568

(*) DMS para cultivar.

Tabela 38. Valores de ZN e N total (mg/planta) da parte aérea, raiz e nódulos de duas cultivares de *Phaseolus vulgaris* inoculadas com três estirpes de *Rhizobium phaseoli* e que receberam três doses de nitrogênio (0, 7 e 35 ppm de N). Plantas coletadas aos 45 dias após a germinação. Média de 3 repetições.

Cultivar de <i>P. vulgaris</i>	Estirpe de <i>R. phaseoli</i>	Dose de N	parte aérea		raiz		nódulo		N total da plan- ta (p.aérea+raiz + nódulo)
			ZN	N total	ZN	N total	ZN	N total	
Carioca	C-05	N ₀	3,11	206,566	2,50	19,250	3,91	6,725	232,541
		N ₁	3,27	230,437	2,46	15,817	3,63	7,296	253,550
		N ₂	3,57	294,953	2,65	17,199	2,84	4,345	316,497
C-88 (= SEMIA 487)	N ₀	3,64	235,945	2,68	19,135	3,93	7,781	262,861	
		N ₁	3,97	296,400	2,68	19,082	3,81	8,230	323,712
		N ₂	3,91	328,675	2,77	23,656	3,21	5,682	358,013
C-29 (= 127 K-17)	N ₀	2,78	113,924	2,38	13,995	3,84	4,262	132,181	
		N ₁	2,92	121,500	2,45	15,410	3,53	5,259	142,169
		N ₂	3,01	141,229	2,53	16,015	2,75	3,383	160,627
X da cultivar			3,36	218,848	2,57	17,729	3,49	5,885	242,461
Arouna	C-05	N ₀	3,08	160,838	2,51	14,407	3,78	8,278	183,523
		N ₁	3,21	185,056	2,52	15,145	3,81	8,192	208,393
		N ₂	3,21	184,222	2,67	17,595	3,07	5,890	207,707
C-88 (= SEMIA 487)	N ₀	3,80	195,624	2,67	16,367	3,64	7,462	219,453	
		N ₁	3,91	201,443	2,63	16,901	3,20	6,432	224,776
		N ₂	3,96	244,292	2,75	20,762	3,15	5,293	270,347
C-29 (= 127 K-17)	N ₀	2,32	93,357	1,99	8,556	3,24	4,212	106,125	
		N ₁	2,22	89,089	2,23	11,841	3,19	4,115	105,045
		N ₂	2,45	111,304	2,45	16,880	3,13	3,506	131,690
X da cultivar			3,13	162,803	2,50	15,384	3,35	5,931	184,118
DMS * (12)			0,10	8,732	0,02	1,153	0,03	-	8,850

(*) DMS para cultivar

(*) DMS para cultivar

Tabela 39. Valores de Zn e N total (mg/planta) da parte aérea, raiz e nódulos de duas cultivares de *Phaseolus vulgaris* inoculadas com três estirpes de *Rhizobium phaseoli* e que receberam três doses de nitrogênio (0, 7 e 35 ppm de N). Plantas coletadas aos 65 dias após a germinação. Média de 4 repetições.

Cultivar de <i>P. vulgaris</i>	Estirpe de <i>R. phaseoli</i>	Dose de N	parte aérea		raiz		nódulo	
			ZN	N total	ZN	N total	ZN	N total
Carioca	C-05	N ₀	2,58	144,738	1,88	17,202	2,57	8,378
		N ₁	2,53	153,723	1,86	18,674	3,41	14,868
		N ₂	2,37	162,536	2,05	22,120	3,80	11,362
	C-88 (= SEMIA 487)	N ₀	1,99	111,957	1,63	14,556	3,70	13,283
		N ₁	2,18	132,915	1,87	18,550	3,86	17,023
		N ₂	2,10	141,372	2,05	19,414	3,96	12,157
	C-29 (= 127 K-17)	N ₀	1,81	70,697	1,69	10,427	2,38	3,237
		N ₁	1,85	77,756	1,74	13,346	2,68	4,395
		N ₂	1,56	63,570	1,75	13,003	3,29	4,935
X da cultivar			2,11	117,696	1,84	16,366	3,29	9,960
Aroana	C-05	N ₀	1,87	80,745	1,51	9,151	2,67	4,031
		N ₁	1,98	87,377	1,52	10,306	3,37	7,818
		N ₂	2,30	106,145	1,68	9,526	3,92	8,584
	C-88 (= SEMIA 487)	N ₀	2,04	80,968	1,41	9,292	3,03	4,878
		N ₁	1,84	81,862	1,41	8,502	3,20	5,664
		N ₂	1,78	86,864	1,63	11,573	3,18	5,438
	C-29 (= 127 K-17)	N ₀	1,42	36,522	1,40	8,372	1,83	2,198
		N ₁	1,80	50,994	1,43	8,580	2,29	3,893
		N ₂	2,02	59,590	1,44	8,553	2,16	3,002
X da cultivar			1,89	74,563	1,49	9,317	2,85	5,056
DMS * (1%)			0,08	5,221	0,07	0,857	0,07	0,504

(*) DMS para cultivar

(*) DMS para cultivar

Figura 25. (continua)

continuação

Figura 25. Teor de nitrogênio ($\text{mg} \cdot \text{pl}^{-1}$) da parte aérea, raiz, nódulos e N total da planta em *P. vulgaris* cv. Carioca inoculado com três estirpes de *R. phaseoli* e sob três níveis de nitrogênio mineral, aos 25, 45 e 65 dias após a germinação (DAG).

Figura 26. (continua)

continuação

Figura 26. Teor de nitrogênio ($\text{mg} \cdot \text{pl}^{-1}$) da parte aérea, raiz, nódulos e N total da planta em *P. vulgatus* cv. Aroana inoculado com três estirpes de *R. phaseoli* e sob três níveis de nitrogênio mineral, aos 25, 45 e 65 dias após a germinação (DAG).

Os maiores teores de N na parte aérea ocorreram em Carioca, que superou Aroana em 34%, 34% e 57%, respectivamente aos 25, 45 e 65 DAG. Como já foi discutido, não houve praticamente diferença entre as cultivares no peso dos nódulos aos 25 e 45 DAG, o que indica que os nódulos da cultivar Carioca eram cerca de 30% mais eficientes na fixação de nitrogênio do que os nódulos de Aroana. As diferenças aos 65 DAG provavelmente estão relacionadas com o aparecimento da população secundária de nódulos. A queda no teor de N da parte aérea verificada aos 65 DAG está de acordo com HAAG *et alii* (1967), que verificaram um grande decréscimo na %N e N total das folhas de feijoeiro a partir do florescimento, sugerindo alta translocação desse elemento.

Também houve efeito da cultivar no teor de N das raízes, maior em Aroana aos 25 DAG, que entretanto foi superada por Carioca aos 45 e 65 DAG. A diminuição do teor de N das raízes aos 65 DAG pode estar relacionada às observações de RUSCHEL *et alii* (1979b), que verificaram que o feijoeiro excretava material nitrogenado das raízes e nódulos para o solo, no qual se verificava um incremento no teor desse elemento.

Quanto ao teor de N nos nódulos, não houve praticamente diferença entre as cultivares aos 25 e 45 DAG. O maior teor de N nos nódulos de Carioca aos 65 DAG, esteve relacionado com uma maior concentração do elemento nos tecidos e com o maior peso dos nódulos. Enquanto que em Carioca houve um incremento de 69% no N dos nódulos, em Aroana houve uma queda, provavelmente relacionada com as observações de RUSCHEL *et alii* (1979b) de excreção de N pelos nódulos de feijoeiro.

Verificou-se também o efeito da cultivar na produção e teor de N das vagens coletadas aos 65 DAG, como pode ser visto na Tabela 40 e na Figura 27.

O peso das vagens na cultivar Carioca foi 27% maior do que o peso na cultivar Aroana. Verifica-se, porém, que não houve diferença entre as cultivares no peso da casca da vagem, enquanto que as sementes de Carioca pesaram 38% a mais do que as sementes de Aroana. Deste modo, conclui-se que houve uma diferença não só na produção de vagens, como também na eficiência de translocação de carboidratos para a formação das sementes

Tabela 40. Valores de peso de matéria seca (g/planta) das vagens, sementes e cascas das vagens e valores de ΣN e N total (mg/planta) das sementes e das cascas das vagens de duas cultivares de *Phaseolus vulgaris* inoculadas com três estirpes de *Rhizobium phaseoli* e sob três níveis de nitrogênio (0, 7 e 35 ppm de N). Plantas coletadas aos 65 dias após a germinação. Média de 4 repetições.

Cultivar de <i>P. vulgaris</i>	Estirpe de <i>R. phaseoli</i>	Dose de N	M.S. da vagem	semente			casca da vagem			N total da planta (fo- lhas+raiz +nódulo +vagem)
				M.S.	ΣN	N total	M.S.	ΣN	N total	
Carioca	C-05	N ₀	4,325	3,453	3,12	107,734	0,872	1,29	11,223	239,275
		N ₁	5,140	3,976	3,20	127,232	1,164	1,20	13,968	328,465
		N ₂	5,376	4,411	3,29	145,125	0,964	0,45	4,338	345,477
	C-88 (= SEMIA 487)	N ₀	4,894	4,061	2,85	115,739	0,834	0,80	6,672	262,207
		N ₁	5,302	4,038	2,91	117,506	1,263	0,94	11,872	297,866
		N ₂	6,544	5,094	2,96	150,782	1,452	0,67	9,722	333,447
	C-29 (= 127 K-17)	N ₀	2,256	1,633	3,20	52,256	0,624	1,34	8,362	1-4,979
		N ₁	2,936	2,242	3,04	68,157	0,694	0,72	4,997	158,651
		N ₂	3,668	2,902	2,77	80,385	0,766	0,62	4,749	166,642
	$\bar{X}$ da cultivar		4,494	3,534	3,04	107,212	0,959	0,89	8,437	259,668
Aroana	C-05	N ₀	3,166	2,151	3,38	72,704	1,015	0,90	9,135	173,766
		N ₁	3,759	2,698	3,14	84,717	1,061	1,25	13,263	203,461
		N ₂	4,309	3,294	3,25	107,055	1,015	1,11	11,266	242,576
	C-88 (= SEMIA 487)	N ₀	3,069	2,187	3,16	69,169	0,882	0,58	5,116	169,363
		N ₁	3,506	2,748	3,12	85,738	0,757	0,83	6,283	183,049
		N ₂	4,646	3,516	3,26	114,622	1,129	0,57	6,435	224,932
	C-29 (= 127 K-17)	N ₀	2,506	1,744	3,01	52,494	0,762	0,54	4,115	103,701
		N ₁	3,158	2,134	3,03	64,660	1,024	0,69	7,066	135,193
		N ₂	3,556	2,573	3,10	79,763	0,983	0,68	6,684	157,552
	$\bar{X}$ da cultivar		3,519	2,561	3,16	81,207	0,959	0,79	7,00	177,850
	DMS * (1%)		0,222	0,206	0,11	6,426	-	-	-	7,762
	DMS (5%)							0,09		

(*) DMS para cultivar

Figura 27. Teor de N total ($\text{mg} \cdot \text{pl}^{-1}$) das vagens (sementes + casca da vagem) de duas cultivares de *P. vulgaris* inoculadas com três estirpes de *R. phaseoli* e sob três níveis de N mineral. Plantas coletadas aos 65 DAG.

e BETHLENFALVAY e PHILLIPS (1978a) já haviam discutido a importância da seleção de sistemas simbióticos que tenham maior eficiência na produção e translocação de carboidratos. As diferenças entre cultivares de feijoeiro na produtividade das sementes já haviam sido constatada por WESTERMAN e KOLAR (1978) e RUSCHEL *et alii* (1979a).

WESTERMAN e KOLAR (1978) obtiveram maiores produtividades de sementes em feijoeiro de hábito de crescimento trepador e semi-arbustivo, enquanto que as menores produtividades foram obtidas nas cultivares arbustivas (ou de hábito prostrado), como pode ser visto na Tabela 8, e os resultados encontrados neste experimento concordam com os obtidos por esses autores.

Não houve efeito da cultivar no teor de N da casca da vagem, mas Carioca acumulou 32% a mais de N na semente do que Aroana, verificando-se uma diferença na utilização do nitrogênio fixado.

Analisando-se o teor de N total das plantas (Tabelas 37, 38 e 40), verifica-se que Carioca foi superior a Aroana em 26%, 31% e 46%, respectivamente aos 25, 45 e 65 DAG.

O efeito da estirpe de *Rhizobium phaseoli* no peso de matéria seca e teor de N estão na Tabela 41.

Não houve diferença no peso da parte aérea entre C-05 e C-88, mas C-29 foi inferior em todas as épocas, apresentando aos 65 DAG um peso 54% menor que C-88. As plantas inoculadas com C-88 apresentaram maior peso de raízes em todas as épocas analisadas, e os menores pesos foram encontrados nas plantas inoculadas com C-29. Também não houve diferença entre C-05 e C-88 no peso dos nódulos, que sempre foram menores em C-29.

Analisando-se o teor de N da parte aérea, verifica-se que os maiores valores foram obtidos por C-88, hup⁺, aos 25 e 45 DAG, enquanto que aos 65 DAG eles foram obtidos por C-05, hup⁻.

As plantas inoculadas com C-88 apresentaram teores de N na parte aérea superiores às plantas inoculadas com C-29 em 58%, 124% e 77% respectivamente aos 25, 45 e 65 DAG.

Tabela 41. Efeito da estirpe de *Rhizobium phaseoli* na produção de matéria seca (g/planta), ΣN e Σ total (mg/planta) da parte aérea, raiz e nódulos e na matéria seca total e Σ total de *P. vulgaris*, coletado aos 25, 45 e 65 dias após a germinação. ^{1/}

Estirpe de <i>R. phaseoli</i>	parte aérea			raiz			nódulo			P. aérea + raiz + nódulos + vagens	
	M.S.	ΣN	N total	M.S.	ΣN	N total	M.S.	ΣN	N total	M.S.	N total
ÉPOC A DE AMOSTRAGEM = 25 dias											
C-05	3,202 a*	3,20 b*	103,563 b	0,386 c	2,30 ab	8,838 b	0,164 a	3,59 a	5,928 a	3,787 b	119,495 b
C-88 (= SEMI A 487)	3,447 a	3,60 a	124,784 a	0,533 a	2,20 b	11,600 a	0,159 a	3,39 b	5,390 b	4,138 a	142,244 a
C-29 (= 127 K-17)	2,584 b	3,07 c	78,800 c	0,484 b	2,31 a	11,196 a	0,143 b	3,39 b	4,811 c	3,211 c	94,758 c
DMS (1%)	0,295	0,11	7,692	0,0102	-	1,091	0,014	0,03	0,498	0,280	7,808
DMS (5%)	-	-	-	-	0,106	-	-	-	-	-	-
ÉPOC A DE AMOSTRAGEM = 45 dias											
C-05	6,446 a	3,24 b	210,349 b	0,649 b	2,55 b	16,566 b	0,192 a	3,51 a	6,789 a	7,120 a	233,713 b
C-88 (= SEMI A 487)	6,471 a	3,88 a	250,397 a	0,715 a	2,70 a	19,317 a	0,194 a	3,48 a	6,813 a	7,380 a	276,642 a
C-29 (= 127 K-17)	4,255 b	2,62 c	111,734 c	0,583 c	2,34 c	13,788 c	0,125 b	3,28 b	4,124 b	4,964 b	129,735 c
DMS (1%)	0,260	0,10	9,594	0,064	0,03	1,618	0,016	0,04	0,629	0,509	12,411
ÉPOC A DE AMOSTRAGEM = 65 dias											
C-05	5,282 a	2,27 a	122,544 a	0,808 a	1,75 a	14,497 a	0,277 a	3,29 b	9,174 a	10,726 a	264,174 a
C-88 (= SEMI A 487)	5,292 a	1,99 b	105,990 b	0,801 a	1,66 b	13,648 a	0,269 a	3,48 a	9,741 a	11,023 a	245,978 b
C-29 (= 127 K-17)	3,423 b	1,74 c	59,855 c	0,653 b	1,57 b	10,380 b	0,146 b	2,44 c	3,610 b	7,234 b	146,127 c
DMS (1%)	0,233	0,14	7,290	0,068	0,10	1,197	0,020	0,09	0,703	0,426	10,838

^{1/} 25 e 45 dias após a germinação: média de 18 repetições
65 dias após a germinação: média de 24 repetições

(*) Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de indicado.

As plantas inoculadas com C-88 também apresentaram os maiores teores de N nas raízes, enquanto os menores ocorreram em C-05 aos 25 e 45 DAG, e em C-29 aos 65 DAG. Os nódulos mais ricos em nitrogênio também ocorreram nas plantas inoculadas com C-05 e C-88.

O teor de N da planta toda nos mostra que os maiores valores foram obtidos por C-88 aos 25 e 45 DAG. A C-88 foi superior a C-05 e C-29, ambas hup^- , respectivamente em 19% e 50%, aos 25 DAG, e em 18% e 113% aos 45 DAG. Aos 65 DAG, porém, os maiores valores foram obtidos nas plantas inoculadas com C-05. Nessa época, C-05 superou C-88 e C-29 respectivamente em 7% e 68%. Desse modo, embora C-88 seja hup^+ , após os 45 DAG foi superada por C-05 hup^- , e talvez isso tenha ocorrido porque C-05 foi uma estirpe menos eficiente na fixação do N_2 mas com maior persistência na atividade da nitrogenase.

O efeito da estirpe na produção e teor de nitrogênio das vagens encontra-se na Tabela 43, podendo ser visualizado na Figura 27. Embora o maior peso de vagens tenha ocorrido nas plantas inoculadas com C-88, não houve diferença no peso das sementes e no peso da casca da vagem entre C-88 e C-05. As plantas inoculadas com C-29 sempre apresentaram os menores pesos de vagens. A produção de sementes nas plantas inoculadas com C-29 foi 63% menor do que nas plantas inoculadas com C-88.

O efeito da aplicação de nitrogênio na produção de matéria seca e teor de nitrogênio nas plantas pode ser visto na Tabela 42.

Neste experimento introduziu-se esse parâmetro dada a importância de se realizar a seleção para nodulação e obtenção de sistemas mais eficientes na presença de nitrogênio combinado (GIBSON, 1971, 1981b), visto que este sempre está presente no solo e pode inibir a fixação, particularmente em *Phaseolus vulgaris*, que é extremamente sensível ao N mineral (CARTWRIGHT, 1967).

A aplicação de pequenas doses iniciais de nitrogênio mineral ($\text{N}_1 = 7$ ppm N e $\text{N}_2 = 35$ ppm N) favoreceu o acúmulo de matéria seca na parte aérea em todas as épocas (Figuras 23 e 24). Aos 65 DAG verificou-se

Tabela 43. Influência de três estirpes de *Rhizobium phaseoli* e de três doses de nitrogênio (0, 7 e 35 ppm de N) na produção de matéria seca (g/planta) da vagem, semente e casca da vagem e na %N e N total (mg/planta) da casca da vagem e da semente de *Phaseolus vulgaris* coletado aos 65 dias após a germinação. Média de 24 repetições.

Estirpe de <i>R. phaseoli</i>	M.S. da vagem	semente			casca da vagem		
		M.S.	%N	N total	M.S.	%N	N total
C-05	4,346 b*	3,330 a	3,23 a	107,427 a	1,015 a	1,03 a	10,532 a
C-88 (= SEMIA 487)	4,660 a	3,607 a	3,04 b	108,916 a	1,052 a	0,73 b	7,683 b
C-29 (= 127 K-17)	3,013 c	2,204 b	3,02 b	66,286 b	0,808 b	0,76 b	5,996 c
DMS (1%)	0,310	0,286	0,16	8,972	0,166	0,17	1,164
Dose de N							
N ₀	3,369 c	2,538 c	3,12	78,339 c	0,831 b	0,91 a	7,432 b
N ₁	3,966 b	2,972 b	3,07	91,335 b	0,993 ab	0,94 a	9,367 a
N ₂	4,683 a	3,631 a	3,10	112,955 a	1,051 a	0,68 b	7,199 b
DMS (1%)	0,310	0,286	-	8,972	0,166	0,17	1,164

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

Tabela 42. Influência de diferentes doses de N (0, 7 e 35 ppm de N) no peso da matéria seca (g/planta), %N e N total (mg/planta) da parte aérea, raiz e nódulos e no peso₁ de matéria seca total e N total de *P. vulgaris* coletados aos 25, 45 e 65 dias após a germinação.

Dose de nitro- genio	parte aérea			raiz			nódulo			p. aérea + raiz + nódulo + vagem	
	M.S.	%N	N total	M.S.	%N	N total	M.S.	%N	N total	M.S.	N total
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 25 dias											
N	2,733 c*	3,34	91,918 c*	0,463	2,24	10,268	0,166 a	3,68 a	6,122 a	3,362 c	108,308 c
N ₀	3,069 b	3,26	101,626 b	0,471	2,28	10,708	0,158 a	3,33 b	5,358 b	3,733 b	117,692 b
N ₁	3,432 a	3,27	113,604 a	0,468	2,28	10,594	0,142 b	3,35 b	4,738 c	4,042 a	128,936 a
N ₂											
DMS(1%)	0,295	-	7,692	-	-	-	0,014	0,03	0,498	0,280	7,608
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 45 dias											
N	5,269 c	3,12 b	167,665 c	0,615 b	2,45 c	15,280 b	0,173 a	3,72 c	6,453 a	5,890 c	189,398 c
N ₀	5,601 b	3,25 ab	187,470 b	0,626 b	2,50 b	15,710 b	0,185 a	3,52 b	6,587 a	6,412 b	209,767 b
N ₁	6,302 a	3,35 a	217,500 a	0,706 a	2,64 a	18,716 a	0,154 b	3,02 a	4,683 b	7,162 a	240,900 a
N ₂											
DMS(1%)	0,260	0,15	12,246	0,064	0,03	1,618	0,016	0,04	0,629	0,510	12,411
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 65 dias											
N	4,333 c	1,95	87,604 b	0,715 b	1,58 b	11,500 b	0,208 c	2,69 c	6,000 c	8,626 c	190,880 c
N ₀	4,679 b	2,03	97,438 a	0,774 a	1,64 ab	12,993 a	0,269 a	3,13 b	8,944 a	9,690 b	220,077 b
N ₁	4,985 a	2,02	103,346 a	0,774 a	1,76 a	14,032 a	0,214 b	3,38 a	7,579 b	10,666 a	245,111 a
N ₂											
DMS(1%)	0,233	-	7,290	0,068	0,10	1,197	0,020	0,09	0,703	0,426	10,838

1/ 25 e 45 dias após a germinação : média de 18 repetições
65 dias após a germinação : média de 24 repetições

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

que as plantas que haviam recebido a dose N_2 apresentaram maiores pesos de parte aérea de que N_1 e N_0 , respectivamente de 6,5% e 15%.

O peso das raízes também foi maior nas plantas que receberam nitrogênio. Quanto ao peso dos nódulos, verificou-se que o nitrogênio mineral prejudicou o início da nodulação, conforme já havia sido observado por ORCUTT e WILSON (1937), CARTWRIGHT (1967), TANNER e ANDERSON (1963) e OGHOGORIE e PATE (1971), GIBSON e PAGAN (1977). Aos 65 DAG, porém, observa-se que o menor peso de nódulos foi obtido nas plantas que não receberam nitrogênio. Isso provavelmente ocorreu porque a aplicação de nitrogênio na fase inicial pode ter prejudicado o início da nodulação, mas permitiu que a planta apresentasse um melhor desenvolvimento e maiores taxas fotossintéticas, correspondendo com o envio de maiores quantidades de carboidratos ao sistema radicular, resultando em um melhor desenvolvimento do sistema simbiótico.

Aos 45 DAG, as plantas que receberam N_2 apresentaram maior peso de matéria seca do que as plantas que receberam N_1 e N_0 , superando-as respectivamente em 10% e 23%.

Os teores de nitrogênio na parte aérea também foram aumentados pela aplicação de N e aos 65 DAG as plantas que receberam N_2 apresentaram teores de N 18% maiores do que as plantas que não receberam N. O teor de nitrogênio das raízes também foi maior nas plantas que receberam N, enquanto que o comportamento do teor de N dos nódulos foi semelhante ao do peso dos nódulos, isto é, aumentaram no final do ciclo.

Na Tabela 43 verifica-se que os maiores pesos de vagens, sementes e cascas de vagens foram obtidos nas plantas que receberam N_2 . As plantas que receberam N_2 apresentaram maior peso de vagens do que N_1 e N_0 , respectivamente de 18% e 39%, e maior peso de sementes, respectivamente de 22% e 43%. Quanto ao teor de N das sementes, N_2 superou N_1 e N_0 respectivamente em 23% e 44%.

Deste modo, confirmou-se as observações de diversos autores de que a aplicação de uma pequena dose inicial de nitrogênio pode ser muito favorável ao desenvolvimento inicial da planta hospedeira, diminuindo o

período inicial de deficiência de nitrogênio que se prolonga até o estabelecimento do sistema simbiótico (GIBSON, 1974). Em consequência disso, a planta corresponderá com o envio de maiores quantidades de fotossintatos aos nódulos, havendo um aumento nas taxas de fixação de nitrogênio (ORCUTT e WILSON, 1937; GUSS e DÖBEREINER, 1972; RUSCHEL e RUSCHEL, 1975; RUSCHEL e SAITO, 1977; RUSCHEL *et alii*, 1979).

Cabe ainda salientar que PHILLIPS *et alii* (1981) constataram que a limitação primária do sistema simbiótico no experimento desses autores foi o nitrogênio e não o carbono, podendo alterar os estudos sobre conservação de energia nos sistemas deficientes em N.

Verifica-se, na Tabela 44, que houve interação entre cultivar e estirpe, e o maior peso de parte aérea e da planta em todas as épocas, e peso de raízes aos 65 DAG ocorreu em Carioca x C-05 e Carioca x C-88. Aos 65 DAG, o peso de Carioca x C-88 superou o do sistema menos eficiente, Aroana x C-29, em 88%. A ordem de grandeza de peso dos nódulos variou entre os diversos sistemas durante o ciclo da planta, mas em nenhuma época houve relação com o teor de N total da planta.

Quanto ao teor de nitrogênio da parte aérea e de toda a planta, ele foi maior em Carioca x C-88 aos 25 e 45 DAG, enquanto que aos 65 DAG ocorreu em Carioca x C-05, o que provavelmente está relacionado com a maior persistência da fixação relacionada com a estirpe C-05, o que também foi verificado na cultivar Aroana. Os menores teores de N total foram encontrados em Carioca e Aroana inoculadas com C-29. Desse modo, pode-se dizer que, nas condições deste experimento, na inoculação com as estirpes mais eficientes, a cultivar de *P. vulgaris* foi a responsável pelas diferenças nos pesos e teores de nitrogênio. A estirpe menos eficiente, por outro lado, determinou as piores produções, independentemente da planta hospedeira.

O efeito da interação cultivar x dose de N pode ser visto na Tabela 45. Embora se observe que, no início do ciclo, a cultivar Carioca tenha sido mais favorecida pela aplicação de nitrogênio, apresentando maior peso de parte aérea e maior peso total, não se verifica diferenças

Tabela 44. Influência da interação cultivar x estirpe no peso de matéria seca (g/planta), ZN e N total (mg/planta), da parte aérea, raiz e nódulos e na matéria seca total e N total de duas cultivares de *Phaseolus vulgaris* inoculadas com três estirpes de *Rhizobium phaseoli*. Plantas coletadas aos 25, 45 e 65 dias após a germinação. 1/

Cultivar de <i>P. vulgaris</i>	Estirpe de <i>R. phaseoli</i>	parte aérea		raiz		nódulo		parte aérea + raiz + nódulos + vagens			
		M.S.	ZN	N total	M.S.	ZN	N total	M.S.	N total		
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 25 dias											
Carioca	C-05	3,537 a*	3,26 bc	119,130 b	0,388 c	2,06 c	7,952 d	0,142 cd	4,987 bc	4,137 b	132,085 b
	C-88(=SEMIA 487)	3,989 a	3,77 a	151,259 a	0,415 c	2,36 ab	9,581 cd	0,148 bc	3,38 c	5,098 bc	165,605 a
	C-29(=127 K-17)	2,792 b	3,07 c	85,308 d	0,436 c	2,47 a	10,583 bc	0,163 abc	3,23 d	5,288 b	101,082 de
Aroana	C-05	2,868 b	3,13 c	90,378 cd	0,384 c	2,53 a	9,657 cd	0,185 a	3,68 a	6,873 a	106,904 cd
	C-88(=SEMIA 487)	2,905 b	3,44 b	99,195 c	0,651 a	2,10 c	13,619 a	0,169 ab	3,37 c	5,735 b	118,550 c
	C-29(=127 K-17)	2,376 c	3,07 c	72,248 e	0,531 b	2,19 bc	11,732 b	0,123 d	3,54 b	4,955 c	88,335 e
DMS (1%)		0,488	0,24	12,745	0,083	0,22	1,808	0,024	0,05	0,826	12,938
DMS (5%)		-	-	-	-	-	-	-	-	0,383	-
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 45 dias											
Carioca	C-05	7,317 a	3,32 b	244,039 b	0,687	2,54 b	17,431	0,175 b	3,46 c	6,135 c	267,606 b
	C-88(=SEMIA 487)	7,451 a	3,84 a	287,133 a	0,760	2,71 a	20,656	0,197 ab	3,65 a	7,246 ab	315,035 a
	C-29(=127 K-17)	4,317 c	2,90 c	125,744 e	0,617	2,45 c	15,141	0,127 c	3,37 d	4,304 d	145,190 e
Aroana	C-05	5,575 b	3,17 b	176,660 d	0,611	2,57 b	15,701	0,208 a	3,55 b	7,460 a	199,820 d
	C-88(=SEMIA 487)	5,490 b	3,89 a	213,799 c	0,670	2,69 a	18,049	0,191 ab	3,33 d	6,401 bc	238,249 c
	C-29(=127 K-17)	4,193 c	2,33 d	97,898 f	0,550	2,22 d	12,434	0,123 c	3,09 e	3,944 d	114,280 f
DMS (1%)		0,431	0,24	20,290	-	0,05	-	0,028	0,07	1,042	20,564
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 65 dias											
Carioca	C-05	6,115 a	2,49 a	152,146 a	0,999 a	1,93	19,237 a	0,353 b	3,26 bc	11,545 b	318,701 a
	C-88(=SEMIA 487)	6,152 a	2,09 b	128,693 b	0,944 a	1,85	17,472 a	0,369 a	3,84 a	14,146 a	297,623 b
	C-29(=127 K-17)	4,061 c	1,74 d	70,532 d	0,709 b	1,73	12,272 b	0,150 c	2,78 d	4,188 d	159,435 d
Aroana	C-05	4,449 b	2,05 bc	91,419 c	0,617 b	1,57	9,661 c	0,200 b	3,32 b	6,769 c	206,599 c
	C-88(=SEMIA 487)	4,433 b	1,89 cd	83,366 c	0,658 b	1,48	9,773 c	0,169 bc	3,14 c	5,320 d	194,184 c
	C-29(= 127-K-17)	2,785 d	1,75 d	48,948 e	0,597 b	1,42	8,512 c	0,143 c	2,09 d	3,025 e	146,482 d
DMS (1%)		-	0,17	12,031	0,112	-	1,975	0,033	0,15	1,161	17,885
DMS (5%)		0,320	-	-	-	-	-	-	-	-	-

1/ 25 e 45 dias após a germinação : média de 9 repetições
65 dias após a germinação : média de 12 repetições

(*) Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível indicado.

la 45. Efeito da interação entre duas cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. e três doses de nitrogênio (0, 7 e 35 ppm de N) no peso de matéria seca (g/planta), $\bar{X}N$ e N total (mg/planta) da parte aérea, raiz e nódulos e no peso de matéria seca total e N total de plantas coletadas aos 25 e 45 e 65 dias após a germinação. ^{1/}

Cultivar de legar	Dose de N	parte aérea			raiz			nódulo			parte aérea + raiz + nódulo + vasos	
		M.S.	$\bar{X}N$	N total	M.S.	$\bar{X}N$	N total	M.S.	$\bar{X}N$	N total	M.S.	N total
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 25 dias												
oca	N ₀	3,126 b	3,29 ab	105,837 b	0,371 c	2,192 b	8,121 d	0,157 abc	3,56 b	5,591 b	3,653 bc	119,549 b
	N ₁	3,563 a	3,41 a	125,411 a	0,432 bc	2,129 b	9,262 c	0,154 bc	3,27 d	5,030 b	4,218 a	139,703 c
	N ₂	3,630 a	3,39 a	124,499 a	0,436 bc	2,464 a	10,750 a	0,144 bc	3,29 d	4,753 c	4,210 a	139,952 a
na	N ₀	2,340 c	3,39 a	79,109 c	0,555 a	2,297 ab	12,414 a	0,176 a	3,80 a	6,708 a	3,071 d	98,228 c
	N ₁	2,574 c	3,10 b	80,022 c	0,510 ab	2,430 a	12,154 ab	0,163 ab	3,38 c	5,516 b	3,247 c	97,692 c
	N ₂	3,234 ab	3,15 b	102,690 b	0,500 ab	2,098 b	10,439 bc	0,140 c	3,41 c	4,741 c	3,874 ab	117,869 b
	DMS (1%)	-	0,20	12,745	0,083	0,224	1,608	-	0,06	0,083	0,464	12,938
	DMS (5%)	0,403	-	-	-	-	-	0,020	-	-	-	-
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 45 dias												
oca	N ₀	5,741 c	3,18 bc	185,463 c	0,691 ab	2,51 bc	17,412 a	0,160 bc	3,90 a	6,262 a	6,591	209,137 c
	N ₁	6,225 b	3,39 ab	216,254 b	0,661 ab	2,53 b	16,788 ab	0,189 a	3,65 b	6,939 a	7,074	239,981 b
	N ₂	7,120 a	3,50 a	255,198 a	0,711 a	2,66 a	19,029 a	0,151 c	2,93 f	4,484 b	7,983	278,781 a
na	N ₀	4,798 d	3,06 c	149,667 d	0,539 c	2,40 d	13,149 c	0,185 ab	3,55 c	6,669 a	5,188	169,667 d
	N ₁	4,977 d	3,12 c	158,687 d	0,592 bc	2,46 cd	14,633 bc	0,181 ab	3,40 d	6,234 a	5,750	179,557 d
	N ₂	5,484 c	3,20 bc	179,802 c	0,701 a	2,62 a	18,402 a	0,157 bc	3,12 e	4,902 b	6,342	203,406 c
	DMS (1%)	0,431	0,24	20,290	0,105	0,06	2,680	-	0,07	1,042	-	20,564
	DMS (5%)	-	-	-	-	-	-	0,028	-	-	-	-
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 65 dias												
oca	N ₀	5,048	2,13 a	108,924	0,808	1,73	14,042 ab	0,274 b	2,88 d	8,297 c	9,955	231,681
	N ₁	5,459	2,18 a	121,427	0,921	1,82	16,640 ab	0,347 a	3,32 b	12,097 a	11,188	264,322
	N ₂	5,822	2,01 ab	121,020	0,923	1,95	18,099 a	0,252 b	3,68 a	9,487 b	12,193	279,757
na	N ₀	3,620	1,78 c	66,161	0,621	1,44	8,932 b	0,144 d	2,51 e	3,696 e	7,298	149,714
	N ₁	3,898	1,87 bc	73,439	0,627	1,45	9,116 b	0,193 c	2,95 cd	5,771 d	8,192	175,312
	N ₂	4,148	2,03 ab	84,133	0,624	1,58	9,897 ab	0,176 cd	3,08 c	5,668 d	9,139	207,947
	DMS (1%)	-	0,17	-	-	-	8,975	0,034	0,15	1,161	-	-

25 e 45 dias após a germinação: média de 9 repetições

65 dias após a germinação: média de 12 repetições

Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível indicado.

aos 65 DAG. Isso também foi constatado no peso das raízes. Quanto ao peso dos nódulos, embora inicialmente o N mineral tenha prejudicado a nodulação, observa-se aos 65 DAG que os maiores pesos foram encontrados nas plantas que receberam nitrogênio mineral.

O efeito da interação cultivar x N no teor de nitrogênio da planta foi semelhante ao efeito no peso de matéria seca, isto é, favoreceu o acúmulo inicial nas plantas que receberam N e não houve efeito aos 65 DAG no teor de N da parte aérea, raiz e N da planta toda.

O efeito da estirpe x N encontra-se na Tabela 46. Nota-se, aos 25 DAG, que a aplicação de N só prejudicou a massa nodular e teor de nitrogênio dos nódulos nas plantas inoculadas com a estirpe C-05, verificando-se que houve diferenças, entre as estirpes, na tolerância ao N mineral no início da nodulação. Quanto ao teor de N da parte aérea e da planta toda, verifica-se que nas plantas inoculadas com C-88 e C-29, não houve efeito da aplicação de nitrogênio, mas nas plantas inoculadas com C-05 houve um efeito favorável à aplicação do nitrogênio.

Observando-se o peso da parte aérea, aos 25 DAG, verifica-se que nas plantas inoculadas com C-05, a aplicação de N_1 e N_2 aumentou o peso da parte aérea respectivamente em 14% e 35%. Embora os valores não sejam estatisticamente diferentes, verifica-se que foi nessas plantas que houve a maior diferença no peso da parte aérea. Como foi visto, em todos os experimentos, a estirpe C-05, embora muito eficiente na fixação, sempre foi tardia na formação e funcionamento do aparato fixador de nitrogênio, provavelmente consumindo fotossintatos da planta, atrasando a entrega de compostos nitrogenados para a planta hospedeira e prolongando o período inicial de estresse da planta hospedeira. Desse modo, a aplicação de uma pequena dose de nitrogênio mineral, embora tenha prejudicado a nodulação, diminuiu consideravelmente a deficiência de nitrogênio nas plantas, aumentando o teor de N-total da planta em 46% pela aplicação de 35 ppm N_1 indicando que esse sistema estava sob um grande estresse de deficiência de N.

Aos 45 DAG, verifica-se que não houve efeito da aplicação de N na massa nodular, de modo que as plantas inoculadas com C-05 recupera

ela 46. Influência da interação entre três estirpes de *Rhizobium phaseoli* e três doses de nitrogênio (0, 7 e 35 ppm) no peso de matéria seca. (g/planta), %N e N total (mg/planta) da parte aérea, raiz e nódulos e na matéria seca total e N total de *Phaseolus vulgaris* coletados aos 25, 45 e 65 dias após a germinação. ^{1/}

tirpe de <i>phaseoli</i>	Dose de N	parte aérea			raiz			nódulo			parte aérea + raiz + nódulo + vagem	
		M.S.	ZN	N total	M.S.	ZN	N total	M.S.	ZN	N total	M.S.	N total
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 25 dias												
5	N ₀	2,749	2,98 c	81,335 c	0,389 de	2,38 a	9,290 bc	0,190 a	3,74 a	7,047 a	3,435 b	97,667 c
	N ₁	3,138	3,16 bc	104,273 b	0,344 e	2,28 ab	7,707 c	0,157 bc	3,59 b	5,653 b	4,403 a	117,633 b
	N ₂	3,721	3,45 ab	128,653 a	0,424 cde	2,23 ab	9,442 bc	0,148 bc	3,43 c	5,090 b	4,574 a	143,185 a
8 (=SEMIA 487)	N ₀	3,100	3,69 a	117,727 ab	0,600 a	2,06 b	12,348 a	0,169 ab	3,77 a	6,395 a	4,412 a	136,470 a
	N ₁	3,364	3,67 a	124,673 a	0,499 abcd	2,26 ab	11,300 ab	0,165 ab	3,19 d	5,290 b	4,574 a	141,293 a
	N ₂	3,876	3,44 ab	133,282 a	0,500 abc	2,27 ab	11,122 ab	0,142 bc	3,21 d	4,565 b	4,672 a	148,968 a
9 (= 127 K-17)	N ₀	2,349	3,34 b	78,357 c	0,401 cde	2,29 ab	9,165 bc	0,143 bc	3,54 b	5,007 b	3,113 b	92,528 c
	N ₁	2,704	2,94 c	79,203 c	0,571 ab	2,29 ab	13,088 a	0,152 bc	3,20 d	4,875 b	3,679 b	97,167 c
	N ₂	2,700	2,92 c	78,773 c	0,479 bcd	2,33 a	11,220 ab	0,135 c	3,42 c	4,587 b	3,383 b	94,578 c
	DMS (1%)	-	0,31	16,813	0,110	-	2,385	-	0,08	1,089	-	17,067
	DMS (5%)	-	-	-	-	0,25	-	0,026	-	-	0,613	-
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 45 dias												
5	N ₀	5,932 b	3,09	183,485 e	0,672 ab	2,51 c	16,827	0,196	3,84 a	7,517 a	7,584	207,828 e
	N ₁	6,406 b	3,24	207,940 de	0,621 bc	2,49 c	15,472	0,208	3,72 b	7,748 a	7,891	231,160 d
	N ₂	7,000 a	3,39	239,622 bc	0,654 b	2,66 b	17,400	0,173	2,96 f	5,128 bc	9,064	242,150 bc
8 (=SEMIA 487)	N ₀	5,815 c	3,72	215,648 cd	0,663 b	2,67 b	17,740	0,202	3,79 ab	7,643 a	7,393	241,032 cd
	N ₁	6,309 bc	3,94	249,135 b	0,678 ab	2,66 b	18,008	0,209	3,50 c	7,328 a	8,394	274,472 b
	N ₂	7,288 a	3,94	286,613 a	0,804 a	2,77 a	22,310	0,173	3,18 e	5,498 b	9,438	314,422 a
9 (=127 K-17)	N ₀	4,061 d	2,55	103,862 f	0,509 c	2,18 e	11,275	0,120	3,54 c	4,237 cd	4,797	119,378 f
	N ₁	4,087 d	2,57	105,337 f	0,580 bc	2,34 d	13,652	0,139	3,35 d	4,683 bc	4,939	123,672 f
	N ₂	4,618 d	2,73	126,265 b	0,661 f	2,49 c	16,437	0,118	2,94 f	3,453 d	5,448	146,155 f
	DMS (1%)	0,569	-	26,766	0,139	0,07	-	-	0,09	-	-	27,128
	DMS (5%)	-	-	-	-	-	-	-	-	1,155	-	-
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 65 dias												
5	N ₀	4,964 b	2,22 a	112,814	0,760 abc	1,70 ab	13,147	0,238 b	2,62 de	6,191 c	9,708 c	232,367 cd
	N ₁	5,245 b	2,25 a	120,612	0,841 a	1,69 ab	14,477	0,334 a	3,39 bc	11,346 a	10,869 b	265,218 b
	N ₂	5,637 a	2,33 a	131,921	0,823 a	1,86 a	15,725	0,259 b	3,86 a	9,971 ab	11,600 ab	290,367 a
8 (=SEMIA 487)	N ₀	4,798 b	2,02 b	96,531	0,776 ab	1,52 b	11,919	0,260 b	3,36 c	9,077 b	9,816 c	215,927 d
	N ₁	5,273 b	2,01 bc	107,286	0,797 a	1,64 b	13,489	0,309 a	3,52 bc	11,317 a	10,783 b	242,601 c
	N ₂	5,806 a	1,94 bcd	114,271	0,828 a	1,84 a	15,456	0,239 b	3,57 b	8,799 b	12,467 a	279,182 ab
9 (= 127 K-17)	N ₀	3,239 c	1,61 d	53,282	0,607 d	1,54 b	9,395	0,128 c	2,11 f	2,720 d	6,355 e	123,797 f
	N ₁	3,518 c	1,82 c	64,400	0,683 bc	1,59 b	10,967	0,167 c	2,48 e	4,137 d	7,419 d	151,634 e
	N ₂	3,513 c	1,78 d	61,537	0,669 cd	1,59 b	10,812	0,145 c	2,72 d	3,962 d	7,930 d	162,006 e
	DMS (1%)	0,507	-	-	-	-	-	0,044	0,20	1,528	0,925	-
	DMS (5%)	-	0,19	-	0,093	0,19	-	-	-	-	-	19,948

25 e 45 dias após a germinação : média de 6 repetições

65 dias após a germinação : média de 8 repetições

Valores seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível indicado.

ram-se do efeito depressivo da aplicação de N. Nas plantas com C-05 e C-88, houve um efeito favorável da aplicação de N, provavelmente porque, ao diminuir o período de estresse de nitrogênio da planta hospedeira, esta apresentou maior desenvolvimento da parte aérea, atingiu maiores taxas fotossintéticas, enviou mais carboidratos aos nódulos que responderam com maiores taxas de fixação de nitrogênio, favorecendo novamente o desenvolvimento da planta hospedeira.

Nas plantas inoculadas com C-29, porém, continuou a não ocorrer interação com o nitrogênio. Isso provavelmente ocorreu porque essa estirpe é ineficiente na utilização dos carboidratos da planta hospedeira no processo de fixação do N_2 . Isso fica mais evidente quando se observa em todos os experimentos, que o peso da parte aérea das plantas inoculadas com essa estirpe foi menor do que nas plantas inoculadas com as demais estirpes desde o período inicial do ciclo da planta. Deste modo, nessas plantas não houve resposta à aplicação de N provavelmente porque o principal fator limitante era nitrogênio.

Na Tabela 47, pode-se observar o efeito da interação estirpe x N na produção das vagens e sementes. Embora a aplicação de N tenha aumentado o peso das vagens, verifica-se que isso ocorreu pelo aumento do peso da casca da vagem e não pelo aumento do peso das sementes. Estatisticamente não houve incremento pela aplicação de N, embora tenham sido verificados aumentos em C-05, C-88 e C-29, pela aplicação de N_2 , respectivamente de 39%, 43% e 52%. Voltando-se à Tabela 46, porém, verifica-se que o efeito favorável do nitrogênio mineral no aumento do teor de N total da planta também está altamente relacionado com o nitrogênio da vagem, uma vez que não houve diferença no teor de N da parte aérea e das raízes.

Na Tabela 47 pode-se verificar também que não houve efeito da interação cultivar x N na produção e teor de N das sementes.

Por outro lado, a interação cultivar x estirpe proporcionou a maior produção e teor de N nos sistemas Carioca x C-88 e Carioca x C-05. O sistema mais eficiente, Carioca x C-88 apresentou teor de N total da semente 94% superior ao do sistema menos eficiente, Aroana x C-29. Deste mo

Tabela 47. Influência das interações: cultivar de *Phaseolus vulgaris* x estirpe de *Rhizobium phaseoli*; cultivar de *P. vulgaris* x dose de nitrogênio e estirpe de *R. phaseoli* x dose de nitrogênio na produção de matéria seca (g/planta) da vagem, semente e da casca da vagem. Plantas coletadas aos 65 dias após a germinação. Média de 12 repetições.

Cultivar de <i>P. vulgaris</i>	Estirpe de <i>R. phaseoli</i>	M.S. da vagem	semente			casca da vagem		
			M.S.	%N	N total	M.S.	%N	N total
Carioca	C-05	4,947 b*	3,947 a	3,20	126,514 a	1,000 a	0,98 a	9,534 a
	C-88 (= SEMIA 487)	5,580 a	4,397 a	2,91	128,052 a	1,183 a	0,81 ab	9,562 a
	C-29 (= 127 K-17)	2,953 d	2,259 cd	3,00	67,630 c	0,695 b	0,89 ab	5,812 b
Aroana	C-05	3,845 c	2,714 bc	3,26	87,644 b	1,031 a	1,09 a	11,082 a
	C-88 (= SEMIA 487)	3,740 c	2,818 b	3,18	89,838 b	0,923 ab	0,66 b	5,891 b
	C-29 (= 127 K-17)	3,073 d	2,150 d	3,10	65,867 c	0,923 ab	0,64 b	5,838 b
	DMS (1%)	0,512	0,473	-	14,807	0,274	0,28	1,921
Cultivar de <i>P. vulgaris</i>	Dose de Nitrogênio **							
Carioca	N ₀	3,825	3,049	3,06	91,957	0,776	1,14 a	8,462 ab
	N ₁	4,459	3,419	3,05	103,946	1,040	0,95 ab	10,013 a
	N ₂	5,196	4,135	3,00	125,293	1,061	0,56 c	6,134 cd
Aroana	N ₀	2,914	2,027	3,18	64,863	0,886	0,67 bc	6,062 d
	N ₁	3,475	2,527	3,10	78,265	0,947	0,92 ab	8,722 ab
	N ₂	4,171	3,128	3,20	100,222	1,043	0,79 bc	8,027 bc
	DMS (1%)	-	-	-	-	-	0,28	1,921
Estirpe de <i>R. phaseoli</i>	Dose de Nitrogênio							
C-05	N ₀	3,745 d	2,802	3,24	90,224	0,943 bc	1,10 ab	9,991 b
	N ₁	4,450 bc	3,337	3,17	105,506	1,113 ab	1,22 a	13,275 a
	N ₂	4,843 b	3,853	3,27	125,507	0,990 abc	0,78 bc	7,657 bc
C-88 (= SEMIA 487)	N ₀	3,982 cd	3,124	3,00	92,605	0,858 bc	0,69 c	5,795 c
	N ₁	4,404 bc	3,393	3,01	101,512	1,010 ab	0,88 abc	8,996 b
	N ₂	5,595 a	4,305	3,11	132,717	1,290 a	0,62 c	7,939 bc
C-29 (= 127 K-17)	N ₀	2,381 f	1,688	3,11	52,401	0,693 c	0,94 abc	5,999 c
	N ₁	3,047 e	2,188	3,03	66,297	0,859 bc	0,70 c	5,831 c
	N ₂	3,612 de	2,737	2,93	80,047	0,875 bc	0,65 c	5,646 c
	DMS (1%)	-	-	-	-	0,306	0,37	2,528
	DMS (5%)	0,571	-	-	-	-	-	-

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

**) N₀ = 0 ppm; N₁ = 7 ppm e N₂ = 35 ppm.

do, fica mais uma vez evidente a necessidade de se realizar a seleção de plantas hospedeiras e estirpes de bactéria conjuntamente, dado ao alto grau de interação entre eles, como já observou ELKAN *et alii* (1981).

Podemos ver, na Tabela 48, que a aplicação de N não alterou a ER dos sistemas. As maiores ER foram obtidas na cultivar Carioca. Quanto às estirpes, a maior ER ocorreu em C-88 e a estirpe menos eficiente foi a C-29. Nas plantas inoculadas com C-05, a nitrogenase permaneceu com a maior atividade até o final do ciclo, podendo explicar as taxas mais elevadas de acúmulo de N nas plantas inoculadas com C-05, durante o período de 45-65 DAG.

Em relação às cultivares e às estirpes, as ER mais elevadas corresponderam aos maiores teores de N. Verifica-se, porém, que as diferenças nos teores de nitrogênio da parte aérea e da planta sob a aplicação de N mineral foram relacionadas com a maior eficiência respiratória em presença de nitrogênio, e não com a maior ER do sistema.

Desse modo, houve pouca variação nas taxas de evolução do CO_2 pelas raízes noduladas para um determinado sistema cultivar x estirpe. Como as taxas de acúmulo de N nas plantas que receberam uma dose inicial de nitrogênio foram mais elevadas, o gasto respiratório por unidade de N acumulado foi menor nas plantas que receberam N mineral. A maior eficiência respiratória está de acordo com os trabalhos de RYLE *et alii* (1979a, 1979b), MINCHIN *et alii* (1981b), NEVES *et alii* (1981).

PHILLIPS *et alii* (1981) verificaram que, ao contrário do que foi obtido por diversos autores (HARDY e HAVELKA, 1975) a principal limitação da fixação do nitrogênio não foi o carbono, mas sim o nitrogênio, visto que a fertilização com CO_2 permitiu incrementos de no máximo 64%, enquanto que a colocação de pequenas doses iniciais de N permitiu um incremento de 251%, no peso seco.

Neste experimento, pode-se tentar correlacionar os resultados obtidos com as conclusões de PHILLIPS *et alii* (1981) e de HARDY e HAVELKA (1976). Deste modo, nas plantas inoculadas com a estirpe C-05, o

Tabela 48 - Valores da atividade da nitrogenase (redução do C_2H_2), evolução do H_2 e evolução do CO_2 pelas raízes noduladas de duas cultivares de P. vulgaris inoculadas com três estirpes de R. phaseoli e sob três níveis de N (0, 7 e 35 ppm) aos 25, 45 e 65 dias após a germinação. .152.

Cultivar de <u>P. vulgaris</u>	Estirpe de <u>R. phaseoli</u>	Dose de N	^a Redução do C ₂ H ₂	^b Evolução do H ₂	E.R.	^b Evolução do CO ₂
			$\mu\text{moles.pl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$			
Época de amostragem - 25 dias						
Carioca	C-05	N ₀	24,30	4,86	0,80	70,22
		N ₁	23,80	4,78	0,80	65,41
		N ₂	23,38	4,91	0,79	50,26
	C-88 (SEMIA 487)	N ₀	26,13	3,92	0,85	52,81
		N ₁	28,21	3,95	0,86	50,69
		N ₂	26,27	3,94	0,85	49,83
	C-29 (127 K-17)	N ₀	18,36	5,51	0,70	77,65
		N ₁	18,73	5,62	0,69	78,92
		N ₂	18,00	5,40	0,70	77,65
Aroana	C-05	N ₀	25,09	5,52	0,78	85,82
		N ₁	24,17	5,56	0,77	80,20
		N ₂	25,36	5,58	0,78	77,73
	C-88	N ₀	22,50	4,50	0,80	55,52
		N ₁	22,63	4,30	0,81	53,16
		N ₂	23,60	4,72	0,80	50,14
	C-29	N ₀	16,46	5,27	0,68	88,66
		N ₁	17,56	5,62	0,68	86,92
		N ₂	18,70	5,80	0,69	80,41
Época de amostragem - 45 dias						
Carioca	C-05	N ₀	32,30	6,46	0,80	91,20
		N ₁	30,76	6,46	0,79	70,30
		N ₂	41,80	8,36	0,80	64,46
	C-88	N ₀	29,13	4,37	0,85	79,80
		N ₁	26,12	4,18	0,84	76,00
		N ₂	26,60	3,99	0,85	52,80
	C-29	N ₀	13,65	4,37	0,68	138,70
		N ₁	14,25	4,56	0,68	127,30
		N ₂	17,77	5,51	0,69	100,70

..... continua

Cultivar de <u>P. vulgaris</u>	Estirpe de <u>R. phaseoli</u>	Dose de N	^a	^b	E.R.	^b
			Redução do C ₂ H ₂	Evolução do H ₂		Evolução do CO ₂
μmoles.pl ⁻¹ . h ⁻¹						
Aroana	C-05	N ₀	41,45	9,12	0,78	91,20
		N ₁	44,90	9,88	0,78	76,00
		N ₂	42,95	9,88	0,77	70,00
	C-88	N ₀	15,20	3,04	0,80	77,90
		N ₁	18,05	3,61	0,80	70,30
		N ₂	19,00	3,99	0,79	66,50
	C-29	N ₀	4,68	1,64	0,65	155,80
		N ₁	5,58	1,80	0,66	150,10
		N ₂	6,14	2,09	0,66	110,20

Época de amostragem - 65 dias

Carioca	C-05	N_0	7,18	2,70	0,62	241,30
		N_1	9,18	3,40	0,63	218,50
		N_2	13,75	5,50	0,60	191,90
	C-88	N_0	1,25	0,50	0,60	182,00
		N_1	2,25	0,90	0,60	167,20
		N_2	2,25	0,90	0,60	117,00
	C-29	N_0	2,45	1,30	0,47	279,30
		N_1	3,58	1,90	0,47	275,50
		N_2	4,54	2,50	0,45	237,50
Aroana	C-05	N_0	2,29	1,10	0,52	260,30
		N_1	3,19	1,50	0,53	252,70
		N_2	7,65	3,60	0,53	228,00
	C-88	N_0	1,82	-	-	241,80
		N_1	1,00	0,30	0,70	245,00
		N_2	1,76	-	-	198,16
	C-29	N_0	1,21	0,70	0,42	406,80
		N_1	1,45	0,80	0,45	355,30
		N_2	1,50	0,90	0,40	359,10

a....., redução do C_2H_2 por cromatografia gasosa de ionização de chama.

b..... aos 25 DAG o H_2 e o CO_2 foram analisados por condutividade térmica e aos 45 e 65 DAG foram analisados por espectrometria de massa.

efeito limitante foi o nitrogênio. Isso ocorre porque, como já foi visto neste experimento e nos anteriores, esta estirpe é bastante eficiente na utilização dos carboidratos da planta hospedeira, apresentando baixa relação C respirado : N_2 fixado e alta eficiência relativa dos elétrons destinados à nitrogenase, mas ela é tardia no início da fixação de nitrogênio. Isso acentua a deficiência inicial de nitrogênio da planta hospedeira, cujo crescimento só será favorecido um pouco mais tardiamente, quando ocorrerem as altas taxas de fixação características dessa estirpe. A aplicação de uma pequena dose de N mineral nessas plantas pode diminuir esse estresse de nitrogênio inicial e, embora tivesse prejudicado a formação dos nódulos, estes logo se recuperaram e iniciaram a fixação de N_2 . Assim, o crescimento e o acúmulo de N nessas plantas foi favorecido, havendo um efeito adicional de N mineral + N da fixação, equiparando-se às plantas inoculadas com C-88, que se caracterizou por ser uma estirpe hup⁺ de alta eficiência na fixação.

A estirpe C-29, por outro lado, mostrou-se, neste e nos outros experimentos, como ineficiente na fixação, com alta relação C-respirado : N fixado e baixa eficiência relativa (ER). Deste modo, essa estirpe consome carboidratos da planta e utiliza ineficientemente a energia obtida pela oxidação dos carboidratos. Essas plantas não responderam à aplicação de N porque o fator limitante nesses sistemas foi o C e não o N.

4.5. Discussão geral

Em todos os experimentos verificou-se o efeito da cultivar de *P. vulgaris* e da estirpe de *R. phaseoli* no peso de matéria seca e no teor de nitrogênio da planta.

A cultivar Carioca, que possui hábito de crescimento do tipo indeterminado 3, prostrado com tendência a trepador, apresentou maior peso de matéria seca e maiores taxas de fixação de nitrogênio do que as demais cultivares, Moruna, Aroana, Venezuela-350 e Tibagi, que possuem hábito de crescimento do tipo 2, prostrado. Isso vai de acordo com as observações de GRAHAM e ROSAS (1977) e GRAHAM e HALLIDAY (1977) de que, embora as

quantidades de carboidratos no sistema radicular de feijoeiro de hbito trepador e de hbito prostrado possam ser semelhantes, os primeiros mantêm maior proporção de seus carboidratos na forma solúvel, que é prontamente disponível aos nódulos, aumentando as taxas de fixação do N_2 .

Essa teoria sô não foi totalmente válida no experimento I, onde não houve diferença no peso e teor de nitrogênio da parte aérea entre as cultivares Carioca e Moruna. Ao se comparar os dados sobre essas duas cultivares no experimento III (conduzido em vasos de plástico), com os do experimento I (vaso de Leonard), percebe-se que as condições do experimento I parecem ter limitado o crescimento da cultivar Carioca, particularmente do seu sistema radicular.

As cultivares mais eficientes no acúmulo de matéria seca nas partes vegetativas e reprodutivas também apresentaram os maiores teores de nitrogênio.

O comportamento das cultivares no acúmulo de matéria seca e nitrogênio na planta foi nos quatro experimento:

I. Carioca = Moruna > Aroana = Venezuela-350 = Rio Tibagi.

II. Carioca > Venezuela-350

III. Carioca > Moruna = Aroana > Venezuela-350

IV. Carioca > Aroana.

Verificou-se também um efeito da cultivar na produção e teor de nitrogênio das vagens e sementes. Também foi observado o efeito da cultivar na mobilização de carboidratos e nitrogênio destinados à formação das partes reprodutivas.

A estirpe de *Rhizobium phaseoli* influenciou os parâmetros de peso da matéria seca e teor de N da planta, e o comportamento das estirpes nos experimentos foi:

I. C-05 (hup⁻) > C-29 (hup⁻)

- II. C-88 (hup^+) > C-05 (hup^-) > C-29 (hup^-)
 III. C-05 (hup^-) > C-40 (hup^+) > C-89 (hup^-)
 IV. C-88 (hup^+) = C-05 (hup^-) > C-29 (hup^-)

Procurou-se relacionar a presença de hidrogenase ativa nas bactérias (que oxida o H_2 evoluído pela nitrogenase, produzindo ATP) com a eficiência das estirpes, pois diversos autores verificaram que as maiores produções e as maiores taxas de fixação de nitrogênio ocorriam nas estirpes que possuíam essa enzima.

No experimento I, verificou-se que pode haver grandes diferenças na eficiência de fixação de N_2 entre estirpes hup^- , pois, C-05 acumulou mais nitrogênio na parte aérea do que C-29, aos 45 DAG.

No experimento II, a estirpe hup^+ apresentou maior produção de matéria seca e fixação de nitrogênio, do que as estirpes hup^- , e no experimento III, porém, embora a estirpe hup^+ fosse mais eficiente na primeira fase do ciclo da planta, e estirpe C-05, hup^- , mas que já havia apresentado boa eficiência nos demais experimentos, superou a estirpe hup^+ .

Sugeriu-se que isso poderia ter ocorrido pelas seguintes razões:

- a. O meio de MAIER *et alii* (1978) usado para detectar a presença de hidrogenase ativa não foi adequado.
- b. Embora existam estirpes hup^+ e hup^- , já foi verificada uma escala de eficiência entre esses dois grupos conforme se verifica pelos trabalhos de RUIZ-ARGÜESO *et alii* (1978) e SAITO *et alii* (1980a).
- c. A planta hospedeira pode induzir a atividade da hidrogenase, conforme foi verificada por DIXON (1972), GIBSON *et alii* (1981), KEYNES *et alii* (1981).
- d. A existência da hup^+ pode não estar relacionada com maiores produções, conforme foi verificado por GIBSON *et alii* (1981) e RAINBIRD *et alii* (1981).

Verificou-se também que a eficiência dos nódulos na fixação de nitrogênio pode variar com a planta hospedeira e com a estirpe de bactéria. A estirpe C-29 produziu maior peso de nódulos mas as menores taxas de fixação de nitrogênio, mostrando que os nódulos foram ineficientes. Isso, porém, não foi encontrado no experimento I, o que pode estar relacionado ao fato de que o experimento I foi conduzido sob condições diferentes dos demais, em vaso de Leonard, o que pode ter impedido o aparecimento de uma população secundária de nódulos.

Verificou-se o efeito da interação cultivar x estirpe em todos os parâmetros de matéria seca e nitrogênio na planta, o que indica que não se pode realizar a seleção de estirpes e cultivares isoladamente, conforme foi salientado por ELKAN *et alii* (1981).

No início do ciclo da planta, a estirpe de bactéria parece desempenhar o papel principal na determinação dos sistemas simbióticos mais eficientes, mas a partir de um determinado estágio de crescimento a cultivar passa a desempenhar o principal papel. O efeito da estirpe geralmente só é verificado nas cultivares mais produtivas.

Verificou-se o efeito da cultivar da estirpe e da interação cultivar x estirpe na redução do C_2H_2 , evolução do H_2 e Eficiência Relativa dos elétrons destinados à nitrogenase (ER). A ER apresentou uma relação positiva com o peso e teor de nitrogênio das plantas em todos os experimentos.

A estirpe C-05, embora hup^- , caracterizou-se por apresentar uma ER elevada, particularmente a partir da época de maior taxa fotossintética, quando a sua ER foi igual ou mesmo superior à da estirpe C-88, hup^+ eficiente. Atribuiu-se isso a que, na fase de maior disponibilidade de carboidratos, a enzima hidrogenase tem a sua atividade reduzida, e a maior atividade da nitrogenase em C-05 permitiu uma equiparação das eficiências relativas.

Observou-se que, mesmo nas estirpes hup^+ , houve evolução do H_2 , e a máxima ER obtida foi de 0,89. Isso pode ser atribuído as observações feitas por RUIZ-ARGÜESO *et alii* (1978), de que nem sempre a hidrogena

se consegue reciclar o H_2 produzido, o que pode ocorrer devido à quantidade limitada de enzimas deficiência no metabolismo do H_2 ou morfologia dos nódulos, permitindo a rápida evolução do H_2 e diminuindo a quantidade de substrato para a enzima.

A técnica da redução do C_2H_2 não foi adequada para avaliar a fixação do N_2 , pois caso não se fizesse a análise da evolução do H_2 poderia ter ocorrido um erro de até 56% na interpretação dos resultados.

Verificou-se, também, que há variação entre cultivares e entre estirpes, na eficiência respiratória associada à fixação de nitrogênio tanto das raízes noduladas como dos nódulos destacados.

Observou-se que a eficiência respiratória foi relacionada positivamente com a ER dos sistemas.

A adição de pequenas doses de N (7 e 35 ppm) favoreceram o acúmulo de N e matéria seca. Houve interação cultivar x N, embora esse efeito não fosse verificado nos estágios finais do ciclo da planta.

A interação estirpe x N mostrou que, nas estirpes eficientes na fixação do N_2 , mas que são mais tardias no funcionamento dos nódulos, a aplicação de N diminui a deficiência de nitrogênio inicial da planta hospedeira, favorecendo o desenvolvimento das plantas. Nesses sistemas simbióticos, o fator limitante inicial é o N, o que concorda com os resultados obtidos por PHILLIPS *et alii* (1981).

Nas plantas inoculadas com estirpes ineficientes na utilização de carboidratos da planta hospedeira, com altas taxas de evolução do H_2 e baixa eficiência respiratória, não há resposta à aplicação de N nas etapas iniciais do ciclo da planta.

Nestes sistemas simbióticos o fator limitante é o carbono, conforme foi observado por HARDY e HAVELKA (1976).

A aplicação de nitrogênio mineral aumentou os teores de nitrogênio pela absorção direta desse elemento e por aumentar a eficiência respiratória, o que está de acordo com os resultados de MINCHIN *et alii*

(1981b)e NEVES *et alii* (1981).

A aplicação de N mineral não alterou a ER dos sistemas. O efeito prejudicial do nitrogênio mineral no início da nodulação variou segundo a estirpe de bactéria.

Na Figura 28, pode-se verificar o efeito favorável da inoculação, comparando-se a cultivar Carioca inoculada com C-88 e uma planta que recebeu apenas 7 ppm de N na semeadura.

Na Figura 29, verifica-se o efeito da estirpe, tendo a cultivar Carioca, inoculada com C-88, C-05 e C-29.

Figura 28. À esquerda, cultivar Carioca inoculada com a estirpe C-88, e à direita a mesma cultivar sem inoculação e que recebeu 7 ppm de N na época do plantio.

Figura 29. Cultivar Carioca inoculada com três estirpes de *R. phaseoli*, da esquerda para a direita, C-88 (hup⁺), C-05 (hup⁻) e C-29 (hup⁻)

5. CONCLUSÕES

- a. Verificou-se o efeito da cultivar de *Phaseolus vulgaris*, da estirpe de *Rhizobium phaseoli* e da interação cultivar x estirpe no peso e teor de nitrogênio da parte aérea, raiz, nódulos, vagens e sementes, bem como na atividade da nitrogenase (redução do C_2H_2) evolução do H_2 e eficiência relativa (ER) dos elétrons destinados à nitrogenase.
- b. A detecção, em meio de cultura, da atividade da hidrogenase independente de ATP (hup^+) na estirpe de *Rhizobium* não implicou, necessariamente, na maior capacidade de fixação de nitrogênio por essa bactéria.
- c. A enzima hidrogenase (hup^+) das estirpes de *Rhizobium phaseoli* estudadas não foi capaz de reciclar todo o hidrogênio produzido pela nitrogenase.

- d. A ER dentro de cultivares e a ER dentro de estirpes sempre apresentaram uma relação positiva com o peso e teor de nitrogênio das plantas.
- e. O método de avaliação da atividade da nitrogenase por cromatografia gasosa através da redução do C_2H_2 não foi relacionado com o teor de nitrogênio fixado, fato este atribuído ao desvio de elétrons para a evolução do H_2 .
- f. Não houve relação do peso de nódulos com a atividade de nitrogenase (taxa de redução de C_2H_2) nem com o teor de nitrogênio da planta, observando-se grande variação na eficiência nodular entre cultivares e entre estirpes.
- g. A eficiência respiratória ($mg\ CO_2 \cdot mg\ N\ fixado^{-1}$) das raízes noduladas e dos nódulos destacados foi relacionada positivamente com o peso e teor de nitrogênio das plantas e com a ER da nitrogenase.
- h. O melhor desempenho das estirpes C-88 = SEMIA 487 e C-05 na capacidade de acumular N, através da simbiose com o feijoeiro e da cultivar Carioca foi relacionado com a maior ER e maior eficiência respiratória dos nódulos e raízes noduladas.
- i. A aplicação de pequenas doses iniciais de nitrogênio mineral (7 e 35 ppm de N como KNO_3) favoreceu o acúmulo de matéria seca e de nitrogênio na planta.
- j. Nas plantas inoculadas com a estirpe C-05 (energéticamente eficiente na fixação do nitrogênio, porém tardia para atingir o pico máximo de fixação de nitrogênio) o fator limitante para o crescimento foi o nitrogênio.

nio mineral. Nas plantas inoculadas com a estirpe C-29 (ineficiente na fixação do nitrogênio, com baixa ER e baixa eficiência respiratória) o fator limitante para o crescimento provavelmente foi o carbono.

6. LITERATURA CITADA

- ADAMS, M.W., J.V. WIERMSA e J. SALAZAR, 1978. Differences in starch accumulation among dry bean cultivars. *Crop Sci.* 18: 155-157.
- ALBRECHT, S.L., R.J. MAIER, F.H. HANUS, S.A. RUSSELL, D.W. EMERICH e H.J. EVANS, 1979. Hydrogenase in *Rhizobium japonicum* increases nitrogen fixation by nodulated soybeans. *Science* 203: 1255-1257.
- ANDREW, C.S., 1977. Legumes and acid soils. In: DÖBEREINER, J., R.H. BURRIS e A. HOLLAENDER (eds.). *Symposium on the limitations and potentials of biological nitrogen fixation in tropics*. New York, Plenum Press. p. 135-160.
- ANÔNIMO, 1980. *Anuário Estatístico do Brasil*. F.I.B.G.E., Rio de Janeiro. p. 354.
- ATKINS, C.A., D.F. HERRIDGE e J.S. PATE, 1978. The economy of carbon and nitrogen in nitrogen fixing annual legumes - experimental observations and theoretical considerations. In: IAEA. *Isotopes in Biological Dinitrogen fixation*. Vienna p. 211-242.
- BALANDREAU, J. e Y. DOMMERGUES, 1973. Assaying nitrogenase (C_2H_2) activity in the field. *Bull. Ecol. Res. Comm.* Estocolmo. 17: 247-254.
- BALANDREAU, J. e P. DUCERF, 1978. Activite nitrogenasique (C_2H_2) in situ: measure, analyse des facteurs limitants, comparaisons de systemes fixateurs d'azote. In: IAEA. *Isotopes in Biological Dinitrogen Fixation*. Vienna. p. 173-190.

- BERGERSEN, F.J., 1963. The relationship between hydrogen evolution, hydrogen exchange, nitrogen fixation and applied oxygen tension in soybean root nodules. *Aust. J. Biol. Sci.* 16: 669-680.
- BERGERSEN, F.J., 1967. Some properties of nitrogen fixing bries prepared from soybean root nodules. *Biochim. biophys. Acta.* 130: 304-312.
- BERGERSEN, F.J., 1970. The quantitative relationship between nitrogen fixation and the acetylene reduction assay. *Aust. J. Biol. Sci.* 23: 1015-1025.
- BETHLENFALVAY, G.J., S.S. ABU-SHAKRA e D.A. PHILLIPS, 1978a.
Interdependence of nitrogen nutrition and photosynthesis in *Pisum sativum* L. I - Effect of combined nitrogen on symbiotic nitrogen fixation and photosynthesis. *Plant Physiol.* 62: 127-130.
- BETHLENFALVAY, G.J., S.S. ABU-SHAKRA e D.A. PHILLIPS, 1978b.
Interdependence of nitrogen nutrition and photosynthesis in *Pisum sativum* L. II - Host plant response to nitrogen fixation by *Rhizobium* strains. *Plant Physiol.* 62: 131-133.
- BETHLENFALVAY, G.J. e D.A. PHILLIPS, 1977. Photosynthesis and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L. In: HOLLAENDER, A. *Genetic engineering for nitrogen fixation*. New York, Plenum Press. p. 401-409.
- BETHLENFALVAY, G.J. e D.A. PHILLIPS, 1979. Variation in nitrogenase and hydrogenase activity of Alaska pea root nodules. *Plant Physiol.* 63: 816-820.
- BODDEY, R.M., 1980a. The acetylene reduction technique. *Curso Intensivo sobre fixação biológica do nitrogênio*. EMBRAPA - PFBN. Rio de Janeiro. 14 p. mimeo.
- BODDEY, R.M., 1980b. Gas chromatography for the soil microbiologist. *Curso intensivo sobre fixação biológica do nitrogênio*. EMBRAPA - PFBN. Rio de Janeiro. 26 p. mimeo.
- BOND, G., 1941. Symbiosis of leguminous plants and nodule bacteria. I - Observations on respiration and on the extent of utilization. *Ann. Bot.* 5: 313-337.
- BRILL, W.J., 1977. Biological nitrogen fixation. *Scientific America.* 236(3): 68-74.

- BRILL, W.J., 1979. Nitrogen fixation: basic to applied. *American Scientist*. 67: 458-466.
- BULEN, W.A., R.C. BURNS e J.R. Le COMTE, 1965. Nitrogen fixation: hydrosulfite as electron donor with cell-free preparations of *Azotobacter vinelandii* and *Rhodospirillum rubrum*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 53: 532-539.
- BURNS, R.C., 1969. The nitrogenase system from *Azotobacter*: activating energy and divalent cation requirement. *Biochem. biophys. Acta*. 171: 253-259.
- BURNS, R.C. e R.W.F. HARDY, 1975. *Nitrogen fixation in bacteria and higher plants*. Berlin. Springer-Verlag. 189 p.
- BURRIS, R.H., 1966. Biological nitrogen fixation. *Ann. Rev. of Plant Physiol*. 10: 587-618.
- BURRIS, R.H., 1974a. Biological nitrogen fixation, 1924-1974. *Plant Physiol*. 54: 443-449.
- BURRIS, R.H., 1974b. Methodology. In: QUISPÉL, A. (ed.). *The biology of nitrogen fixation*. Amsterdam. North Holl. Publ. Co. p. 9-33.
- BURRIS, R.H., 1975. The acetylene-reduction technique. In: STEWART, W. D.P. (ed.). *Nitrogen fixation by free-living micro-organisms*. Cambridge. Cambridge Univ. Press. p. 245-258.
- BURRIS, R.H., 1979. Inhibition. In: HARDY, R.W.F., F. BOTTOMLEY e R.C. BURNS (eds.). *A treatise on dinitrogen fixation*. Sections I and II. New York. John Wiley. p. 569-604.
- BURRIS, R.H., D.J. ARP, R.V. HAGEMAN, J.P. HOUGHINS, W.J. SWEET e MAN-XIN TSO, 1981. Mechanism of nitrogenase action. In: GIBSON, A.H. e W.E. NEWTON (eds.). *Current perspectives in nitrogen fixation*. Proceedings of the Fourth Intern. Symp. on Nitrogen Fixation. Canberra. Australia, Academy of Sciences. p. 56-66.
- BURRIS, R.H. e P.W. WILSON, 1957. Methods for measurement of nitrogen fixation. In: COLOWICK, S.P. e N.O. KAPLAN (eds.). *Methods in Enzymology*. New York. Academic Press. p. 335-367.
- BURTON, J.C., O.N. ALLEN e K.C. BERGER, 1954. Response of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to inoculation with mixtures of effective and ineffective rhizobia. *Proc. Soil Sci. Soc. Amer.* 18: 156-159.
- CAMARGO, O.A., 1971. Contribuição ao estudo do ar do solo. ESALQ-USP, Piracicaba, 61 p. (Dissertação de Mestrado).

- CAMPBELL, M.E.R., R. DULAR, H. LEES e K.G. STANDING, 1967. The production of $^{13}\text{N}_2$ by 50 Mev protons for use in biological nitrogen fixation. *Can. J. Microbiol.* 13: 587-599.
- CARNAHAN, J.E., L.E. MORTENSON, H.F. MOWER e J.E. CASTLE, 1960. Nitrogen fixation in cell-free extracts of *Clostridium pasteurianum*. *Biochim. biophys. Acta.* 44: 1520-1535.
- CARTER, K.R., N.T. JENNINGS, J. HANUS e H.J. EVANS, 1978. Hydrogen evolution and uptake by nodules of soybeans inoculated with different strains of *Rhizobium japonicum*. *Can. J. Microbiol.* 24: 307-311.
- CARTWRIGHT, P.M., 1967. The effect of combined nitrogen on the growth and inoculation of excised roots of *Phaseolus vulgaris* L. *Ann. Bot.* 31: 309-321.
- CASSINI, S.T.A., 1980. Atividade bacteriocinogênica e capacidade competitiva entre estirpes de *Rhizobium phaseoli*. Piracicaba, ESALQ/USP, 113 p. (Dissertação de Mestrado).
- CHING, T.M., S. HEDTKE, S.A. RUSSELL e H.J. EVANS, 1975. Energy state and dinitrogen fixation in soybean nodules of dark-grown plants. *Plant. Physiol.* 55: 796-798.
- COBRA NETO, A., 1967. Absorção e deficiências dos macronutrientes pelo feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L., var. roxinho). Piracicaba, ESALQ/USP. 67 p. (Tese de Doutorado)
- DATE, R.A., 1976. Principles of *Rhizobium* strain selection. In: NUTMAN, P.S. (ed.). *Symbiotic nitrogen fixation in plants*. Cambridge. Cambridge Univ. Press. p. 137-150.
- De BONT, J.A.M. e E.G. MULDER, 1974. Nitrogen fixation and co-oxidation of ethylene by a methane - utilizing bacterium. *J. Gen. Microbiol.* 83: 113-121.
- DILWORTH, M.J., 1966. Acetylene reduction by nitrogen-fixing preparations from *Clostridium pasteurianum*. *Biochim. Biophys. Acta.* 127: 285-294.
- DIXON, R.O.D., 1967. Hydrogen uptake and exchange by pea root nodules. *Ann. Bot.* 31: 179-188.
- DIXON, R.O.D., 1968. Hydrogenase in pea root nodule bacteroids. *Arch. Mikrobiol.* 62: 272-283.
- DIXON, R.O.D., 1972. Hydrogen in legume root nodule bacteroids: occurrence and properties. *Arch. Mikrobiol.* 85: 193-201.

- DIXON, R.O.D., 1975. Relationships between nitrogenase systems and ATP-yielding processes. In: STEWART, W.D.P. (ed.). *Nitrogen fixation by free-living micro-organisms*. Cambridge. Cambridge Univ. Press. p.421-435.
- DIXON, R.O.D., 1976. Hydrogenases and efficiency of nitrogen fixation in aerobes. *Nature*. 262: 173.
- DIXON, R.O.D., 1978. Nitrogenase-hydrogenase interrelationships in rhizobia. *Biochimie* 60: 233-236.
- DIXON, R.O.D., Y.M. BERLIER e P.A. LESPINAT, 1981. Respiration and nitrogen fixation in nodulated roots of soya bean and pea. *Plant and Soil*. 61:135-143.
- DÖBEREINER, J., 1974. Nitrogen fixing bacteria in the rhizosphere. In: QUISPÉL, A. (ed.). *The biology of nitrogen fixation*. Amsterdam. North Holl. Publ. Co. p. 86-120.
- DÖBEREINER, J. e F.F. DUQUE, 1980. *Contribuição da pesquisa em fixação biológica do nitrogênio*. EMBRAPA/PFBN. Rio de Janeiro. 23 p. mimeo.
- DÖBEREINER, J. e A.P. RUSCHEL, 1961. Fixação simbiótica do nitrogênio atmosférico em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). I - Influência do solo e da variedade. Instituto de Ecologia e Experimentação Agrícola. Rio de Janeiro. *Comunicado Técnico* 10. 16 p.
- EADY, R.R., 1973. Nitrogenase of *Klebsiella pneumoniae*: interactions of the component proteins studied by ultracentrifugation. *Biochem. J.* 135: 531-535.
- ELKAN, G.H.; J.C. WYNNE e T.J. SCHNEEWEIS, 1981. Isolation and evaluation of strains of *Rhizobium* collected from centres of diversity in South America. *Trop. Agric.* 58(4): 297-305.
- EMERICH, D.W., T. RUIZ-ARGÜESO, T.M. CHING e H.J. EVANS, 1979. Hydrogen-dependent, nitrogenase activity and ATP formation in *Rhizobium japonicum* bacteroids. *J. Bacteriol.* 137 (1): 153-160.
- EVANS, H.J., 1981. Energy production and utilization in nitrogen fixation-plenary discussion. In: GIBSON, A.H. e W.E. NEWTON (eds.). *Current perspectives in nitrogen fixation*. Proceed. of the fourth Intern. Symp. on Nitrogen fixation. Canberra. Australian Academy of Science. p. 128.

- EVANS, H.J., D.W. EMERICH, T. RUIZ-ARGÜESO, R.J. MAIER e S.L. ALBRECHT, 1980. Hydrogen metabolism in the legume - *Rhizobium* symbiosis. In: NEWTON, W.E. e W.H. ORME-JOHNSON (eds.). *Nitrogen fixation. II - Symbiotic Associations and Cyanobacteria*. Baltimore. Univ. Park. Press. p. 69-86.
- EVANS, H.J., K. PUROHIT, M.A. CANTRELL, G. EISBRENNER, S.A. RUSSELL, F.J. HANUS e J.E. LEPO, 1981. Hydrogen losses and hidrogenases in nitrogen-fixing organisms. In: GIBSON, A.H. e W.E. NEWTON (eds.). *Current perspectives in nitrogen fixation*. Proceed of the fourth. Int. Symp. on nitrogen fixation. Canberra. Australian Academy of Science, p. 84-96.
- EVANS, H.J., T. RUIZ-ARGÜESO, N. JENNINGS e F.J. HANUS, 1977. Energy coupling efficiency on symbiotic nitrogen fixations. In: HOLLAENDER, A. (ed.). *Genetic engineering for nitrogen fixation*. New York. Plenum Press. p. 333-354.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 1978. *Production Yearbook* 32:33.
- FRANCO, A.A. e J. DÖBEREINER, 1967. Especificidade hospedeira na simbiose com *Rhizobium*-feijão e influência da diferentes nutrientes. *Pesq. Agropec. Bras.* 2: 467-474.
- FRED, E.B., J.L. BALDWIN e E. Mc COY, 1932. Root nodule bacteria and leguminous plants. *Wisconsin University Studies* nº 5. 343 p.
- GALLO, J.R. e S. MIYASAKA, 1961. Composição química do feijoeiro e absorção de elementos nutritivos, do florescimento à maturação. *Bragantia* . 20: 867-884.
- GIBSON, A.H., 1966. The carbohydrate requirements for symbiotic nitrogen fixation: a "whole-plant" growth analysis approach. *Aust. J. Biol. Sci.* 19: 499-515.
- GIBSON, A.H., 1974. Consideration of the growing legume as a symbiotical association. *Proceed. Ind. Nat. Sci. Acad.* 40 (6): 741-767.
- GIBSON, A.H., 1981a. Energy production and utilization in nitrogen fixation-plenary discussion. In: GIBSON, A.H. e W.E. NEWTON (eds.). *Current perspectives in nitrogen fixation*. Proceed. of the fourth Int. Symp. on Nitrogen Fixation. Canberra. Australian Academy of Science. p. 127-128.

- GIBSON, A.H., 1981b. Physiological factors affecting field nodulation and nitrogen fixation-specialist discussion. In: GIBSON, A.H. e W.E. NEWTON (eds.). *Current perspectives in nitrogen fixation*. Proceed. of the fourth Int. Symp. on N-fixation. Canberra. Australian Academy of Science. p. 260-264.
- GIBSON, A.H., B.L. DREYFUS, R.L. LAWN, J.J. SPRENT e G.L. TURNER, 1981. Host and environmental factors affecting hydrogen evolution and uptake. In: GIBSON, A.H. e W.E. NEWTON (eds.). *Current perspectives in nitrogen fixation*. Proceed. of the fourth Int. Symp. on Nitrogen Fixation. Canberra. Aust. Acad. of Science p. 373.
- GIBSON, A.H., W.F. DUDMAN, R.W. WEAVER, I.C. HORTON e I.C. ANDERSON, 1971. Variation within serogroups 123 of *Rhizobium*. *Plant and Soil, special volume*, 33-37.
- GIBSON, A.H. e J.D. PAGAN, 1977. Nitrate effects on the nodulation of legumes inoculated with nitrate reductase deficient mutants of *Rhizobium*. *Planta*. 134:17-22.
- GRAHAM, P.H., 1980a. *Importancia del hospedero en la nodulacion y fijacion de nitrogeno por leguminosas con algunas sugerencias para mejorar-lo*. Colombia, CIAT. 28 p. mimeo.
- GRAHAM, P.H., 1980b. Some problems of nodulation and symbiotic nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris* L. *Field Crop Res.* preprint.
- GRAHAM, P.H. e J. HALLIDAY, 1977. Inoculation and nitrogen fixation in the genus *Phaseolus*. In: VINCENT, J.M. (ed.). *Exploiting the legume-Rhizobium symbiosis in tropical agriculture*. Univ. of Hawaii. College of Tropical Agriculture. *Misc. Publ.* 145: 313-334.
- GRAHAM, P.H. e J.C. ROSAS, 1977. Growth and development of indeterminate bush and climbing cultivars of *Phaseolus vulgaris* L. inoculated with *Rhizobium*. *J. Agric. Sci.* 88: 503-508.
- GUSS, A. e J. DÖBEREINER, 1972. Efeito da adubação nitrogenada e da temperatura do solo na fixação do nitrogênio em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): *Pesq. Agropec. Bras.* 7: 87-92.
- HAAG, H.P., E. MALAVOLTA, H. GARGANTINI e H.G. BLANCO, 1967. Absorção de nutrientes pela cultura do feijoeiro. *Bragantia*, 26 (30): 381-391.

- HAGEMAN, R.V. e R.H. BURRIS, 1978. Kinetic studies on electron transfer and interaction between nitrogenase components from *Azotobacter vinelandii*. *Biochemistry*. 17(20): 4117-4124.
- HALLIDAY, J., 1975. An interpretation of seasonal and short term fluctuations in nitrogen fixation. University of Western Australia. 141 p. (Ph.D. Thesis).
- HANUS, F.H., S.L. ALBRECHT, R.M. ZABLOWICZ, D.W. EMERICH, S.A. RUSSEL e H. J. EVANS, 1981. Yield and N content of soybean seed as influenced by *Rhizobium japonicum* inoculants possessing the hydrogenase characteristic. *Agron. Journal*. 73: 368-372.
- HARDY, R.W.F., R.C. BURNS e R.O. HOLSTON, 1973. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. *Soil Biol. Biochem.* 5: 47-81.
- HARDY, R.W.F. e U.D. HAVELKA, 1974. Can the root be coaxed into fixing more nitrogen? *Crops & Soils Magazine*. *Fev.* : 11-13.
- HARDY, R.W.F. e U.D. HAVELKA, 1975. Nitrogen fixation: a key to world food. *Science*. 188: 633-643.
- HARDY, R.W.F. e U.D. HAVELKA, 1976. Photosynthate as a major factor limiting nitrogen fixation by field grown legumes with emphasis on soybeans. In: NUTMAN, P.S. (ed.). *Symbiotic nitrogen fixation in plants*. Cambridge Univ. Press. p. 421-439.
- HARDY, R.W.F., R.D. HOLSTEN, E.K. JACKSON e R.C. BURNS, 1968. The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43: 1185-1207.
- HARDY, R.W.F. e E. KNIGHT Jr., 1966. Reductant-dependent adenosine triphosphate of nitrogen fixing extracts of *Azotobacter vinelandii*. *Biochem. Biophys. Acta*. 132: 520-531.
- HARDY, R.W.F. e E. KNIGHT Jr., 1967. ATP-dependent reduction of azide and HCN by N_2 fixing enzymes of *Azotobacter vinelandii* and *Clostridium pasteurianum*. *Biochem. Biophys. Acta*. 139: 69-90.
- HAVELKA, U.D. e R.W.F. HARDY, 1974. Legume N_2 fixation as a problem in carbon nutrition. In: NEWTON, W. e C.J. NYMAN (eds.). *Proceed. of the first Int. Symp. on nitrogen fixation*. Vol.II. Washington State Univ. Press. p. 456-475.

- HERRIDGE, D.F. e J.S. PATE, 1977. Utilization of net photosynthate for nitrogen fixation and protein production in a annual legume. *Plant Physiol.* 60: 759-764.
- HOCH, G.E., H.N. LITTLE e R.H. BURRIS, 1957. Hydrogen evolution from soybean root nodules. *Nature.* 179: 430-431.
- HWANG, J.C., C.H. CHEN e R.H. BURRIS, 1973. Inhibition of nitrogenase-catalysed reductions. *Biochem. Biophys. Acta.* 292: 256-270.
- KEYSER, H., P. Van BERKUM e D. WEBER, 1981. Nitrogenase activity and hydrogen evolution by *Rhizobium japonicum* in symbiosis with siratro and cowpea. In: GIBSON, A.W. e W.E. NEWTON (eds.). *Current perspectives in nitrogen fixation*. Proceed. of the fourth Int. Symp. on Nitr. Fix. Canberra. Aust. Acad. of Sci. p. 127-128.
- KNOWLES, R. 1981. The measurement of nitrogen fixation. In: GIBSON, A. H. e W.E. NEWTON (eds.). *Current perspectives in nitrogen fixation*. Proceed. of the fourth Int. Symp. on Nitr. Fix. Canberra. Aust. Acad. of Sci. p. 327-337.
- LAING, J.T. CHRISTELLER e W.D. SULTON, 1979. Carbon dioxide fixation by lupin root nodules. II - Studies with ¹⁴C-labeled glucose, the pathway of glucose catabolism and the effects of some treatments that inhibit nitrogen fixation. *Plant Physiol.* 63: 450-454.
- LAWRIE, A.C. e C.T. WHEELER, 1973. The supply of photosynthetic assimilates to nodules of *Pisum sativum* L. in relation to the fixation of nitrogen. *New Phytol.* 72: 1341-1348.
- LAYZELL, D.B., R.M. RAINBIRD, C.A. ATKINS e J.S. PATE, 1979. Economy of photosynthate use in nitrogen-fixing legume nodules. *Plant Physiol.* 64: 888-891.
- LEE, S.B. e P.W. WILSON, 1943. Hydrogenase and nitrogen fixation by *Azotobacter*. *J. Biol. Chem.* 151: 377-385.
- LIE, T.A., 1974. Environmental effects on nodulation and symbiotic nitrogen fixation. In: QUISPTEL, A. (ed.). *The biology of nitrogen fixation*. Amsterdam. North Holl. Publ. Co. p. 555-582.
- LIND, C.J. e P.W. WILSON, 1941. Mechanism of biological nitrogen fixation. VIII - Carbon monoxide as an inhibitor for nitrogen fixation by red clover. *J. Am. Chem. Soc.* 63: 3511-3514.

- LJONES, T., 1974. The enzyme system. In: QUISPEL, A. (ed.). *The biology of nitrogen fixation*. Amsterdam. North Holl. Publ. Co. p. 617-638.
- LJONES, T. e R.H. BURRIS, 1978. Evidence for one-electron transfer by the Fe protein of nitrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 22-25.
- LOWE, D.J., B.E. SMITH e R.R. EADY, 1980. The structure and mechanism of nitrogenase. In: SUBBA RAO, N.S. (ed.). *Recent advances in Biological Nitrogen Fixation*. Londres. Edward Arnold. p. 34-87.
- MAGALHÃES, A.C.N., 1979. Fotossíntese. In: FERRI, M.G. (ed.). *Fisiologia Vegetal*. V. I. São Paulo. EPU/EDUSP. p. 117-163.
- MAGUE, T.H. e R.H. BURRIS, 1972. Reduction of acetylene and nitrogen by field grown soybeans. *New Phytol.* 71: 275-286.
- MAHON, J.D., 1977a. Root and nodule respiration in relation to acetylene reduction in intact nodulated peas. *Plant Physiol.* 60: 812-816.
- MAHON, J.D., 1977b. Respiration and the energy requirement for nitrogen fixation in nodulated pea roots. *Plant Physiol.* 60: 817-821.
- MAHON, J.D., 1979. Environmental and genotypic effects on the respiration associated with symbiotic nitrogen fixation in peas. *Plant Physiol.* 63: 892-897.
- MAHON, J.D. e J.J. CHILD, 1979. Growth response of inoculated peas (*Pisum sativum*) to combined nitrogen. *Canadian J. of Botany.* 57: 1687-1693.
- MAIER, R.I., N.E.R. CAMPBELL, F.J. HANUS, F.B. SIMPSON, S.A. RUSSELL; H.J. EVANS, 1978. Expression of hydrogenase activity in free-living *Rhizobium japonicum*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 75 (7): 3258-3262.
- MASTERSON, C.L. e P.M. MURPHY, 1976. Application of the acetylene reduction technique to the study of nitrogen fixation by white clover in the field. In: NUTMAN, P.S. (ed.). *Symbiotic Nitrogen Fixation*. Cambridge Univ. Press. p. 299-316.
- MASTERSON, C.L. e P.M. MURPHY, 1980. The acetylene reduction technique. In: SUBBA RAO, N.S. (ed.). *Recent advances in Nitrogen Fixation*. Londres. Edward Arnold. p. 8-33.
- Mc CRAE, R.E., F.J. HANUS e H.J. EVANS, 1978. Properties of hydrogenase system in *Rhizobium japonicum* bacteroids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 384-390.

- Mc KNIGHT, T., 1949. Efficiency of isolates of *Rhizobium* in the cowpea group with proposed additions to this group. *Qld. J. Agric. Sci.* Brisbane. 6: 61-76.
- MINCHIN, F.R., 1980. Energetic of nitrogen metabolism in plants. *Discussion paper for the Royal Society Study Group on the Nitrogen Cycle*. 22 p.
- MINCHIN, F.R. e J.S. PATE, 1973. The carbon balance of a legume and the functional economy of its root nodules. *J. Exp. Bot.* 24: 259-271.
- MINCHIN, F.R., R.J. SUMMERFIELD e A.R.J. EAGLESHAM, 1978. Plant genotype x *Rhizobium* strain interactions in cowpea (*Vigna unguiculata* L.). *Trop. Agric. Trinidad* , 55: 107-115.
- MINCHIN, F.R., R.J. SUMMERFIELD, P. HADLEY, E.H. ROBERTS e S. RAWSTHORNE, 1981a. Carbon and nitrogen nutrition of nodulated roots of grain legumes. *Plant Cell. and Environment*. 4: 5-26.
- MINCHIN, F.R., R.S. SUMMERFIELD e M.C.P. NEVES, 1981b. Nitrogen nutrition of cowpea (*Vigna unguiculata*): effect of timing of inorganic nitrogen applications on nodulation, plant growth and seed yield. *Tropical Agric. Trinidad* . 58(1): 1-12.
- MOLNAR, D.M., R.H. BURRIS e P.W. WILSON, 1948. The effect of various gases on nitrogen fixation by *Azotobacter*. *J. Am. Chem. Soc.* 70:1713-1716.
- MORTENSON, L.E. e R.N.F. THORNELEY, 1979. Struture and function of nitrogenase. *Ann. Rev. Biochem.* 48: 387-418.
- MOUSTAFA, E. e L.E. MORTENSON, 1967. Acetylene reduction by nitrogen fixing extracts of *Clostridium pasteurianum*: ATP requirement and inhibition by ADP. *Nature*. 216:1241-1242.
- MOZEN, M.M. e R.H. BURRIS, 1954. The incorporation of ¹⁵N-labelled nitrous oxide by nitrogen fixing agents. *Biochem. Biophys. Acta.* 14: 577-578.
- NEVES, M.C.P., F.R. MINCHIN e R.J. SUMMERFIELD, 1981. Carbon metabolim , nitrogen assimilation and seed yield of cowpea (*Vigna unguiculata*) plants dependent on nitrate-nitrogen or on one of two strains of *Rhizobium*. *Tropical Agriculture. Trinidad*. 58(2): 115-132.

- NEIRA, C.A.I., A.A. FRANCO e J.C. PEREIRA, 1977. Seasonal patterns of nitrate reductase and nitrogenase activities in *Phaseolus vulgaris* (L.). *Plant Physiol.* (Suppl.). 59: 127.
- NICHOLAS, D.J.D., 1963. The metabolism of inorganic nitrogen and its compounds in microorganisms. *Biol. Rev.* 38: 530-568.
- NUTMAN, P.S., 1946a. Variation with strains of clover nodule bacteria in the size of nodule produced and in the effectivity of the symbiosis. *J. Bact.* 51: 411-432.
- NUTMAN, P.S., 1946b. Genetical factors concerned in the symbiosis of clover and nodule bacteria. *Nature.* 157: 463-465.
- OGHOGHORIE, C.G.O. e J.S. PATE, 1971. The nitrate stress syndrome of the nodulated field pea (*Pisum arvense* L.). Techniques for measurement and evaluation in physiological terms. *Plant and Soil, Special Volume*, p. 185-202.
- ORCUTT, F.S. e P.W. WILSON, 1935. The effect of nitrate-nitrogen on the carbohydrate metabolism of inoculated soybeans. *Soil Science.* 39(4): 289-296.
- ORME-JOHNSON, W.H., L.C. DAVIS, M.T. HENZL, B.A. AVERILL, N.R. ORME-JOHNSON, E. MUNCK e R. ZIMMERMAN, 1977. Components and pathways in biological nitrogen fixation. In: NEWTON, W., J.R. POSTGATE e C. RODRIGUES-BARRUECO (eds.). *Recent development in Nitrogen Fixation*. Londres. Academic Press. p. 131-178.
- PATE, J.S., C.A. ATKINS e R.M. RAINBIRD, 1981. Theoretical and experimental costing of nitrogen fixation and related processes in nodules of legumes. In: GIBSON, A.H. e W.E. NEWTON (eds.). *Current perspectives in nitrogen fixation*. Proceed. of the fourth Int. Symp. on Nitrogen fixation. Canberra. Aust. Acad. of Sci. p. 105-116.
- PATE, J.S. e D.F. HERRIDGE, 1978. Partitioning and utilization of net photosynthate in a nodulated annual legume. *J. Exp. Bot.* 29 (109): 401-412.
- PATE, J.S. e F.R. MINCHIN, 1980. Comparative studies of carbon and nitrogen nutrition of selected grain legumes. In: SUMMERFIELD, J.R. e A.H. BUNTING (eds.). *Advances in legume science*. Londres. H.M.S.O. p. 105-113.

- PATEMAN, J.A., D.J. COVE, B.M. REVER e D.B. ROBERTS, 1964. A common co-factor for nitrate reductase and xanthine dehydrogenase with also regulates the synthesis of nitrate reductase. *Nature*. 201: 58-60.
- PHELS, A.S. e P.W. WILSON, 1941. Occurrence of hydrogenase in nitrogen fixing organisms. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 47: 473-476.
- PHILLIPS, D.A., 1980. Efficiency of symbiotic nitrogen fixation in legumes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31: 29-49.
- PHILLIPS, D.A., T.M. De JONG e L.E. WILLIAMS, 1981. Carbon and nitrogen limitations on symbiotically grown soybean seedling. *In*: GIBSON, A.H. e W.E. NEWTON (eds.). *Proceed. of the fourth Int. Symp. on Nitr. Fix.* Canberra. Aust. Acad. of Sci. p. 117-120.
- POSTGATE, J.R. e S. HILL, 1979. Nitrogen fixation. *In*: LYNCH, J.M. e N. J. POOLE (eds.). *Microbiol. ecology, a conceptual approach*. Oxford. Blackwell. p. 191-213.
- RAGGIO, M., N. RAGGIO e J.C. TORREY, 1965. The interaction of nitrate and carbohydrates in rhizobial root-nodule formation. *Plant Physiol.* 40: 601-606.
- RAINBIRD, R.M., C.A. ATKINS e J.S. PATE, 1981. Significance of hydrogen evolution in the carbon and nitrogen economy of nodulated cowpea. *In*: GIBSON, A.H. e W.E. NEWTON (eds.). *Current perspectives in nitrogen fixation*. *Proceed. of the fourth Int. Symp. on Nitr. Fix.* Canberra. Aust. Acad. of Sci. p. 376.
- RAWLINGS, J., V.K. SHAH, J.R. CHISNELL, W.J. BRILL, R. ZIMMERMAN, E. MÜNCH e W.H. ORME-JOHNSON, 1978. Novel metal cluster in the iron-molybdenum cofactor of nitrogenase. *J. Biol. Chem.* 253: 1001-1004.
- RENNIE, R.J. e G.A. KEMP, 1980. Dinitrogen fixation in pea beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as effected by growth stage and temperature regime. *Can. J. Bot.* 58: preprint.
- RIVERA-ORTIZ, J.M. e R.H. BURRIS, 1975. Interactions among substrates and inhibitors of nitrogenase. *J. Bacteriol.* 123: 537-545.
- RUIZ-ARGÜESO, T.; D.W. EMERICH e H.J. EVANS, 1979a. Hydrogenase system in legume nodules: a mechanism of providing nitrogenase with energy and protection from oxygen damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 86(2): 259-264.

- RUIZ-ARGÜESO, T., D.W. EMERICH e H.J. EVANS, 1979b. Characteristics of the H_2 oxidizing system in soybean nodule bacteroids. *Arch. Microbiol.* 125: 199-206.
- RUIZ-ARGÜESO, T., J. HANUS e H.J. EVANS, 1978. Hydrogen production and uptake by pea nodules as affected by strains of *Rhizobium leguminosarum*. *Arch. Microbiol.* 116:113-118.
- RUIZ-ARGÜESO, T., R.J. MAIER e H.J. EVANS, 1979c. Hydrogen evolution from alfafa and clover nodules and hydrogen uptake by free-living *Rhizobium meliloti*. *App. Environ. Microb.* 37(3): 582-587.
- RUSCHEL, A.P. e H.W. REUSZNER, 1973a. Fatores que afetam a simbiose *Rhizobium phaseoli* - *Phaseolus vulgaris*. *Pesq. Agropec. Bras. Série Agron.* 8: 287-292.
- RUSCHEL, A.P. e H.W. REUSZNER, 1973b. Desenvolvimento da nodulação e fixação simbiótica de nitrogênio em variedades de soja, em diferentes estádios de desenvolvimento da planta. *Pesq. Agropec. Bras. Série Agron.* 8: 251-256.
- RUSCHEL, A.P. e R. RUSCHEL, 1975. Sinergia da absorção de nitrogênio do solo e da fixação simbiótica de nitrogênio atmosférico dirigida para o aumento do nitrogênio total da soja (*Glycine max*). *Pesq. Agropec. Bras. Série Agron.* 10: 37-40.
- RUSCHEL, A.P. e S.M.T. SAITO, 1977. Efeito da inoculação de *Rhizobium*, nitrogênio e matéria orgânica na fixação de nitrogênio em feijão (*Phaseolus vulgaris* (L.)). *R. Bras. Ci. Solo.* 1: 21-24.
- RUSCHEL, A.P., S.M.T. SAITO e A. TULMAN NETO, 1979a. Eficiência da inoculação de *Rhizobium* em *Phaseolus vulgaris* L. I - Efeito de fontes de nitrogênio e cultivares. *R. Bras. Ci. Solo.* 3: 13-17.
- RUSCHEL, A.P., E. SALATI e P.B. VOSE, 1979b. Nitrogen enrichment of soil and plant by *Rhizobium phaseoli* - *Phaseolus vulgaris* symbiosis. *Plant. and Soil.* 51: 425-429.
- RYLE, G.J.A., C.E. POWELL e A.J. GORDON, 1979a. The respiratory costs of nitrogen fixation in soybean, cowpea and white clover. I - Nitrogen fixation and the respiration of the nodulated root. *J. Exp. Bot.* 30: 135-144.

- RYLE, G.J.A., C.E. POWELL e A.J. GORDON, 1979b. The respiration costs of nitrogen fixation in soybean, cowpea and white clover. II - Comparisons of the cost of nitrogen fixation and the utilization of combined nitrogen. *J. Exp. Bot.* 30: 145-153.
- SAITO, S.M.T., 1978. Relações entre fixação de $^{15}\text{N}_2$, evolução de H_2 e redução do C_2H_2 em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Piracicaba, ESALQ/USP. 98 p. (Tese de doutoramento).
- SAITO, S.M.T., 1980. Avaliação em campo da capacidade de fixação simbiótica de estirpes de *Rhizobium phaseoli*. *X Relar.* Maracay-Venezuela. 12 p.
- SAITO, S.M.T. e E.J.B.N. CARDOSO, 1977. Seleção de estirpes de *Rhizobium phaseoli* para o feijoeiro cultivar carioca. *O solo.* Ano LXIX. (1): 44-47.
- SAITO, S.M.T., S.T.A. CASSINI e A.P. RUSCHEL, 1980a. Determinação da eficiência de estirpes de *R. phaseoli* usando características culturais e em simbiose com *P. vulgaris* L. *X Relar.* Maracay-Venezuela. 18 p.
- SAITO, S.M.T., E. MATSUI e E. SALATI, 1980b. $^{15}\text{N}_2$ fixation, H_2 evolution and C_2H_2 reduction relationships in *Phaseolus vulgaris*. *Physiologia Plantarum.* 49: 37-42.
- SAITO, S.M.T. e A.P. RUSCHEL, 1976. Comportamento de estirpes de *Rhizobium phaseoli* inoculadas em cinco variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) em condições normais de cultivo. *VIII Relar.* Cali-Colombia, 28 p.
- SAITO, S.M.T., V.M. ZAIA e A.P. RUSCHEL, 1978. Efficiency of N_2 -fixation of *R. phaseoli* strains inoculated in the bean cultivar Venezuela-350. *Ann. Report of the bean improvement cooperative.* 21: 12-14.
- SANDERS, J.H. e H.F. SCHWARTZ, 1980. Bean production and pest constrains in Latin America. In: SCHWARTZ, H.F. e G.E. GALVEZ (eds.). *Bean production problemas. Disease, Insect, Soil and Climatic Constrains.* Cali. CIAT p. 1-16.
- SARRUGE, J.R. e H.P. HAAG, 1974. *Análises químicas em plantas.* Piracicaba. ESALQ/USP, 27 p. mimeo.
- SCHÖLLHORN, R. e R.H. BURRIS, 1967. Acetylene as a competitive inhibitor of N_2 fixation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 58: 213-216.

- SCHUBERT, K.R., J.A. ENGELKE, S.A. RUSSEL e H.J. EVANS, 1977. Hydrogen reactions of nodulated leguminous plants. I - Effect of Rhizobial strain and plant age. *Plant Physiol.* 60: 651-654.
- SCHUBERT, K.R. e H.J. EVANS, 1976. Hydrogen evolution: a major factor affecting the efficiency of nitrogen fixation in nodulated symbionts. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 73 (4): 1207-1211.
- SCHUBERT, K.R. e H.J. EVANS, 1977. The relation between hydrogen reactions to nitrogen fixation in nodulated symbionts. In: NEWTON, W., J.R. POSTGATE e C. RODRIGUEZ-BARRUECO (eds.). *Recent Developments in Nitrogen Fixation*. Londres. Academic Press. p. 469-489.
- SCHUBERT, K.R., N.T. JENNINGS e H.J. EVANS, 1978. Hydrogen reactions of nodulated leguminous plants. II - Effects on dry matter accumulation and nitrogen fixation. *Plant Physiol.* 61: 398-401.
- SCHUBERT, K.R., G.J.A. RYLE, 1980. The energy requirements for nitrogen fixation in nodulated legumes. In: SUMMERFIELD, R.J. e A.H. BUNTING (eds.). *Advances in Legume Science*. Londres. H.M.S.O. p. 85-96.
- SHAH, V.K. e W.J. BRILL, 1977. Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 74: 3249-3253.
- SILSBURY, J.H., 1977. Energy requirement for symbiotic nitrogen fixation. *Nature.* 267: 149-150.
- SILVA, J.G., 1951. Estudos sobre a inoculação de sementes leguminosas realizados pelo Instituto Agrônomo de Campinas. *III Reunião Bras.Cienc. do Solo*. Recife. p. 297-300.
- SILVA, H.T., 1981. Caracterização morfológica, agrônômica e fenológica de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) comumente plantadas em diversas regiões do Brasil. EMBRAPA/CNPAP. Goiânia. *Circular Técnica* 15: 51 p.
- SMITH, L.A., S. HILL e M.G. YATES, 1976. Inhibition by acetylene of conventional hydrogenase in nitrogen-fixing bacteria. *Nature.* 262: 209-210.
- SPIFF, E.D. e C.T.I. ODU, 1973. Acetylene reduction by *Beijerinckia* under various partial pressures of oxygen and acetylene. *J. Gen. Microbiol.* 78: 207-209.
- SPRENT, J.I., 1969. Prolonged reduction of acetylene by detached soybean nodules. *Planta.* 88: 372-375.

- SPRENT, J.I., 1979. *The biology of nitrogen-fixing organisms*. Londres. Mc Graw-Hill. 195 p.
- TANNER, J.W. e J.C. ANDERSON, 1963. An external effect of inorganic nitrogen in root nodulation. *Nature*. 198(4877): 303-304.
- VEIGA, C.L., 1980. Potencial de utilização de nitrogênio na forma iônica e molecular de cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). Piracicaba. ESALQ/USP. 118 p. (Tese de doutoramento).
- VINCENT, J.M., 1970. *Manual for the practical study of root nodule bacteria*. Intern. Biol. Program. Handbook nº 15. Oxford. Blackwell. 163 p.
- VINCENT, J.M., 1974. Root nodule symbiosis with *Rhizobium*. In: QUISPÉL, A. (ed.). *The biology of Nitrogen Fixation*. Amsterdam. Amer. Elsev. p. 265-341.
- VIRTANAEN, A.I. e J.K. MIETTINEN, 1969. Symbiotic nitrogen fixation in leguminous plants. In: STEWART, F.C. (ed.). *Plant Physiology*. V. VI. New York. Academic Press. p. 565-668.
- VOSE, P.B., A.P. RUSCHEL, R.L. VICTORIA, S.M.T. SAITO e E. MATSUI, 1981. 15-Nitrogen as a tool in biological nitrogen fixation research. *Int. Work-shop on Biol. Nitr. Fix. Tech. for Trop. Agric.* Colombia. CIAT. 19 p.
- WALKER, C. e M.G. YATES, 1978. The hydrogen cycle in nitrogen fixing *Azotobacter chroococcum*. *Biochimie*. 60: 225-231.
- WAUGHMAN, G.J., 1972. The effect of varying oxygen tension, temperature and sample size on acetylene reduction by nodules of *Alnus* and *Hippophae*. *Plant and Soil*. 37: 521-528.
- WEBER, C.R., 1966. Nodulating and non-nodulating soybean isolines. II - Response to applied nitrogen and modified soil conditions. *Agr. J.* 58: 46-49.
- WESTERMANN, D.T. e J.J. KOLAR, 1978. Symbiotic N₂ (C₂H₂) fixation by bean. *Crop Science*. 18: 986-890.
- WILLIAMS, L.F. e D.L. LYNCH, 1954. Inheritance of a non-nodulating character in the soybean. *Agron. J.* 46: 28-29.
- WILSON, P.W., 1940. *The biochemistry of Symbiotic Nitrogen Fixation*. Madison. Univ. of Wisconsin Press.

- WILSON, P.W., 1976. The background. In: POSTGATE, J.R. (ed.). *The chemistry and biochemistry of nitrogen fixation*. Londres. Plenum Press. p. 1-18.
- WILSON, P.W., W.W. UMBREIT e S.B. LEE, 1937. Mechanism of symbiotic nitrogen fixation. III - Hydrogen as specific inhibitor. *Arch. Mikrobiol.* 8: 440-457.
- WINTER, H.C. e R.H. BURRIS, 1976. Nitrogenase. *Ann. Rev. Biochem.* 45: 409-426.
- YATES, M.G., 1977. Physiological aspects of nitrogen fixation. In: NEWTON, W., J.R. POSTGATE e C. RODRIGUEZ-BARRUECO (eds.). *Developments in nitrogen fixation*. Londres. Academic Press, p. 219-270.
- YATES, M.G., 1980. Biochemistry of nitrogen fixation. In: *The biochemistry of plants*. V. 5. Londres. Academic Press. p. 1-64.
- YATES, M.G. e R.R. EADY, 1980. The physiology and regulation of nitrogen fixation. In: SUBBA RAO, N.S. (ed.). *Recent advances in biological nitrogen fixation*. Londres. Edward Arnold. p. 88-120.
- ZABLOTOWICZ, R.M., S.A. RUSSEL e A.J. EVANS, 1980. Effect of the hydrogenase system in *Rhizobium japonicum* on the nitrogen fixation and growth of soybeans at different stages of development. *Agronomy Journal*. 72: 555-564.

APÊNDICES

• Relações $C_2H_2 : N_2$ reduzidos encontradas no experimento II.

Cultivar de <i>P. vulgaris</i>	Estirpe de <i>R. phaseoli</i>	dias após a germinação				Média
		15	25	35	45	
Carioca	C-05	4,55:1	6,38:1	1,44:1	1,31:1	3,42:1
	C-88 (=SEMIA 487)	3,59:1	7,86:1	0,91:1	1,30:1	3,42:1
	C-29 (= 127 K-17)	5,33:1	7,83:1	2,09:1	1,76:1	4,25:1
Venezuela-350	C-05	3,44:1	20,93:1	1,38:1	3,66:1	7,35:1
	C-88 (=SEMIA 487)	3,27:1	17,53:1	1,58:1	2,32:1	6,17:1
	C-29 (= 127 K-17)	3,24:1	17,58:1	1,79:1	2,31:1	6,23:1

. Relações $C_2H_2 : N_2$ reduzidos encontradas no experimento III.

Cultivar de <i>P. vulgaris</i>	Estirpe de <i>R. phaseoli</i>	dias após a germinação			Média
		25	40	55	
Venezuela-350	C-05	3,45:1	3,16:1	1,81:1	2,81:1
	C-89(=CIAT-57)	4,07:1	3,83:1	3,43:1	3,78:1
	C-40(=CIAT-255)	3,98:1	3,76:1	1,28:1	3,01:1
Aroana	C-05	4,62:1	4,47:1	1,62:1	3,57:1
	C-89(=CIAT-57)	4,98:1	12,51:1	1,17:1	6,22:1
	C-40(=CIAT-255)	5,16:1	10,55:1	1,24:1	5,65:1
Moruna	C-05	4,42:1	4,32:1	1,76:1	3,50:1
	C-89(=CIAT-57)	5,16:1	11,08:1	1,34:1	5,86:1
	C-40(=CIAT-255)	5,20:1	8,02:1	1,54:1	4,92:1
Carioca	C-05	5,22:1	5,19:1	1,44:1	3,95:1
	C-89(=CIAT-57)	5,98:1	9,48:1	1,16:1	5,54:1
	C-40(=CIAT-255)	4,53:1	10,89:1	1,51:1	5,64:1

APÊNDICE 3 . Análise de variância do experimento I mostrando o efeito de cinco cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. e duas estirpes de *Rhizobium phaseolli* no peso de matéria seca da parte aérea, raiz e nódulos, na ZN e N total da parte aérea aos 45 dias após a germinação (DAG) e na redução de C_2H_2 , evolução de H_2 e eficiência relativa (ER) da nitrogenase aos 15, 25, 35 e 45 DAG. Média de 4 repetições.

Causa de Variação	15 DAG				25 DAG				35 DAG				45 DAG			
	Redução C_2H_2	Evolução H_2	ER		Redução C_2H_2	Evolução H_2	ER		Redução C_2H_2	Evolução H_2	ER		Redução C_2H_2	Evolução H_2	ER	
Cultivar	4708,11**	449,12**	4,87ns		109,05**	86,55**	15,61**		178,88**	75,11**	27,36**		4949,02**	275,10**	13,60**	
Estirpe	4002,99**	446,26**	43,95**		8,77**	111,21**	270,00**		4949,89**	9,58**	258,23**		21429,85**	191,13**	240,51**	
Cultivar x Estirpe	1371,53**	126,77**	1,14**		38,21**	44,24**	6,56**		392,55**	17,28**	10,43**		3616,53**	203,33**	11,78**	
CV(%)	2,98	10,19	3,37		10,16	4,81	2,74		3,16	3,35	2,24		2,56	3,09	2,73	

Causa de Variação	M.S. nódulos	M.S. raízes	parte aérea		
			M.S.	ZN	N total
Cultivar	10,41**	8,75**	43,88**	12,22**	8,54**
Estirpe	63,56**	0,56ns	12,02**	44,22**	5,36**
Cultivar x Estirpe	7,69**	4,28**	4,57**	2,25*	16,72**
CV (%)	22,73	16,84	11,94	6,79	17,01

(**) significativo ao nível de 1% pelo teste de Tukey

(*) significativo ao nível de 5% pelo teste de Tukey

ns não significativo

Apêndice 4

Análise de variância do experimento II mostrando o efeito de duas cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. (Carioca e Venezuela-350) e três estirpes de *Rhizobium phaseoli* (C-05, C-88 (= SEMIA 487) e C-29 (= 127 K-17)) na produção de matéria seca da parte aérea, raiz e nódulos, na ΣN e Σ total da parte aérea e na redução de C_2H_2 , evolução de H_2 pelos nódulos e eficiência relativa do sistema nitrogenase, aos 15, 25, 35 e 45 dias após a germinação.

Causa de Variação	M.S. nódulos	M.S. raiz	parte aérea		N total	Redução de C ₂ H ₂	Evolução de H ₂	ER
			M.S.	ΣN				
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 15 dias								
Cultivar	0,332ns	0,420ns	0,018ns	0,335ns	0,480ns	343,324**	37,307 **	66,218**
Estirpe	6,473**	0,031ns	21,302**	25,019**	43,391**	174,633**	13,206**	28,075**
Cultivar x Estirpe	12,264**	1,910ns	8,292**	0,519ns	6,870**	5,379*	2,093ns	1,222ns
CV (%)	10,78	4,39	9,16	7,60	11,33	4,03	9,84	4,94
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 25 dias								
Cultivar	1,217ns	14,479**	108,634**	114,550**	225,125**	3,410ns	1,840ns	24,201**
Estirpe	1,052ns	3,425ns	38,711**	181,396**	133,988**	20,701**	1,916ns	36,482**
Cultivar x Estirpe	0,653ns	1,488ns	28,943**	43,913**	6,189**	17,489**	10,294**	4,831*
CV (%)	7,29	4,81	5,50	2,93	6,00	11,41	15,92	4,37
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 35 dias								
Cultivar	1,029ns	17,578**	30,356**	40,243**	70,438**	54,297**	69,553**	43,35**
Estirpe	11,073**	1,176ns	65,943**	87,572**	136,540**	114,523**	64,748**	50,13**
Cultivar x Estirpe	2,940ns	3,410ns	0,727ns	5,442*	6,849**	19,612**	4,260*	8,54**
CV (%)	6,82	4,11	3,69	4,07	5,64	4,07	3,48	4,26
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 45 dias								
Cultivar	1,261ns	2,929ns	43,576**	141,137**	136,769**	19,040**	11,278**	0,468ns
Estirpe	2,494ns	4,937*	8,419**	330,576**	99,072**	16,810**	3,126ns	27,813**
Cultivar x Estirpe	23,575**	9,919**	6,259**	13,542**	18,638**	24,165**	5,838*	8,473**
CV (%)	2,79	3,78	6,65	2,48	6,45	6,84	8,17	6,38

(*) significativo ao nível de 1%

(**) significativo ao nível de 5%

ns não significativo

Apêndice 5

Análise de variância do experimento III mostrando o efeito de quatro cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. (Venezuela-350, Aroana, Moruna e Carioca) inoculadas com três estirpes de *Rhizobium phaseoli* (C-05, C-89 e C-40) na produção de matéria seca, ZN e N total da parte aérea, raiz, nódulo e vagem. Plantas coletadas aos 25, 40 e 55 dias após a germinação.

Causa de Variação	F											
	parte aérea			raiz			nódulo			vagem		
	M.S.	ZN	N total	M.S.	ZN	N total	M.S.	ZN	N total	M.S.	ZN	N total
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 25 dias												
Cultivar	197,239**	29,208**	155,835**	5,950**	30,388**	32,931**	90,218**	121,613**	138,885**			
Estirpe	58,072**	3,140ns	155,835**	0,448ns	204,629**	102,499**	10,048**	62,955**	7,033**			
Cultivar x Estirpe	12,870**	7,829**	9,260**	1,371ns	3,769**	3,335**	6,268**	3,346**	3,923**			
CV(Z)	9,47	7,27	10,40	7,79	5,61	3,10	6,43	3,36	6,73			
												187,714** 202,282**
												52,446** 17,351**
												9,652** 9,183**
												7,46 7,80
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 40 dias												
Cultivar	21,398**	7,749**	29,744**	14,827**	99,752**	149,63**	57,238**	87,348**	161,758**			
Estirpe	92,348**	22,736**	104,376**	15,890**	206,048**	281,094**	122,513**	149,170**	14,916**			
Cultivar x Estirpe	10,061**	0,424ns	5,008**	2,686**	15,714**	15,185**	8,255**	9,514**	10,865**			
CV(Z)	5,89	8,90	9,77	7,88	5,21	6,39	3,53	4,51	4,41			
												42,195** 69,054**
												135,587** 206,907**
												12,095** 9,303**
												4,20 18,804
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 55 dias												
Cultivar	25,706**	21,383**	39,074**	8,876**	79,711**	88,824**	14,520**	324,592**	181,097**	1210,422**	189,06**	1120,319**
Estirpe	95,085**	66,148**	210,906**	7,342**	232,064**	204,67**	21,244**	375,814**	57,060**	183,240**	86,71**	321,617**
Cultivar x Estirpe	5,095**	5,290**	13,618**	1,001ns	10,787**	13,360**	3,025*	30,798**	19,346**	12,962**	28,56**	73,238**
CV(Z)	7,89	6,60	8,94	6,84	4,98	6,97	4,87	3,10	5,27	4,55	4,36	5,88
												4,84 5,06

(**) significativo ao nível de 1%

(*) significativo ao nível de 5%

ns. não significativo

Apêndice 6

. Análise de variância do experimento III, mostrando o efeito de quatro cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. (V₁ nezucla-350, Aroana, Moruna e Carioca) inoculadas com três estirpes de *Rhizobium phaseoli* (C-05, C-89 e C-40). na redução de acetileno, evolução do hidrogênio e eficiência relativa dos elétrons destinados à nitrogenase. Plantas coletadas aos 25, 40 e 55 dias após a germinação.

Causa de Variação	F			
	Redução de C_2H_2 ($\mu\text{moles} \cdot \text{pl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Evolução de H_2 ($\text{pl}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Eficiência relativa	Redução de C_2H_2 ($\mu\text{moles} \cdot \text{g nod}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 25 dias				
Cultivar	500,990**	5995,806**	26,870**	631,572**
Estirpe	87,772**	266,779**	17,054**	102,938**
Cultivar x Estirpe	14,703**	39,482**	14,902**	20,880**
C.V. (%)	7,51	1,56	2,72	6,19
				7,11
				3,40
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 40 dias				
Cultivar	1880,339**	227140,932**	132,301**	957,918**
Estirpe	412,668**	7025,646**	315,510**	427,796**
Cultivar x Estirpe	40,668**	272,152**	7,574**	27,030**
C.V. (%)	3,14	0,18	1,11	4,28
				3,30
				1,83
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 55 dias				
Cultivar	179,222**	14904,216**	11,719**	220,948**
Estirpe	428,999**	32970,799**	32,513**	712,505**
Cultivar x Estirpe	43,893**	3719,668**	0,675ns	65,542**
C.V. (%)	7,88	0,55	3,84	6,46
				4,74
				6,37

(**) significativo ao nível de 1%

(*) significativo ao nível de 5%

ns não significativo

Apêndice 7

. Análise de variância do experimento IV mostrando o efeito de duas cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. (Carioca e Arcoana), inoculadas com três estirpes de *Rhizobium phaseoli* (C-05, C-88 e C-29) e sob três níveis de nitrogênio (0, 7 e 35 ppm de N), na produção de matéria seca, ZN e N total da parte aérea, raiz e nódulos. Plantas coletadas aos 25, 45 e 65 dias após a germinação.

Causa de Variação	F										
	parte aérea			raiz			nódulo			parte aérea + raiz + nódulo + vagem	
	M.S.	ZN	N total	M.S.	ZN	N total	M.S.	ZN	N total	M.S.	N total
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 25 dias											
Cultivar	87,669**	16,444**	240,94 **	68,386**	0,141ns	64,211**	4,430**	270,464**	16,464**	73,438**	193,569**
Estirpe	44,208**	74,206**	177,796**	43,142**	3,631*	36,586**	10,713**	199,958**	23,994**	54,164**	179,585**
Dose de N	27,360**	1,824ns	36,516**	0,124ns	0,461ns	0,853ns	14,856**	595,900**	16,464**	28,570**	31,913**
Cultivar x Estirpe	6,343**	6,656**	31,59 **	27,801**	42,295**	9,619**	43,068**	110,907**	39,043**	3,594*	24,387**
Cultivar x Dose de N	5,077**	11,553*	12,731**	8,285**	31,029**	22,708**	3,452**	18,159**	6,254**	6,330**	10,954**
Estirpe x Dose de N	2,573ns	20,353**	15,690**	15,705**	3,251ns	13,719**	3,517**	112,975**	5,268**	3,382*	14,062**
C.V. (Z)	9,22	4,17	7,20	10,34	5,75	9,98	8,89	2,00	8,90	7,71	6,33
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 45 dias											
Cultivar	349,354**	35,559**	306,51 **	21,465**	74,453**	30,675**	3,008ns	169,027**	0,06 ns	118,884**	323,390**
Estirpe	463,085**	360,359**	658,910**	20,906**	565,263**	57,431**	103,421**	191,217**	117,992**	131,486**	719,080**
Dose de N	79,584**	12,427**	81,504**	11,934**	161,638**	25,980**	16,419**	1559,450**	55,108**	30,598**	84,770**
Cultivar x Estirpe	72,105**	23,677**	19,782**	0,155ns	77,481**	0,536ns	8,248**	133,654**	15,894**	22,347**	18,616**
Cultivar x Dose de N	8,663**	2,287ns	12,862**	6,038**	6,474**	6,184**	4,457**	236,728**	5,098**	0,506ns	10,384**
Estirpe x Dose de N	5,407**	1,147ns	6,920**	4,001**	21,144**	4,605**	1,103ns	57,616**	3,784**	2,021ns	5,912**
C.V. (Z)	4,38	4,30	6,12	9,43	2,28	9,40	9,52	1,13	10,24	7,56	5,60
ÉPOCA DE AMOSTRAGEM = 65 dias											
Cultivar	616,835**	57,507**	473,825**	204,121**	153,146**	477,488**	484,634**	322,262**	679,538**	645,989**	775,781**
Estirpe	394,572**	119,397**	362,983**	30,641**	12,974**	59,536**	241,700**	670,675**	429,899**	453,891**	630,415**
Dose de N	36,177**	3,159ns	20,377**	4,664*	14,687**	20,647**	51,172**	260,705**	81,068**	106,446**	111,897**
Cultivar x Estirpe	4,979**	21,123**	33,929**	18,973**	0,467ns	28,517**	113,495**	103,37 **	138,003**	53,100**	86,082**
Cultivar x Dose de N	1,289ns	17,600**	2,691ns	4,035*	0,860ns	1,663ns	18,060**	9,137**	15,433**	1,179ns	2,952ns
Estirpe x Dose de N	4,272*	3,390**	1,764ns	0,423ns	3,194*	1,663ns	5,681**	48,930**	19,660**	4,013**	3,139*
C.V. (Z)	5,69	6,00	8,65	10,25	7,11	10,62	10,00	3,43	10,66	5,01	5,65

(**) significativo ao nível de 1%

(*) significativo ao nível de 5%

ns não significativo

Apêndice 8

. Análise de variância do experimento IV mostrando o efeito de duas cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. (Carioca e Aroana), inoculadas com três estirpes de *Rhizobium phaseoli* (C-05, C-88 e C-29) e recebendo três doses de nitrogênio (0, 7 e 35 ppm de N) na produção de matéria seca, da vagem, semente. Plantas coletadas aos 65 dias após a germinação.

Causa da variação	F					
	M.S. da vagem		semente		casca da vagem	
	M.S.	%N	M.S.	%N	M.S.	%N
N total						
Cultivar	136,870**	160,155**	8,855**	116,360**	0,000	4,506**
Estirpe	147,099**	124,376**	9,952**	134,163**	11,590**	17,357**
Dose de N	83,276**	68,301**	0,447ns	69,499**	8,760**	12,291**
Cultivar x Estirpe	48,048**	33,306**	3,153ns	27,411**	10,118**	5,440**
Cultivar x Dose de N	0,160ns	0,286ns	1,059ns	0,061ns	1,769ns	18,646**
Estirpe x Dose de N	2,908*	0,937ns	1,541ns	1,651ns	2,989**	3,866**
C.V. (%)	8,81	10,71	5,70	10,85	19,71	23,02
						16,75

(**) significativo ao nível de 1%

(*) significativo ao nível de 5%

ns não significativo