DISCRIMINAÇÃO ISOTÓPICA DO NITROGENIO ASSOCIADO A FIXAÇÃO
BIOLOGICA DO N₂ NO SISTEMA RHIZOBIUM X FEIJÃO
(PHASEOLUS VULGARIS L.)

PAULO MARCOS DA SILVA

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de concentração: Energia Nuclear na Agricultura.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Maio - 1989

DISCRIMINAÇÃO ISOTÓPICA DO NITROGÊNIO ASSOCIADO A FIXAÇÃO
BIOLOGICA DO N_2 NO SISTEMA RHIZOBIUM X FEIJÃO
(PHASEOLUS VULGARIS L.)

PAULO MARCOS DA SILVA
Químico

Orientador: Dra. SIU MUI TSAI

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de concentração: Energia Nuclear na Agricultura.

P I R A C I C A B A

Estado de São Paulo - Brasil

Maio - 1989

S586d Silva, Paulo Marcos da
Discriminação isotópica do nitrogênio associado a fixação biológica do N₂ no sistema Rhizobium x feijão (Phaseolus vulgaris L.). Piracicaba, 1989.
104p.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Bactéria fixadora de nitrogênio 2. Feijão - Fixação de nitrogênio 3. Fracionamento isotópico 4. Nitrogênio - Fixação 5. Nitrogênio em feijão I. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 635.652

DISCRIMINAÇÃO ISOTÓPICA DO NITROGÊNIO ASSOCIADO A FIXAÇÃO
BIOLOGICA DO N₂ NO SISTEMA RHIZOBIUM X FEIJÃO
(PHASEOLUS VULGARIS L.)...

PAULO MARCOS DA SILVA

Aprovado em 11.05.1989

Comissão julgadora:

Dra. Siu Mui Tsai

CENA/USP

Dr. Paulo Cesar Ocheuze Trivelin

CENA/USP

Prof. Dr. Reinaldo Luiz Victória

ESALQ/USP

Siu Mui Tsai

Orientadora

Aos meus pais e irmãos,
que sempre me
incentivaram

A minha esposa Jô e meu
filho Lucas por tudo que
representam para mim

DEDICO

AGRADECOS

.A Dra. Siu Mui Tsai, pela orientação, estímulo e amizade que nos foram demonstrados;

.Ao Dr. Paulo Cesar Ocheuze Trivelin, pela co-orientação, assistência nas análises de N-15 e discussão do trabalho;

.Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, na pessoa do Dr. Frederico Maximiliano Wiendl;

.A Seção de Microbiologia do Solo e Divisão de Ciências Ambientais, pela oportunidade de trabalho concedida;

.Aos amigos Marli, Beto, Verinha, Romildo, Lili, Regina, Wagner, pelo incentivo e amizade;

.Ao Chiquinho pela ajuda nas análises e amizade;

.A Eliane pela ajuda na datilografia, incentivo e amizade;

.Aos funcionários da Seção de Microbiologia do Solo, nas pessoas do Sr. Mario, Iraci e Márcio;

.Aos professores e colegas do Curso de Pós Graduação em Energia Nuclear na Agricultura;

.A NAS e CNEN, pelo suporte financeiro;

.A todos que de um modo ou outro, colaboraram para a execução deste trabalho.

SUMARIO

	Página
RESUMO	xii
SUMMARY	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Considerações gerais sobre os métodos para quantificar a FBN	4
2.2. Discriminação isotópica do nitrogênio.....	13
2.2.1. Variação na abundância em N-15 na planta	17
2.2.2. Fracionamento isotópico no processo de fixação biológica do N ₂ (β fix)	21
3. MATERIAL E METODOS	24
3.1. Efeito de cultivares no fracionamento isotópico da fixação simbiótica do N ₂	24
3.1.1. Plantas	24
3.1.2. Vasos	25
3.1.3. Estirpes de <u>Rhizobium leguminosarum</u> biovar <u>phaseoli</u>	26
3.1.4. Plantio e inoculação	27
3.1.5. Delineamento experimental	27
3.1.6. Condução do experimento	28
3.1.7. Colheita	28
3.2. Efeito da estirpe de <u>Rhizobium</u> no fracionamento	

isotópico da FBN	29
3.2.1. Planta	29
3.2.2. Vasos	30
3.2.3. Estirpe de <u>Rhizobium leguminosarum</u> biovar <u>phaseoli</u>	30
3.2.4. Condução do experimento	30
3.2.5. Colheita	31
3.3. Parâmetros avaliados	31
3.3.1. Massa de matéria seca	31
3.3.2. Determinação do teor de N	32
3.3.3. Determinação da razão isotópica N15/N14 e valores $\delta N-15$ (‰)	32
3.3.4. Fracionamento isotópico na translocação do N da semente	33
3.3.5. Fracionamento isotópico do N no processo de fixação do N2 atmosférico .	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1. Efeito de cultivares no fracionamento isotópico da fixação simbiótica do N2	37
4.1.1. Produção de matéria seca e acúmulo de nitrogênio	37
4.1.2. Discriminação isotópica	47
4.2. Efeito de estirpes de <u>Rhizobium</u> no fracionamento isotópico da fixação simbiótica do N2	67

4.2.1. Produção de matéria seca e acúmulo de nitrogênio	67
4.2.2. Discriminação isotópica	71
4.3. Aplicação do método da variação natural do N-15 utilizando o valor da fixação	78
5. CONCLUSÃO.....	83
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	85

LISTA DE TABELAS

TABELA	Página
1 Análise de nitrogênio (BREMNER & KEENEY, 1966) da vermiculita utilizada no experimento. Os dados representam média de 3 repetições.	25
2 Valores δN -15% determinados em amostras de feijão pelos métodos de hipobromito alcalino de Litio e combustão de Dumas.	34
3 Matéria seca das diferentes partes de três cultivares de feijão, inoculados com uma mistura de <u>Rhizobium</u> e crescidos em substrato livre de N.	38
4 Nitrogênio total das diferentes partes de três cultivares de feijão, inoculados com uma mistura de estirpes de <u>Rhizobium</u> e crescidos em substrato livre de N.	41
5 Nitrogênio derivado da fixação (Ndfix) em três cultivares de feijão, crescidos em substrato livre de N e inoculados com uma mistura de estirpes de <u>Rhizobium</u> .	44
6 Matéria seca, nitrogênio total e abundância	

TABELA

Página

	natural das sementes dos três cultivares de feijão, utilizados no plantio dos experimentos. Média de 5 repetições.	46
7	Valores $\delta N-15$ nas diferentes partes dos três cultivares de feijão, crescidos em substrato livre de N e inoculados com uma mistura de estirpes de <u>Rhizobium</u> .	48
8	Valores $\delta N-15$ nos cotilédones + tegumentos dos tres cultivares de feijão, crescidos em solução livre de N.	58
9	Valores $\delta N-15$ do nitrogênio derivado da fixação na planta de feijão, nos estádios V2, V4, R6 e R8, crescida em solução livre de N.	61
10	Fracionamento isotópico da fixação (β_{fix}) em três cultivares de feijão, considerando a abundância natural de semente ($-\delta_{sem}$) e desprezando a contribuição do N-15 da semente ($+\delta_{sem}$).	64
11	Fracionamento isotópico na translocação do N da semente (β_{sem}) para a planta, na caída dos cotilédones, em três cultivares de feijão não	

TABELA

Página

	inoculados, cultivados em solução livre de N.	66
12	Matéria seca do feijoeiro cv. MEX-309, no estágio R8, crescido em substrato livre de N e inoculado com diferentes estirpes de <u>Rhizobium</u>	68
13	N-total nas diferentes partes do feijoeiro cv. MEX-309 no estágio R8, crescido em substrato livre de N e inoculado com diferentes estirpes de <u>Rhizobium</u> .	70
14	N-total e N derivado da fixação (Ndfix) no feijão cv. MEX-309, no estágio R8, crescido em substrato livre de N e inoculado com diferentes estirpes de <u>Rhizobium</u> .	72
15	Valores $\delta N-15\%$ nas diferentes partes do feijão cv. MEX-309 no estágio R8, crescido em substrato livre de N e inoculado com diferentes estirpes de <u>Rhizobium</u> .	74
16	Valores $\delta N-15\%$ do N derivado da fixação, no feijão cv. MEX-309 no estágio R8, crescido em substrato livre de N e inoculado com diferentes estirpes de <u>Rhizobium</u> .	79

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Página
1 Esquema do mecanismo de enriquecimento em N-15 nos nódulos de leguminosas transportadoras de ureidos, segundo KOHL et alii (1982).	51
2 Correlação entre a abundância em N-15 dos nódulos de feijão ($\delta N-15$) e eficiência das estirpes em fixar N ₂ (mg de N fixado/mg de N no nódulo).	75
3 Correlação entre abundância em N-15 dos nódulos de feijão ($\delta N-15$) e quantidade de N acumulado nos nódulos (mgN/planta).	77

DISCRIMINACAO ISOTOPICA DO NITROGENIO ASSOCIADO COM FIXACAO
BIOLOGICA DO N₂ NO SISTEMA *Rhizobium* X FEIJAO
(*Phaseolus vulgaris* L.)

Autor: PAULO MARCOS DA SILVA

Orientador: PROF. DRA. SIU MUI TSAI

RESUMO

Com a finalidade de se estudar o fracionamento isotópico do nitrogênio no processo de fixação biológica do N₂, no sistema *Rhizobium*-feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), foram instalados dois experimentos em casa de vegetação, com delineamento inteiramente casualizado.

O primeiro ensaio foi conduzido a fim de verificar o efeito de três cultivares de feijão, inoculados com uma mistura de estirpes de *Rhizobium*, na discriminação isotópica do N, em quatro estádios de desenvolvimento do feijoeiro. O outro ensaio, foi realizado para observar se essa discriminação é dependente da estirpe de *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*.

As plantas de ambos os experimentos,

creceram em substrato livre de N, com 5 repetições. Em cada amostragem foi analisado o valor $\delta N-15\%$ dos nódulos, raiz, parte aérea, cotilédone e vagem, separadamente.

Os resultados obtidos permitiram as seguintes conclusões: no processo de fixação biológica de N_2 no feijoeiro, ocorre a discriminação isotópica do nitrogênio com uma pequena preferência pelo N-14, cujo nível aumenta com a idade da planta atingindo, no estágio R8, valor médio de δ_{fix} igual a 1,0015; quando analisada a parte aérea da planta, o fracionamento isotópico não é influenciado pelo cultivar e/ou estirpe de Rhizobium; os nódulos do feijão são mais ricos em N-15 que os demais tecidos da planta com valor $\delta N-15$ médio igual a 9,70 % contra 4,33 % da raiz e -2,03 % da parte aérea e, este enriquecimento está correlacionado diretamente com o N total do nódulo e inversamente com a eficiência do Rhizobium; no estágio R8 a vagem é cerca de 1% mais rica em N-15, do que folhas + ramos; o fracionamento isotópico na translocação do N da semente não influencia a composição isotópica da planta inteira.

ISOTOPIC DISCRIMINATION OF NITROGEN ASSOCIATED WITH
BIOLOGICAL NITROGEN FIXATION ON THE SYSTEM
Rhizobium X BEANS (Phaseolus vulgaris L.)

Author: PAULO MARCOS DA SILVA

Adviser: DR. SIU MUI TSAI

SUMMARY

In order to study the isotopic fractionation of nitrogen on the biological N₂ fixation process in the system Rhizobium x beans (Phaseolus vulgaris), two experiments were carried out in the greenhouse using a complete randomized experimental design.

The first experiment was designed to assess the effect of three bean cultivars, inoculated with a mixture of efficient Rhizobium strains on the isotopic N discrimination at four development stages of beans plants. The second experiment was carried out to verify if there is any discrimination caused by the Rhizobium strains used.

The plants of both experiments were grown in a N free medium, with 5 replicates. At the harvesting, $\delta N-15\%$ was determined in the following parts of the bean plants: nodules, roots, shoots, cotyledons and pods.

The results allowed to conclude that during the biological N₂ fixation on the bean plants, there is isotopic discrimination of nitrogen with slightly preference for the N-14, increasing its level as the plant aged, resulting in an average β_{fix} value 1.0015 at R8 plant stage; in the analysis of shoot bean plants the isotopic fractionation does not show any influence due bean cultivars and/or Rhizobium strains; there is a higher N-15 content in the nodule tissues than other plant parts, having an average $\delta N-15$ value 9.70 ‰. while the root and shoot have a value 4,33 ‰. and -2.03 ‰., respectively. The nodule N-15 value is directly related with the nodule total N and inversely related with the Rhizobium efficiency; in the R8 plant stage the pod is 1‰ richer in N-15 level than the shoot; the small isotopic fractionation that occurred during N translocation from the cotyledons, does not affect the isotopic composition of all plant.

1. INTRODUÇÃO

A fixação do nitrogênio atmosférico por microrganismos tem despertado a atenção de muitos pesquisadores, de diversas partes do mundo. Na agricultura, o conhecimento do potencial de fixação em sistemas simbióticos ou não, pode promover uma diminuição nos custos de produção de alimentos básicos, através do aumento da eficiência do processo em culturas de interesse econômico. Assim, torna-se crescente o interesse em se estudar o fenômeno da fixação biológica de nitrogênio (FBN).

Diversos métodos têm sido desenvolvidos para quantificar a FBN. Todos eles apresentam suas dificuldades em maior ou menor escala, porém é necessário utilizar um método que apresente valores integrados da FBN durante todo o período de crescimento da cultura. Dentre os métodos disponíveis na literatura, aqueles empregando o princípio da diluição isotópica são os mais estudados para esse propósito. Muitas pesquisas foram desenvolvidas empregando o método de FRIED & MIDDELBOE (1977), com aplicação de fertilizante nitrogenado marcado com N-15, ou marcando-se o

solo com N-15 (LEGG & SLOGER, 1975).

A variação natural da razão N-15/N-14 (δ N-15) é um método que vem ganhando destaque entre os demais, pois utiliza a diferença da abundância natural do N-15 entre as plantas fixadoras e não fixadoras (RENNIE et alii, 1976; KOHL et alii, 1979). A grande desvantagem desse método em relação ao uso de compostos enriquecidos, é a pequena diferença existente entre a abundância em N-15 da planta fixadora e não fixadora, geralmente menor que 10%. Em consequência o erro das medidas torna-se importante, assim como o fracionamento isotópico do N proveniente da atmosfera e de outras fontes, os quais podem inferir em erro significativo na estimativa da FBN.

Algumas equações foram deduzidas para estimar a FBN pelo método da variação natural do N-15, porém somente a equação proposta por TRIVELIN et alii (1984) leva em consideração o fracionamento isotópico na assimilação do N das diferentes fontes e a contribuição do N da semente utilizada na semeadura. Outras equações, como a utilizada por KOHL & SHEARER (1980), não consideram nenhum fracionamento isotópico, outras consideram somente o da FBN (MARIOTTI et alii, 1983). Evidentemente, os valores de N fixado serão semelhantes, quando calculados por quaisquer das equações, desde que não ocorra discriminação isotópica durante o desenvolvimento da

cultura em estudo.

Desta forma, visando contribuir com o desenvolvimento do método por variação natural do N-15 na quantificação da FBN, é objetivo do trabalho estudar:

- a. Se ocorre algum fracionamento isotópico significativo durante a fixação de N pelo sistema feijão-Rhizobium, e se este fracionamento é dependente do cultivar de feijão.
- b. Se a abundância em N-15 varia nas diferentes partes da planta.
- c. Se diferentes estirpes de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli influenciam a abundância em N-15 nos diferentes tecidos do feijoeiro.
- d. Se ocorre algum fracionamento isotópico na translocação do N da semente até a queda dos cotilédones.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Considerações gerais sobre os métodos para quantificar a FBN

Estudos sobre a fixação biológica do N_2 tiveram avanços consideráveis com a descoberta de substratos alternativos para a enzima nitrogenase. DILWORTH (1966) e SCHOLLHORN & BURRIS (1966) descobriram que o acetileno era reduzido pela enzima, produzindo etileno. HARDY & KNIGHT (1967) sugeriram uma nova técnica para medir a atividade da nitrogenase, através desta reação. Desde então, muitos trabalhos com enfoque em FBN foram desenvolvidos. Recentemente, entretanto, MINCHIN et alii (1983), descobriram através de um sistema de fluxo contínuo de acetileno que o sistema radicular de muitas leguminosas noduladas apresentavam uma inibição na atividade da enzima nitrogenase devido a presença de acetileno. O mecanismo que permite essa inibição não foi entendido até agora, porém fica claro que esta descoberta compromete seriamente a técnica de redução de acetileno, bem como uma grande

quantidade de trabalhos publicados na literatura.

Outra técnica, bastante simples e barata, é o método da diferença, que baseia-se na diferença do teor de N entre plantas fixadoras e não fixadoras (controle) crescendo em meio deficiente em N. A diferença é atribuída ao N derivado da fixação (LEGG & SLOGER, 1975; WILLIAMS et alii, 1977; BODDEY et alii, 1983). Alguns trabalhos têm demonstrado uma alta correlação entre o N estimado por este método e outros realizados, inclusive, com o uso de N-15 (LEGG & SLOGER, 1975; BROADBENT et alii, 1982; MARTENSSON & LJUNGGREN, 1984; PHILLIPS et alii, 1983). A precisão desta metodologia é entretanto, fortemente afetada pela planta controle, que teria que absorver o N do solo em iguais quantidades à fixadora. Segundo RENNIE & KEMP (1983), as plantas controles podem absorver mais N do solo do que a planta fixadora. No entanto, RENNIE & RENNIE (1983) e RUSCHEL et alii (1979) demonstraram que a planta fixadora absorveram mais N do solo do que a não fixadora. Por outro lado TALBOT et alii (1985) mostram a igual utilização do N por ambas as plantas. Desta forma, o método da diferença do N-total é mais apropriado para estudos preliminares em áreas sob condições de baixa fertilidade em N, ou onde não seja possível utilizar técnicas com N-15.

O balanço de N no sistema solo-planta é uma outra técnica utilizada para quantificar a FBN. O método

envolve mudanças líquidas no teor de N dentro de um sistema fixador de N. Qualquer ganho é atribuído à FBN (GREENLAND, 1977; DART & WANI, 1982). No entanto, a limitação do método está no fato de ser indireto, estimado através de medidas independentes. Com isso o método torna-se trabalhoso, com erro analítico muito alto, já que cada medida tem seu próprio erro e, acumulados, diminuem a exatidão e precisão do método. Também devido ao alto conteúdo em N-total no solo, um pequeno erro na sua estimativa representa muitos quilogramas de N; assim a quantidade de N introduzida no sistema via FBN tem que ser muito grande para que possa ser detectada por este método. Estimativas mais seguras, por este método, podem, no entanto, serem obtidas através de experimentos de longa duração, como aqueles desenvolvidos por MOORE (1966).

De acordo com DANSO et alii (1986) os métodos anteriormente citados não satisfazem estudos realizados no campo, sendo necessário lançar mão dos métodos isotópicos.

Desde que o N_2 atmosférico é o substrato para a FBN, a incorporação de N_2 marcado com o isótopo N-15 nos tecidos das plantas proporciona um método direto para avaliar a quantidade de N_2 fixado. Esta técnica foi utilizada pela primeira vez por BURRIS & MILLER (1941), porém também não é fácil de ser empregada em experimentos

de campo, devido a dificuldade de se marcar toda a atmosfera (FRIED et alii, 1983; DANSO et alii, 1986). Seu uso, portanto, tem sido restringido para estudos em câmaras fechadas (De-POLLI et alii, 1977; WITTY & DAY, 1978; MATSUI et alii, 1981; SAITO, 1978) ou marcando-se a atmosfera do solo em estudos de vasos (TRIVELIN, 1982).

Pela diferença existente no enriquecimento em N-15 entre o solo e a atmosfera (técnica da abundância natural de N-15 - δ N-15) ou pela indução artificial dessa diferença através da adição de fertilizantes enriquecidos ou empobrecidos em N-15 no solo, tem sido possível estimar no campo a quantidade de N derivado da fixação (McAULIFFE et alii, 1958; VALLIS et alii, 1967; FRIED & BROESHART, 1975; FRIED & MIDDELBOE, 1977; LEGG & SLOGER, 1975; KOHL & SHEARER, 1981; BERGERSEN & TURNER, 1983; HEICHEL et alii, 1985; SAITO et alii, 1987).

De acordo com CHALK 1985, mais de 50 trabalhos foram publicados, desde 1975, envolvendo a adição de material enriquecido e empobrecido no solo. A importância dessa técnica se dá pela sua aplicabilidade no campo e capacidade de exprimir valores integrados do N₂ fixado durante todos os estádios de crescimento da planta. A quantificação da FBN em leguminosas, usando fertilizante marcado com N-15 foi bastante discutido por RENNIE et alii (1978); VOSE et alii (1978); DANSO et alii (1986); BODDEY

et alii (1987). Embora o uso deste método já tenha sido bastante testado, existem limitações para sua aplicação em condições de campo (VOSE & VICTORIA, 1983).

O método da variação da abundância natural do N-15 ($\delta N-15$), como citado anteriormente, representa talvez a única alternativa viável para tal propósito (TRIVELIN et alii 1984). A técnica baseia-se na diferença da composição isotópica do N entre o solo e a atmosfera. Assim, plantas fixadoras de N₂ apresentam uma abundância de N-15 diferente de plantas não fixadoras, quando cultivadas em um mesmo local (DELWICHE & STEYN, 1970; AMARGER et alii, 1977; AMARGER et alii, 1979). Devido às fixadoras apresentarem menor concentração de N-15 em relação às não fixadoras, foi proporcionado o uso dessas variações para estimar o N derivado da fixação (RENNIE et alii, 1976; RUSCHEL et alii, 1979; VIRGINIA & DELWICHE, 1982; RENNIE & KEMP, 1983).

Medidas na abundância natural do N-15 para determinar a fixação simbiótica do N₂ exige que: (a) exista uma diferença isotópica constante e mensurável entre o nitrogênio atmosférico e o nitrogênio derivado do solo; (b) as plantas fixadoras e não fixadoras assimilem o N do solo de mesma composição isotópica; (c) a magnitude da discriminação isotópica associada com a fixação de N₂ seja conhecida; (d) qualquer discriminação isotópica que ocorra

durante a absorção, armazenamento ou translocação do N derivado do solo seja a mesma para ambas as plantas; (e) não ocorra nenhuma transferência direta de N da planta fixadora para a planta não fixadora.

A grande desvantagem deste método é a pequena diferença isotópica que existe entre o N₂ atmosférico e o N do solo, que pode causar erros significativos na quantificação do N₂ fixado. Devido à essas pequenas diferenças, os valores são expressos em unidades ‰, isto é δN-15‰ e:

$$\delta N-15\text{‰} = \left[\frac{R_a}{R_{ar}} - 1 \right] \times 1000 \quad \dots\dots\dots(1)$$

onde R = razão N-15/N-14 e os subscritos significam:

a = amostra

ar = ar atmosférico

Através do valor δN-15‰ é possível determinar a quantidade de N derivado do ar nas leguminosas. Segundo KOHL & SHEARER (1980), a equação para esta determinação é:

$$\%N_{\text{fix}}^{\text{ar}} = \left[1 - \frac{\delta_{\text{fix}}}{\delta_{\text{cont}}} \right] \times 100 \quad \dots\dots\dots(2)$$

onde $\%N_{\text{fix}}^{\text{ar}}$ = fração do nitrogênio na planta fixadora proveniente do ar atmosférico.

δfix = valor $\delta \text{N-15\%}$ da planta fixadora.

δcont = valor $\delta \text{N-15\%}$ da planta não fixadora.

A equação utilizada por BERGERSEN & TURNER (1983) e SHEARER et alii (1983) para calcular o N da fixação foi:

$$\frac{\text{ar}}{\% \text{N}_{\text{fix}}} = \frac{\delta \text{cont} - \delta \text{fix}}{\delta \text{cont} - B} \times 100 \quad \dots\dots\dots (3)$$

onde B é o valor $\delta \text{N-15\%}$ do N fixado na planta fixadora crescendo em substrato livre de N.

MARIOTTI et alii (1983) utilizaram a mesma equação para determinar o N_2 fixado, porém substituíram o valor $\delta \text{N-15\%}$ do N fixado pelo valor do fracionamento isotópico ocorrido no processo (βfix), resultando na seguinte equação:

$$\frac{\text{ar}}{\% \text{N}_{\text{fix}}} = \frac{\delta \text{cont} - \delta \text{fix}}{\delta \text{cont} - \left[\frac{1}{\beta \text{fix}} - 1 \right]} \times 100 \quad \dots\dots\dots (4)$$

Recentemente TRIVELIN et alii (1984) considerando o N da semente, determinaram o N derivado da fixação em diferentes cultivares de feijão, pela seguinte equação:

$$\frac{\delta N}{\delta N_{fix}} = \frac{\left[\delta_{cont} - \left(\delta_{smcont} + 1 \right) \cdot \frac{N_{sm}}{N_{cont}} + 1 \right] \frac{\left(1 - \frac{N_{sm}}{N_{fix}} \right)}{\left(1 - \frac{N_{sm}}{N_{cont}} \right)} + \left(\delta_{smfix} + 1 \right) \cdot \frac{N_{sm}}{N_{fix}} - 1}{\left[\delta_{cont} - \left(\delta_{smcont} + 1 \right) \cdot \frac{N_{sm}}{N_{cont}} + 1 \right] \frac{1}{\left(1 - \frac{N_{sm}}{N_{cont}} \right)} - \frac{1}{\beta_{fix}}} \times 100 \quad \dots (5)$$

onde δ_{smcont} = valor $\delta N-15\%$ da semente da planta controle utilizada no plantio.

δ_{smfix} = valor $\delta N-15\%$ da semente da planta fixadora utilizada no plantio.

$\frac{N_{sm}}{N_{cont}}$ = fração do N da planta controle proveniente da semente.

$\frac{N_{sm}}{N_{fix}}$ = fração do N da planta fixadora proveniente da semente.

Através das equações 2, 4 e 5, TRIVELIN et alii 1984 compararam os valores da fixação de N no feijoeiro e observaram diferentes resultados, dependendo da equação utilizada. Os valores da FBN foram superestimados quando calculados pela equação 2 e sempre menores quando calculados pelas equações 4 e 5. Os autores salientaram

neste trabalho a importância de se considerar a contribuição do N da semente no balanço isotópico e o fator de fracionamento isotópico da fixação (β_{fix}). Ainda deduziram uma equação geral para se determinar o N da fixação por este método, onde foram incluídos os possíveis fracionamentos isotópicos que possam ocorrer durante o desenvolvimento da planta:

$$\frac{\delta_{ar}}{\delta_{fix}} = \frac{\left[\delta_{cont} - (\delta_{scont} + 1) \frac{\frac{S_B}{N_{cont}}}{\beta_4} + 1 \right] \frac{\beta_2 \left(\frac{S_B}{1-N_{fix}} \right)}{\beta_1 \left(\frac{S_B}{1-N_{fix}} \right)} + (\delta_{sfix} + 1) \frac{\frac{S_B}{N_{fix}}}{\beta_3} - \delta_{fix} - 1}{\left[\delta_{cont} - (\delta_{scont} + 1) \frac{\frac{S_B}{N_{cont}}}{\beta_4} + 1 \right] \frac{\beta_2}{\beta_1 \left(\frac{S_B}{1-N_{cont}} \right)} - \frac{1}{\beta_{fix}}} \times 100 \quad (6)$$

onde β_1 = fracionamento isotópico na absorção do N do solo pela planta fixadora.

β_2 = fracionamento isotópico na absorção do N do solo pela planta não fixadora.

β_3 = fracionamento isotópico na translocação do N da semente para a planta fixadora.

β_4 = fracionamento isotópico na translocação do N da semente para a planta não fixadora.

2.2. Discriminação isotópica do nitrogênio

Dentre as suposições feitas para que o método da variação natural do N-15 seja válido, a discriminação isotópica na assimilação do N do solo ou atmosfera à planta tem relevada importância, pois implica na modificação de suas razões isotópicas (KOHL & SHEARER, 1980; MARIOTTI et alii, 1980). Segundo HAUCK & BRENNER, (1976), a suposição básica para pesquisas de FBN, utilizando isótopos, é que não ocorra discriminação entre os isótopos N-14 e N-15 pelos sistemas fixadores. No entanto, o que se tem visto na literatura é a ocorrência de discriminação isotópica nas diversas reações químicas e bioquímicas, envolvendo os isótopos de nitrogênio (HERMES et alii, 1985; MARIOTTI et alii, 1982; WELLMAN et alii, 1968; DELWICHE & STEYN, 1970; KOHL & SHEARER, 1980; YONEYAMA et alii, 1984).

Essa discriminação proporciona o chamado fracionamento isotópico (β), simbolizado por MARIOTTI et alii (1981) como α , que é igual a $1/\beta$. Desta forma o fracionamento isotópico (β) é a taxa de reação das moléculas leves dividida pela taxa de reação das moléculas pesadas, normalizada pela concentração dos dois tipos de moléculas. Para o nitrogênio:

$$\beta = \frac{d[N-14]}{dt} / [N-14] \div \frac{d[N-15]}{dt} / [N-15] \dots\dots\dots (7)$$

Para um reservatório finito considerando uma reação unidirecional (caso da translocação do N do cotilédone para a planta), SHEARER (1984) propõe a definição do fator de fracionamento a partir da fórmula de MARIOTTI et alii (1981), modificada:

$$\beta = \frac{(\delta N-15\text{‰})_{s,0} - (\delta N-15\text{‰})_{s,t}}{1000 \ln f} + 1 \dots\dots\dots (8)$$

sendo $(\delta N-15\text{‰})_{s,0}$ = abundância natural de N-15 do substrato, no tempo inicial.

$(\delta N-15\text{‰})_{s,t}$ = abundância natural de N-15 do substrato, no tempo final.

$f = N_{s,t}/N_{s,0}$ = fração não reagida do N do substrato após um tempo t.

Para um reservatório infinito, onde a composição isotópica do substrato permanece constante, como no caso da fixação de N_2 , o β é dado pela equação:

$$\beta = \frac{(N-15/N-14)_{\text{substrato}}}{(N-15/N-14)_{\text{produto}}} \dots\dots\dots (9)$$

O fracionamento isotópico pode ocorrer em

processos físicos, tais como: difusão (FARQUHAR et alii, 1983; O'LEARY, 1984), equilíbrio entre a amônia e o ion amônio (HERMES et alii, 1985), volatilização da amônia (MARIOTTI et alii, 1982), troca de ions nitrato e amônio, e fixação de NH_4^+ no solo (KARAMANOS & RENNIE, 1979; DELWICHE & STEYN, 1970).

Em processos biológicos também pode ocorrer o fracionamento isotópico do N. A nitrificação estudada por DELWICHE & STEYN (1970), DOMENACH & CHALAMET (1977), MARIOTTI et alii (1981), apresentou valores de β que variaram entre 1,00 e 1,04. A denitrificação, estudada por WELLMAN et alii (1968), DELWICHE & STEYN (1970), CHIEN et alii (1977), BRYAN et alii (1983) e MARIOTTI et alii (1981), apresentou valores entre 1,00 e 1,03, os quais dependeram da concentração de células, receptores e doadores de elétrons e da temperatura.

O conhecimento do grau de fracionamento isotópico do N durante os processos de fixação e metabolismo do N_2 e translocação, são essenciais no uso do método da variação natural do N-15. O processo de assimilação do N do solo e translocação do N da semente, não apresentam um β que possa causar problemas neste método. Este fato foi comprovado experimentalmente por MARIOTTI et alii (1980), que mediram o fracionamento isotópico na assimilação do nitrato por 38 espécies de

plantas, cujo valor médio foi de $1,00025 \pm 0,00011$. De acordo com MARIOTTI et alii (1982), essa discriminação depende da concentração de nitrato e idade da planta, e, plantas crescendo com alta intensidade luminosa e moderada concentração de nitrato, o fracionamento é praticamente nulo.

BARAIBAR et alii (1985) não encontraram fracionamento isotópico na translocação do N da semente (β_{sem}) para a planta de feijão crescida em substrato livre de N e não inoculada com Rhizobium. O valor de β_{sem} encontrado pelos autores foi de 0,9999.

No entanto, pequenas alterações na composição isotópica no tecido da planta, causada pela translocação e assimilação, podem ocorrer tanto na planta fixadora como na controle (não fixadora), não causando erro significativo na quantificação da FBN, desde que ambas as plantas se desenvolvam nas mesmas condições.

TRIVELIN et alii (1984) utilizaram o valor de β_{sem} igual a 1,00 para demonstrar a importância da contribuição do N da semente na planta, e apresentaram valores superestimados da FBN quando não consideraram esta fonte de N. Estes resultados, porém, foram comprometidos pelo mau desenvolvimento do feijoeiro, tanto que o N da semente representou cerca de 14% da quantidade total de N da planta.

2.2.1. Variação na abundância em N-15 na planta

A distribuição do N-15 nos diferentes tecidos da planta, está associada à discriminação isotópica do N no metabolismo e translocação deste elemento na planta. Segundo SHEARER & KOHL (1986) não existe, a priori, nenhuma razão para acreditar que o N-15 deveria ser distribuído homogeneamente nos diferentes tecidos da planta. De fato muitos pesquisadores têm reportado variações no $\delta N-15\%$, entre os tecidos das plantas (SHEARER et alii, 1980; SHEARER et alii, 1983; STEELE et alii, 1983; KOHL et alii, 1983; SHEARER et alii, 1984; YONEYAMA et alii, 1986; YONEYAMA et alii, 1987).

A distribuição do N-15 nos tecidos de soja nodulada e não nodulada, crescidas em casa de vegetação e no campo, foi estudada por SHEARER et alii (1980). A variação na abundância em N-15 entre os tecidos não nodulares, não foi maior que 2%, e os autores não encontraram nenhuma evidência de que os $\delta N-15$ variassem, nestes tecidos, com a idade da planta.

YONEYAMA et alii (1986) estudando a soja, bem como outras leguminosas, encontraram pouca diferença nos valores $\delta N-15$ entre os tecidos não nodulares, e, a parte aérea das leguminosas apresentaram menor abundância em N-15 do que o N₂ atmosférico, principalmente para as

plantas transportadoras de ureídos.

O caule das leguminosas, embora não apresentem diferenças drásticas, geralmente são menos abundantes em N-15 do que as folhas. No trabalho de SHEARER et alii (1980), os caules de soja não nodulante apresentaram valor δ N-15 igual a -2,2%, e as folhas igual a +1,4%. SHEARER et alii (1984) reportaram valores δ N-15 de -1,1% para o caule e -0,1% para as folhas de soja nodulada. Esta pequena diferença também foi encontrada em soja nodulante e outras leguminosas por YONEYAMA et alii (1986), com valor δ N-15 igual a -1,77% e -1,21% para o caule e folha de soja, respectivamente.

Em Phaseolus vulgaris, o enriquecimento em N-15 no caule, parece ser dependente do cultivar. YONEYAMA et alii (1984), observaram valores de -0,6% no caule, contra +2,2% na folha do cultivar Shakugosun. Dados opostos foram encontrados para o cultivar Nagauzura com +2,8% no caule e 0% na folha. O empobrecimento em N-15 no caule foi diretamente proporcional à quantidade de ureído encontrado neste tecido.

Apesar das diferenças na abundância em N-15 entre o caule e folhas das leguminosas serem pequenas, SHEARER et alii (1983) mostram um exemplo de Prosopis glandulosa, onde o caule foi 3,4% menos enriquecido que a planta inteira.

As raízes das leguminosas são, geralmente, mais abundantes em N-15 do que a parte aérea (SHEARER et alii, 1984; STEELE et alii, 1983), porém não superiores a 2 δ N-15(‰).

Em vagens de soja nodulante, SHEARER et alii (1980) encontraram valor δ N-15 igual a -0,2‰, que foi ligeiramente superior aos das folhas (-1,5‰). Porém, em soja não nodulante os resultados foram inversos, com -1,5‰ na vagem e +1,4‰ na folha. Para o feijoeiro, YONEYAMA et alii (1984), observaram menor abundância em N-15 nas vagens do que nas folhas, em dois cultivares estudados.

Contrastando com a relativa homogeneidade isotópica entre os tecidos não nodulares, os nódulos de algumas leguminosas são altamente enriquecidos em N-15, quando comparados com os demais tecidos da planta, chegando a valores N-15 superiores a 10‰ (KOHL et alii, 1979; SHEARER et alii, 1980; MARIOTTI et alii, 1982; TURNER & BERGERSEN, 1983; VIRGINIA et alii, 1984; YONEYAMA et alii, 1986).

SHEARER et alii (1982), trabalhando com leguminosas transportadoras de ureidos e de amidas, concluíram que o enriquecimento em N-15 nos nódulos ocorrem em plantas transportadoras de ureidos, enquanto que, as transportadoras de amidas não apresentam este

enriquecimento. Concluíram ainda que este enriquecimento depende da atividade do Rhizobium em fixar N₂.

No entanto, STEELE et alii (1983), relataram o enriquecimento em N-15 nos nódulos de trevo e Lotus, os quais são transportadores de amidas, e não encontraram nenhuma correlação entre eficiência e enriquecimento dos nódulos. Esses autores sugerem que o enriquecimento em N-15 dos nódulos, seja uma característica dependente da estirpe de Rhizobium, a qual pode ser alterada pela planta hospedeira.

YONEYAMA et alii (1984), mostraram alguns resultados que concordam com SHEARER et alii (1982), com nódulos de plantas transportadoras de ureidos, altamente enriquecido em N-15, porém os nódulos do trevo também foram enriquecidos. TURNER & BERGERSEN (1983), encontraram este enriquecimento em nódulos de Lupinus luteus, e no entanto esta é uma espécie transportadora de asparagina.

Através dos dados apresentados nos trabalhos de YONEYAMA et alii (1987) e YONEYAMA et alii (1986), fica claro que as leguminosas não transportadoras de ureidos podem ter seus nódulos enriquecidos em N-15, como foi o caso do amendoim com valor $\delta N-15$ de +1,9‰ e do trevo vermelho com +2,25‰. Porém estes níveis de enriquecimento são bem menores do que aqueles nos nódulos de plantas transportadoras de ureidos, como, por exemplo o

caupi com valor $\delta N-15$ de +8,7%. e Desmodium +9,3%. .

Portanto, a produção de ureídos em nódulos, não é um pré-requisito para o enriquecimento destes em N-15.

2.2.2. Fracionamento isotópico no processo de fixação biológica do N_2 (β fix).

O fracionamento isotópico do nitrogênio associado à fixação do N_2 foi determinado pela primeira vez por HOERING & FORD (1960), em culturas de Azotobacter. Os autores encontraram diferentes valores de β fix, dependendo da espécie desse microrganismo. Para o Azotobacter agile o valor encontrado foi de 1,0015, para o Azotobacter chroococcum foi de 1,0007, para Azotobacter indicum foi de 0,9963 e Azotobacter vinelandii de 1,0022. Outros autores encontraram valores diferentes no fracionamento isotópico do Azotobacter. vinelandii, como 1,0039, reportado por DELWICHE & STEYN (1970) e 1,0024 por MARIOTTI et alii (1980). Esta diferença, segundo SHEARER & KOHL (1986), é resultado do erro na determinação do valor $\delta N-15$, devido ao padrão de trabalho não ser comum à todos os laboratórios.

Após estes trabalhos, outros foram publicados na literatura medindo o efeito isotópico no processo de fixação biológica do N_2 , em sistemas

simbióticos do tipo leguminosa-Rhizobium.

Os dados relativos à discriminação isotópica na fixação do N₂, no sistema soja-Bradyrhizobium, são bastante contraditórios. Analisando somente a parte aérea, MARIOTTI et alii (1980), encontraram valores de β_{fix} variando entre 1,0012 e 1,0016, os quais foram dependentes do cultivar de soja utilizado. DOMENACH & CORMAN (1984) reportaram valores de 1,0036. Entretanto, KOHL & SHEARER (1980) trabalhando com plantas inteiras de soja, crecidas em substrato livre de N, observaram uma leve preferência pelo N-15, com fracionamento isotópico de 0,9990. Nestas mesmas condições, REINERO et alii (1983), apresentaram dados contrários a estes, iguais a 1,0005. YONEYAMA et alii (1986), observaram um valor de 1,0010, enquanto SHEARER et alii (1984), não encontraram fracionamento isotópico no processo de fixação, na soja.

Estas diferenças podem ter ocorrido (além do padrão, citado anteriormente) devido às diferenças nos tecidos selecionados para as medidas do $\delta N-15$. Por exemplo, a abundância em N-15 da planta inteira está mais próxima da abundância do N₂ atmosférico, do que está a parte aérea da soja. Portanto, para diminuir o erro na estimativa da FBN, é necessário que todos os valores $\delta N-15$ sejam medidos com respeito a um mesmo padrão, e que o valor $\delta N-15$ do N fixado seja realizado no mesmo tecido que for usado para medir o

N-15 da planta fixadora e planta controle.

Poucos dados estão disponíveis na literatura, com respeito ao fracionamento isotópico no processo de fixação no sistema Rhizobium-feijão. MARIOTTI et alii (1980), trabalharam com dois cultivares de feijão desenvolvidos em substrato livre de N. Após dois meses da semeadura, eles analisaram a parte aérea do feijoeiro e encontraram um valor de β_{fix} igual a 1,0020 para o cultivar Contender e 1,0018 para o cultivar Hodgson. YONEYAMA et alii (1986), também analisando a parte aérea de 3 cultivares de feijão, encontraram valores de β_{fix} entre 1,0018 e 1,0032 dependendo da estirpe de Rhizobium. A mesma dependência da estirpe no valor $\delta N-15$, STEELE et alii (1983), encontraram na parte aérea de Lotus e Siratro.

SHEARER & KOHL (1986), apresentaram uma lista de autores com seus respectivos trabalhos e resultados de fracionamento isotópico da fixação. A maioria dos valores β_{fix} estavam situados entre 0,998 e 1,002, cuja variação mostra uma dependência da espécie de planta, do cultivar e da estirpe de Rhizobium. A média dos β_{fix} foi de 1,0008, confirmando desta forma a preferência pelo N-14 nos sistemas simbióticos.

3. MATERIAL E METODOS

A fim de se determinar o fracionamento isotópico da fixação simbiótica de nitrogênio em diferentes cultivares de feijoeiro, bem como em estirpes de Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli, foram instalados 2 experimentos em casa de vegetação no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP - Piracicaba).

3.1. Efeito de cultivares no fracionamento isotópico da fixação simbiótica do N₂.

3.1.1. Plantas

Os cultivares de feijão utilizados nos estudos foram: DOR-218, Carioca e Mexico-309, previamente selecionados para fixação biológica de N₂ e tolerância a baixo nível de fósforo. As sementes foram obtidas junto ao Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP) - EMBRAPA, Goiânia, GO.

3.1.2. Vasos

Foram utilizados um total de 75 vasos de barro com capacidade para 2kg de uma mistura de areia e vermiculita na proporção de 9:1 em peso (2:1 v/v), esterilizados em autoclave a 120°C por um período de 5 horas. A areia foi previamente lavada com água deionizada. A vermiculita foi lavada com água corrente por um período de 3 dias e posteriormente com água deionizada, para eliminar qualquer vestígio de nitrogênio.

A Tabela 1 apresenta os teores de N-mineral ($\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$) da vermiculita natural e após as lavagens. O

Tabela 1. Nitrogênio mineral ($\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$) na vermiculita utilizada no experimento. Os dados representam média de 3 repetições.

Vermiculita	$\text{NO}_3^- + \text{NH}_4^+$	
	ppm	ug/vaso
Sem lavar	5,03	1006
Água corrente	1,20	240
Água deionizada	0,11	22

N-mineral foi determinado pelo método de BREMNER & KEENEY (1966), onde 130 ml de KCl 2N foram adicionados à 100 g de vermiculita e agitados por 4 horas. Após este período, a vermiculita foi centrifugada a 4000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi destilado na presença de MgO e Liga de Devarda.

3.1.3. Estirpes de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli.

Foi empregada uma mistura de estirpes (1:1 v/v) de Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli a saber: SEMIA 487 (IPAGRO-ES) e UMR 1899 (Universidade de Minnesota - USA), ambas pertencentes à coleção da Seção de Microbiologia do Solo do CENA.

As bactérias cresceram em meio de cultura líquido YWB segundo VINCENT (1975), que contém a seguinte composição: manitol 5g; glutamato de sódio 0,5g; K₂HPO₄ 0,7g; MgSO₄.7H₂O 0,1g; CaCl₂ 0,04g; FeCl₃ 0,004g; extrato de levedura 0,5g em 1000 ml de água destilada. Cada estirpe cresceu separadamente em YWB durante 3 dias, sob agitação constante e temperatura ambiente. Após este período foi verificado por plaqueamento que o meio apresentava um número satisfatório (10⁸ células/ml) para inoculação das

sementes.

3.1.4. Plantio e inoculação.

Foram plantadas 6 sementes por vaso e após o desbaste (10 dias) cada vaso permaneceu com 2 plantas de feijão.

Antes do plantio as sementes foram esterilizadas superficialmente com álcool (1 min.), hipoclorito de sódio 10% (3 min.) e enxaguadas 6 vezes com água esterilizada. Em seguida, foram imersas na mistura de estirpes (item 3.1.3) e mantidas assim por 30 minutos, para permitir a adsorção dos talos bacterianos à superfície da semente.

O plantio foi realizado no dia 19 de janeiro de 1987 e a germinação das plantas ocorreu 5 dias após.

3.1.5. Delineamento experimental

Este experimento foi um fatorial 3x4, com delineamento inteiramente casualizado. Consta de 3 cultivares de feijão (item 3.1.1.) e 4 épocas de amostragens. Fizeram-se 5 repetições de cada tratamento, considerando-se como testemunha os cultivares sem inoculação com Rhizobium.

3.1.6. Condução do experimento

A cada cinco dias a partir do segundo dia após emergência, forneceram-se 200 ml/vaso de solução nutritiva isenta de nitrogênio e contendo: NaH_2PO_4 (0,725 mM), KH_2PO_4 (0,725 mM), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3,1 mM), $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (2,9 mM), K_2SO_4 (1,5 mM), $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1 μM), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,1 μM), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 μM), H_3BO_3 (5,0 μM), NaCl (10,0 μM), $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,5 μM), $\text{CoSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,02 μM) e FeEDTA (5,0 μM), pH 6,2. Adições diárias de água deionizada foram feitas baseando-se no peso dos vasos, sorteados ao acaso.

Durante o ciclo experimental fez-se uma aplicação de Malation (2 ml/l de água) aos 26 dias após a semeadura, para controle de pulgão.

3.1.7. Colheita do experimento

O experimento foi colhido em quatro épocas do ciclo da cultura, para que se pudesse acompanhar a evolução dos parâmetros avaliados. Tomou-se como ponto de referência o dia da emergência das plantas e consideraram-se como épocas de colheita : 10 dias após emergência (DAE), 25 DAE, 45 DAE e 70 DAE, que corresponderam, respectivamente aos estádios V2, V4, R6 e R8, segundo FERNANDEZ (1986). As plantas testemunhas foram colhidas aos

30 DAE (V4), estágio onde começaram a morrer devido à falta de nitrogênio.

Nas colheitas as plantas de cada vaso foram divididas em amostragens compreendendo:

10 DAE: parte aérea e raiz

25 DAE: nódulo, raiz, parte aérea e cotilédones + tegumento

45 DAE: nódulo, raiz, parte aérea e cotilédones + tegumento

70 DAE: raiz, folhas+ramos, vagem e cotilédones + tegumento

Os cotilédones e tegumentos de cada 3 vasos foram agrupados, devido à pequena quantidade de nitrogênio necessário para as análises isotópicas (aproximadamente 1,0 mg de N).

Aos 10 DAE os cotilédones foram analisados juntamente com a parte aérea do feijão, pois a queda ocorreu, aproximadamente, aos 23 DAE.

3.2. Efeito de estirpes de Rhizobium no fracionamento isotópico da fixação simbiótica do N₂.

3.2.1. Planta

Foi empregado o cultivar Mexico-309 de feijão, obtido no Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão, da EMBRAPA, Goiânia (GO).

3.2.2. Vasos

Este experimento constou de 30 vasos. A capacidade dos vasos, o substrato e o preparo dos vasos foram iguais ao citado no item 3.1.2.

3.2.3. Estirpes de Rhizobium leguminosarum biovar phaseoli

As estirpes de Rhizobium utilizadas neste estudo foram: UMR 1899 (Universidade de Minnesota-USA), SEMIA 487 (IPAGRO-RS), CM 01 (CENA-SP) e (127 K-17, Nitragin Co-USA), todos pertencentes à coleção da Seção de Microbiologia do Solo do CENA e consideradas eficientes em fixar nitrogênio.

Para o crescimento das bactérias, procedeu-se da mesma forma que o citado no item 3.1.3. A concentração final das 4 estirpes foram de aproximadamente 10^8 células/ml.

3.2.4. Condução do experimento

Este experimento foi também conduzido em casa de vegetação, com delineamento experimental inteiramente casualizado. Constou-se de 4 estirpes de

Rhizobium e um cultivar de feijão. Fizeram-se 6 repetições de cada estirpe, e também das testemunhas que não receberam inoculação com Rhizobium.

O plantio foi realizado no dia 30 de março de 1987 e a emergência das plantas ocorreu 5 dias após. A inoculação, plantio, adição de solução nutritiva e controle fitossanitário foram semelhantes ao descrito no experimento anterior.

3.2.5. Colheita

Uma única colheita foi realizada, tanto para as plantas inoculadas como para as não inoculadas, que foi aos 70 DAE e 30 DAE, respectivamente. As plantas não inoculadas foram coletadas neste estágio pelo mesmo motivo citado no item 3.1.7.

3.3. Parâmetros avaliados

3.3.1. Massa da matéria seca

Na determinação da massa de matéria seca, as amostras de plantas foram secas em estufa com circulação forçada de ar, a 60°C até atingirem massa constante, tendo-se, em seguida, realizada a pesagem das mesmas. As amostras

secas passaram por moagem a 40 mesh, em moinho mecânico, com exceção dos nódulos, cotilédones e tegumentos, os quais não apresentaram massa suficiente e foram portanto digeridos sem o processo de moagem.

3.3.2. Determinação do teor de N

A quantidade de N nas amostras, foi determinada por digestão sulfúrica e análise colorimétrica em sistema de fluxo contínuo, segundo KRUG (1982).

As amostras que apresentaram pouca massa foram analisadas pelo método de Kjeldahl, incluindo os íons nitrato e nitrito, para recuperação do N com propósitos para análise isotópica do N-15 (GOH, 1972).

3.3.3. Determinação da razão isotópica de N-15/N-14 e valores $\delta N-15$ (‰).

As análises das razões isotópicas (N-15/N-14) foram realizadas na Seção de Isótopos Estáveis e Hidrologia do CENA - Piracicaba, em um Espectrômetro de Massa Micromass modelo 602E. Todas as determinações foram feitas em duplicata, salvo aquelas que apresentaram pouca massa (item 3.3.1).

Foram utilizados dois métodos para a análise

isotópica do N, a saber: a reação de sulfato de amônio com hipobromito alcalino de Lítio (RITTENBERG, 1946), e combustão de Dumas (PROKSCH, 1969). O primeiro método foi utilizado para as amostras que apresentaram pouca massa. Desta maneira, as mesmas amostras, após tituladas para determinar o teor de N, eram concentradas em estufa ventilada, a 60°C e reagidas com hipobromito alcalino para a produção de N₂.

Segundo SHEARER & KOHL (1986) os métodos utilizados não interferem no resultado, podendo ser utilizados indistintamente. Para comprovar tal afirmação, 10 amostras de planta foram coletadas casualmente e analisadas pelos dois métodos. O resultado pode ser visto na Tabela 2.

Com as análises de razões N-15/N-14 nas amostras de feijão, determinaram-se os valores $\delta N-15$ em relação ao N₂ atmosférico, pela Equação 1 (pag. 9).

3.3.4. Fracionamento isotópico na translocação do N da semente.

Os valores do fracionamento isotópico do N na translocação desse elemento, da semente para a planta, foram determinados somente para as plantas não inoculadas, crescendo em solução livre de N. Os cotilédones foram

Tabela 2. Valores $\delta N-15$ determinados em amostras de feijão pelos métodos de hipobromito alcalino e combustão de Dumas.

Amostras de planta	Métodos	
	Hipobromito $\delta N-15$ (%)	Dumas
1	-2,059	-2,147
2	-2,225	-2,445
3	-3,362	-3,214
4	4,058	4,094
5	4,491	4,435
6	5,819	5,614
7	-2,239	-2,374
8	-2,429	-2,369
9	0,761	0,725
10	0,139	0,226

Os dados representam média de 2 repetições.

analisados logo após a caída dos mesmos, juntamente com o tegumento. A equação empregada para tal determinação foi a de MARIOTTI et alii (1981) (Equação 8, pag. 14), onde:

$(\delta N-15\%)_{s,t}$ = valor $\delta N-15\%$ do cotilédone + tegumento no tempo t.

$(\delta N-15\%)_{s,o}$ = valor $\delta N-15\%$ da semente usada no plantio.

$f = N_{s,t}/N_{s,o}$ = fração remanescente de N no tempo t no cotilédone + tegumento.

3.3.5. Fracionamento isotópico do N no processo de fixação do N₂ atmosférico.

O fracionamento da fixação (β_{fix}) foi calculado segundo KHOL et alii (1980):

$$\beta_{fix} = \frac{R_{ar}}{R_{am}} = \frac{1000}{(\delta N-15\%)_{am} + 1000} \dots\dots\dots (10)$$

onde: R_{am} = razão N-15/N-14 da amostra

R_{ar} = razão N-15/N-14 do ar

Os valores $\delta N-15\%$ para a planta toda foram determinados através do balanço isotópico, considerando-se os valores $\delta N-15\%$ e N-total das diferentes partes da planta, quer inoculada ou não:

$$\delta_{pi} = \frac{\delta_r.N_r + \delta_{pa}.N_{pa} + \delta_{cot}.N_{cot} + \delta_{vg}.N_{vg} + \delta_{nod}.N_{nod}}{N_{pi}} \dots\dots\dots (11)$$

onde δ = $\delta N-15\%$.

N = N-total da amostra

pi = planta inteira

r = raiz

pa = parte aérea

vg = vagem

cot = cotilédone

nod = nódulo.

Através do balanço isotópico calculou-se também os valores $\delta N-15\%$ do nitrogênio atmosférico na planta inoculada. Os valores foram calculados baseados na diferença isotópica da planta inoculada e não inoculada pela seguinte equação:

$$\delta_{pi}^{ar} = \frac{\left[\begin{array}{cc} \text{fix} & \text{fix} \\ \delta & N \\ \text{pi} & \text{pi} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{cc} \text{cont} & \text{cont} \\ \delta & N \\ \text{pi} & \text{pi} \end{array} \right]}{\frac{ar}{N_{pi}}} \dots\dots(12)$$

onde: δ_{pi}^{ar} = valor $\delta N-15\%$ do N atmosférico na planta inteira

δ_{pi}^{fix} = valor $\delta N-15\%$ da planta inoculada

δ_{pi}^{cont} = valor $\delta N-15\%$ da planta não inoculada

$N_{pi}^{ar} = N_{pi}^{fix} - N_{pi}^{cont}$ = fração do N derivado da atmosfera na planta inteira

N_{pi}^{fix} = nitrogênio total da planta inoculada

N_{pi}^{cont} = nitrogênio total da planta não inoculada

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Efeito de cultivares de feijão no fracionamento isotópico da fixação simbiótica do N₂.

4.1.1. Produção de matéria seca e acúmulo de nitrogênio.

Os valores da massa de matéria seca do feijoeiro, neste trabalho (Tabela 3), esteve dentro das produções médias dos experimentos anteriormente desenvolvidos em casa de vegetação no CENA (RUSCHEL & SAITO, 1977; SAITO & FREITAS, 1982; FERREIRA, 1987). Inicialmente (estádio V4) o cultivar MEX-309 e Carioca apresentaram maior nodulação que o cultivar DOR-218. No estágio R6, a massa nodular praticamente dobrou em relação ao estágio anterior, e a diferença entre os cultivares não foi mais observada. Embora não apresentasse diferença significativa, a nodulação no cultivar MEX-309 foi ligeiramente superior, confirmando os resultados encontrados por SAITO et alii (1987), onde o cultivar MEX-

Tabela 3. Matéria seca das diferentes partes de três cultivares de feijão, inoculados com uma mistura de *Rhizobium* e crescidos em substrato livre de N.

ESTADIO CULTIVAR		Nódulo	Raiz	1/ F + R		Vagem	2/ C + T	
		(mg/pl)		(g/pl)			(mg/pl)	
V2	DOR-218	-	0,026a	0,14b	-	-	-	-
	CARIOCA	-	0,028a	0,17ab	-	-	-	-
	MEX-309	-	0,022a	0,23a	-	-	-	-
V4	DOR-218	28,1b	0,19b	0,41b	-	-	25,0b	-
	CARIOCA	37,9ab	0,19b	0,37b	-	-	26,5b	-
	MEX-309	54,2a	0,30a	0,88a	-	-	43,8a	-
R6	DOR-218	72,9a	0,45a	1,31ab	-	-	25,0b	-
	CARIOCA	76,2a	0,30a	0,98b	-	-	26,5b	-
	MEX-309	96,6a	0,46a	1,92a	-	-	43,8a	-
R8	DOR-218	-	0,90a	2,00b	1,44b	-	25,0b	-
	CARIOCA	-	0,73a	2,42a	1,39b	-	26,5b	-
	MEX-309	-	0,91a	2,06b	1,94a	-	43,8a	-
3/ V4	DOR-218	-	0,14a	0,20b	-	-	25,0b	-
	CARIOCA	-	0,19a	0,26ab	-	-	24,6b	-
	MEX-309	-	0,19a	0,34a	-	-	37,8a	-

Médias seguidas por letras distintas nas colunas verticais para os diferentes cultivares em cada época, diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

1/ F + R = folhas + ramos.

2/ C + T = cotilédone + tegumento.

3/ Plantas não inoculadas.

309 se destacou entre 31 cultivares de Phaseolus vulgaris, demonstrando ser altamente eficiente na simbiose com Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli e também na associação com fungos micorrizicos (MVA).

A massa de matéria seca da raiz, nos três cultivares, apresentou um desenvolvimento normal com o crescimento das plantas e, estatisticamente, não houve diferença significativa entre os cultivares nas diferentes épocas de amostragens, com exceção no estágio V4 onde o MEX-309 superou os demais.

A produção de matéria seca da parte aérea (folhas e ramos) aumentou com o desenvolvimento das plantas e, nos três primeiros estádios (V2, V4 e R6) o cultivar MEX-309 foi superior. Estes valores, embora encontrados em casa de vegetação, confirmam os resultados encontrados, a nível de campo, por SAITO et alii (1987) com o MEX-309 apresentando massa da parte aérea 20 e 18% maior que os cultivares DOR-218 e Carioca, respectivamente.

Apesar do cultivar Carioca ter tido um melhor desenvolvimento, entre os estádios R6 e R8, com 20% a mais em parte aérea que os demais cultivares, foi o MEX-309 que apresentou maior peso de vagens (Tabela 3). Isto pode ser interpretado como uma boa eficiência deste cultivar em produzir vagens.

Embora a massa seca dos cotilédones +

tegumentos não apresente diferença significativa entre as plantas inoculadas e não inoculadas, com exceção do DOR-218, houve uma tendência da massa dos não inoculados mostrarem-se sempre inferiores aos dos cultivares inoculados.

As quantidades de nitrogênio acumuladas nos nódulos dos três cultivares, foram proporcionais à suas massas (Tabelas 3 e 4). No estágio R6 o cultivar MEX-309 apresentou maior quantidade de nitrogênio nos nódulos que os outros cultivares; no entanto isto não implica em maior atividade da enzima nitrogenase, pois a eficiência dos nódulos neste estágio, baseada no N total da planta inteira por grama de nódulo seco, foi maior no cultivar DOR-218 com valores de 563, 436 e 533 mgN/g de nódulo, nos cultivares DOR-218, Carioca e MEX-309, respectivamente. As eficiências dos nódulos neste ensaio foram baixas quando comparadas com aquelas do trabalho de HUNGRIA & RUSCHEL (1987), cujos valores foram sempre superiores a 1,0 gN/g de nódulo.

A estatística não mostrou diferença no nitrogênio total da raiz, entre os cultivares. No último estágio as raízes apresentaram, aproximadamente, 17 mgN/planta (Tabela 4).

O cultivar MEX-309, no estágio V2, continha mais nitrogênio na parte aérea que os demais cultivares, devido ao nitrogênio derivado da semente, cuja reserva em

Tabela 4. Nitrogênio total das diferentes partes de tres cultivares de feijão, inoculados com uma mistura de estirpes de Rhizobium e crescidos em substrato livre de N.

ESTADIO	CULTIVAR	-----N-total (mg/pl)-----					Planta inteira
		Nod.	Raiz	1/ F+R	Vagem	2/ C+T	
V2	DOR-218	-	0,54d	3,84d	-	-	4,38d
	CARIOCA	-	0,53d	3,98d	-	-	4,51d
	MEX-309	-	0,71d	7,66cd	-	-	8,37cd
V4	DOR-218	1,68c	3,44c	7,49cd	-	0,23a	12,61cd
	CARIOCA	2,38bc	3,47c	6,87cd	-	0,20a	12,72cd
	MEX-309	3,24b	5,88bc	14,98c	-	0,33a	24,10c
R6	DOR-218	4,13b	8,37b	28,37b	-	0,23a	40,87bc
	CARIOCA	3,97b	6,64b	22,43bc	-	0,20a	33,04bc
	MEX-309	6,50a	9,40b	35,28b	-	0,33a	51,18b
R8	DOR-218	-	17,67a	32,38b	39,36b	0,23a	89,41a
	CARIOCA	-	16,25a	48,12a	39,68b	0,20a	104,05a
	MEX-309	-	18,69a	31,87b	57,05a	0,33a	107,61a
3/ V4	DOR-218	-	1,53d	2,99d	-	0,27a	4,52d
	CARIOCA	-	1,38d	3,46d	-	0,22a	4,84d
	MEX-309	-	1,66d	7,45cd	-	0,41a	9,11cd
CV%		29,5	21,3	31,5	18,6	15,4	25,3

Médias seguidas por letras distintas nas colunas, diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

1/ F + R = folhas + ramos.

2/ C + T = cotilédone + tegumento.

3/ Plantas não inoculadas.

N era duas vezes maior (Tabela 4 e 6). Entretanto, à medida que as plantas foram crescendo, essa diferença foi sendo diluída, até o estágio R8, onde o cultivar Carioca apresentou maior valor de N-total.

Ainda pela Tabela 4, observa-se que o maior acúmulo de nitrogênio nas vagens, ocorreu no cultivar MEX-309 (57,05 mgN/planta), contra 39,0 mgN/planta nos outros cultivares. Estes resultados foram diferentes daqueles de SAITO et alii (1987), que no campo encontraram maiores acúmulos de nitrogênio nas sementes do cultivar DOR-218 (98,0 mgN/pl), seguido pelo Carioca (70,3 mgN/pl) e MEX-309 (68,5 mgN/pl).

Analisando os dados da planta inteira, para os três cultivares em estudo, observa-se que houve um aumento no N-total e massa de matéria seca com o tempo, demonstrando que as plantas fixavam nitrogênio. No início (estádio V2), as plantas inoculadas não estavam fixando N₂ e nem absorvendo nitrogênio de outra fonte, pois continham praticamente a mesma quantidade de nitrogênio das plantas controles, cuja fonte de N era, exclusivamente, oriunda da semente utilizada no plantio.

Apesar de ocorrer diferenças na nodulação, tanto na massa quanto na quantidade de nitrogênio, os cultivares não apresentaram diferenças significativas no acúmulo de N na planta inteira, nos diferentes estádios de

desenvolvimento. Provavelmente, isto se deva ao fato de, nas condições experimentais, as quantidades de N fixado simbioticamente não diferirem entre os cultivares, nas épocas de amostragens, com exceção no estágio V4 onde a fixação era baixa (Tabela 5).

O cálculo para determinar o nitrogênio derivado do ar (Tabela 5), foi feito pela diferença do N total das plantas inoculadas e não inoculadas. Assim sendo, os valores negativos encontrados no estágio V2, indicam que nessa época não havia iniciado a fixação biológica do N_2 . Nos demais estádios observa-se a ocorrência de fixação, com o cultivar MEX-309 apresentando valores superiores aos do Carioca e DOR-218, no estágio V4. Os três cultivares, no estágio R8, apresentaram valores semelhantes de nitrogênio derivado do ar atmosférico.

Neste trabalho, as maiores taxas de assimilação do nitrogênio atmosférico ocorreram entre os estádios R6 e R8, quando o cultivar Carioca chegou a fixar 2,84, o MEX-309 2,26 e o DOR-218 1,94 mgN/planta.dia, contra 1,02, 1,35 e 1,40 mgN/planta.dia, para os mesmos cultivares, respectivamente, entre os estádios V4 e R6. O perfil de fixação mais comum no feijoeiro, é um acréscimo na atividade durante o período vegetativo, frequentemente se estendendo até o início do período reprodutivo, e depois ocorre um declínio que coincide com o enchimento de grãos,

Tabela 5. Nitrogênio derivado da fixação (Ndfix) em três cultivares de feijão, crescidos em substrato livre de N e inoculados com uma mistura de estirpes de Rhizobium.

ESTADIO	Ndfix 1/		
	DOR-218	CARIOCA	MEX-309
	----- (mgN/pl) -----		
V2	-0,14 d A ^{2/3/}	-0,33 d A	-0,74 d A
V4	8,09 c B	7,88 c B	14,99 c A
R6	36,35 b A	28,20 b A	42,07 b A
R8	84,89 a A	99,21 a A	98,50 a A
CV%	27,4		

1/ Valor calculado pela diferença de N total entre plantas inoculadas e não inoculadas.

2/ Médias seguidas por letras minúsculas distintas na mesma coluna, diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

3/ Médias seguidas por letras maiúsculas distintas na mesma coluna, diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

embora existam outros tipos de perfis, dependendo do cultivar, da estirpe de Rhizobium e das condições ambientais (MAGUE & BURRIS, 1972; MINCHIN & SUMMERFIELD, 1978). Assim sendo, os dados encontrados, não apresentaram o perfil comum à fixação biológica do nitrogênio, porém confirmaram resultados anteriormente obtidos em feijão por HUNGRIA (1985), de que a presença de vagens estimula a fixação de N_2 , devido à elevada translocação e metabolização do nitrogênio nesses órgãos.

Os cotilédones juntamente com os tegumentos não apresentaram diferenças significativas entre os cultivares, na quantidade de nitrogênio. O nitrogênio contido nos cotilédones mais tegumentos, após a queda, representaram cerca de 4,6% do N total das plantas não inoculadas. Considerando as épocas de amostragens, o nitrogênio desse material foi 1,8; 0,7 e 0,3% do N total das plantas inoculadas nos estádios V4, R6 e R8, respectivamente.

O nitrogênio da semente representou uma fração importante na quantidade de nitrogênio total da planta, nas duas primeiras amostragens (Tabela 4 e 6). No estádio V2, 100% do nitrogênio da planta foi proveniente da semente, nos três cultivares estudados. No estádio V4, a média de contribuição do N da semente, para os cultivares foi de, aproximadamente, 37% do N total da planta inteira.

Tabela 6. Matéria seca, nitrogênio total e abundância natural das sementes dos três cultivares de feijão, utilizadas no plantio dos experimentos. Média de 5 repetições.

CULTIVAR	1/		
	Matéria seca (mg/sem)	Nitrogênio (mg/sem)	$\delta N-15$ (%.)
DOR-218	128,4b	4,65b	1,93b
CARIOCA	127,2b	4,92b	3,10a
MEX-309	227,8a	9,14a	2,03b
CV%	3,76	3,78	8,25

Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna, diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

1/ Amostragens realizadas em grupos individuais de 100 sementes

No estágio R6, a contribuição foi de 11,3% para o cultivar DOR-218, 14,8% para o Carioca e 17,7% para o MEX-309. KOHL & SHEARER (1980), salientaram a importância da porção do N da semente no N total da planta, para a quantificação do N fixado biologicamente, observando que em soja nodulante, somente a primeira amostragem, realizada no estágio V5, era relevante na avaliação da fixação, e a contribuição do N da semente nesta época foi de 20,4% do nitrogênio total da planta. Portanto, dependendo da época que se faz a coleta do material para avaliar a fixação biológica do N_2 , é conveniente considerar o nitrogênio da semente.

4.1.2. Discriminação isotópica.

A abundância natural do N-15 (valor $\delta N-15\%$) nos três cultivares de feijão está apresentada na Tabela 7. Em todos os cultivares o enriquecimento dos nódulos aumentou significativamente com a idade da planta. Entre os estádios V4 e R6 o incremento nos valores $\delta N-15$ foi de 96% para o cultivar DOR-218, 45% para o Carioca e 60% para o MEX-309. Estes resultados estão de acordo com os de KOHL et alii (1982), que estudando o fracionamento isotópico em nódulos de soja, encontraram um aumento no enriquecimento em N-15 destes, com a maturidade dos nódulos. Todavia, não é possível generalizar estes resultados para todos os

Tabela 7. Valores $\delta N-15\%$ nas diferentes partes dos três cultivares de feijão, crescidos em substrato livre de N e inoculados com uma mistura de estirpes de Rhizobium leguminosarum bv. phaseoli

		$\delta N-15\%$ (%)				
		Parte aérea				2/
CULTIVAR	ESTÁDIO	Módulo	Raiz	1/ F + R	Vagem	Planta inteira
DOR-218	V2	- 3/	1,90 $\pm$ 0,15	2,04 $\pm$ 0,23	-	2,02b
	V4	4,69 $\pm$ 0,44	8,45 $\pm$ 1,50	2,51 $\pm$ 1,50	-	4,54a
	R6	9,20 $\pm$ 0,81	4,71 $\pm$ 0,75	-2,23 $\pm$ 0,06	-	0,40c
	4/ R8	-	5,16 $\pm$ 0,33	-3,69 $\pm$ 0,18	-2,24 $\pm$ 0,07	-1,27d
	Controle V4	-	3,18 $\pm$ 0,26	1,65 $\pm$ 0,24	-	1,94b
CARIÓCA	V2	-	3,25 $\pm$ 0,58	2,84 $\pm$ 0,30	-	2,89b
	V4	6,84 $\pm$ 0,47	6,51 $\pm$ 0,95	2,41 $\pm$ 1,51	-	4,44a
	R6	9,95 $\pm$ 1,01	4,79 $\pm$ 0,43	-1,98 $\pm$ 0,12	-	0,73c
	4/ R8	-	5,07 $\pm$ 0,43	-3,68 $\pm$ 0,17	-2,69 $\pm$ 0,23	-1,91d
	Controle V4	-	3,95 $\pm$ 0,19	3,02 $\pm$ 0,06	-	3,22b
MEX-309	V2	-	1,99 $\pm$ 0,18	1,81 $\pm$ 0,35	-	1,82b
	V4	6,24 $\pm$ 0,28	4,64 $\pm$ 0,29	0,61 $\pm$ 0,71	-	2,43a
	R6	9,96 $\pm$ 0,51	3,49 $\pm$ 0,17	-1,88 $\pm$ 0,13	-	0,65c
	4/ R8	-	5,91 $\pm$ 0,41	-3,27 $\pm$ 0,17	-2,55 $\pm$ 0,11	-1,26d
	Controle V4	-	3,71 $\pm$ 0,12	1,72 $\pm$ 0,17	-	2,00b

Médias seguidas por letras distintas para as diferentes épocas dentro do cultivar, diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

1/ F + R = folhas + ramos.

2/ Valores $\delta N-15\%$ da planta inteira foi obtido pela média ponderada dos valores $\delta N-15\%$ e N-total das diferentes partes da planta.

3/ Desvio padrão da média de 5 repetições.

4/ Plantas não inoculadas.

nódulos de leguminosas, pois STEELE et alii (1983), mostraram que o enriquecimento de nódulos de Lotus não mudou, significativamente, com a idade da planta, concluindo que o equilíbrio isotópico, nesta planta, é encontrado logo após o início da fixação do N₂, e, que a idade, portanto, tem pouco ou nenhum efeito no nível de enriquecimento em N-15 dos nódulos.

Para os três cultivares de feijão, os valores δ N-15 dos nódulos foram significativamente maiores do que aqueles das outras partes da planta, com exceção da raiz no estágio V4. Altas concentrações de ureídos (alantoina + ácido alantóico) são encontrados em nódulos e caules de feijão (HUNGRIA et alii, 1985), e são os principais responsáveis pelo transporte do nitrogênio, fixado dos nódulos, para a parte aérea dessas plantas. Segundo SHEARER et alii (1982), somente nódulos de leguminosas, que exportam ureídos, seriam enriquecidos em N-15. No entanto, SHEARER & KHOL (1986), reconheceram que essas conclusões foram prematuras, pois logo TURNER & BERGERSEN (1983) mostraram que nódulos de algumas espécies de tremoço, que são plantas transportadoras de amidas, foram enriquecidos em N-15. O mesmo ocorreu com STEELE et alii (1983) em nódulos de Lotus pendunculatus.

Leguminosas transportadoras de ureídos, podem não ter como principal fonte de enriquecimento do

nódulo a via de transporte, mas esta tem influência na discriminação isotópica do nitrogênio. YONEYAMA et alii (1987), analisaram o citossol de nódulos de algumas leguminosas ureido-transportadoras e observaram que a fração neutra + ácida (alantoina + ácido alantóico) tinham valores $\delta N-15$ menores que as frações proteicas e básicas. Dessa forma, esses produtos ao serem exportados, enriquecem os nódulos.

Uma explicação para a elevação do N-15 nos nódulos, especialmente em plantas ureido-transportadoras, foi proposta por KOHL et alii (1982). A discriminação isotópica pode ocorrer em um ponto de bifurcação na utilização do N fixado (Figura 1).

Um caminho é o metabolismo do N para a construção de constituintes nodulares, e o outro é o metabolismo do N para síntese de compostos, para exportar o N fixado (ureido). Se a taxa de utilização for maior para a síntese de ureidos, e se a discriminação isotópica é maior neste caminho, então o enriquecimento nodular pode ocorrer. Se esta hipótese estiver correta os compostos enriquecidos em N-15 podem ser transportados de fora para dentro dos bacteróides, porque as pesquisas de SCHUBERT & BOLAND (1984) têm demonstrado que a assimilação do N fixado e a síntese de ureidos e asparagina para exportação, ocorrem fora dos bacteróides.

Figura 1. Esquema do mecanismo de enriquecimento em N-15 nos nódulos de leguminosas transportadoras de ureídeos, segundo KOHL et alii (1982).

O mecanismo de enriquecimento dos nódulos, segundo YONEYAMA et alii (1984), ocorre durante o transporte difusivo do N fixado dos bacteróides para o citossol na forma de amônio, isto é, o transporte do NH_4^{14+} é mais rápido do que do NH_4^{15+} , deixando o bacteróide enriquecido em N-15. As enzimas de assimilação do N nos bacteróides, usariam este amônio enriquecido como substrato, produzindo os constituintes dos bacteróides. Portanto, a determinação de N-15 em metabólitos, pode ser útil para explorar o mecanismo de discriminação do N-15 em nódulos.

Outros processos que podem contribuir para o

enriquecimento do nódulo, são as reações de desaminação e transaminação. Informações sobre a extensão do fracionamento pelo processo de desaminação são escassas, porém MACKO et alii (1983) demonstrou, "in vitro", que na transaminação entre aspartato e glutamato ocorre fracionamento isotópico do N-15. Os aminoácidos, particularmente, ácido aspártico e ácido glutâmico, juntamente com suas amidas, são encontrados no interior dos bacteróides. Pela desaminação destes aminoácidos ocorre a regeneração de seus ácidos orgânicos e processam a fixação de N₂. Nestas funções, os aminoácidos podem ser transaminados de um para outro, ou desaminado para perder amônia.

A perda de amônia por bacteróides isolados de nódulos de soja incubados com aspargina, foi citado como comunicação pessoal de Y. Arima no trabalho de YONEYAMA et alii (1987). As enzimas envolvidas nestas reações, detectadas em bacteróides, estão descritas no trabalho de KAHN et alii (1985).

Provavelmente, nessas reações de desaminação produzindo amônia, ocorra o fracionamento isotópico do nitrogênio. STEELE & DANIEL (1978) e MINAGAWA & WADA (1984), observaram que o valor δ N-15 de urina excretada pelos animais é bem menor do que o valor δ N-15 de suas dietas. Isto sugere a ocorrência de discriminação isotópica

durante a produção dos compostos nitrogenados, constituintes da urina (como a amônia, uréia e ácido úrico), provavelmente, por reações de desaminação.

Os valores $\delta N-15$ nas raízes (Tabela 7) tiveram comportamentos semelhantes nos três cultivares. Um aumento no valor $\delta N-15$ ocorreu entre o estágio V2 e V4, e depois uma diminuição para as épocas seguintes. Esta elevação inicial, pode ser atribuído ao alto enriquecimento do tecido nodular, que possa estar contribuindo de alguma forma no enriquecimento do tecido radicular. Talvez o fluxo de N altamente enriquecido, do nódulo para a raiz, possa estar causando este efeito. Neste estágio de desenvolvimento, as raízes do feijoeiro apresentam um número muito grande de nódulos pequenos. Apesar do propósito de se destacar todos os nódulos para análise, é possível que restos do tecido nodular ou mesmo nódulos minúsculos, possam, eventualmente, ter ficado na raiz, contribuindo dessa forma para elevar a abundância da raiz em N-15.

No estágio R6, os valores $\delta N-15$ da raiz foram intermediários entre nódulos e folhas + ramos, ou seja, $\delta N-15$ menores que os dos nódulos, porém maiores que os das folhas + ramos. Estes dados corroboram com resultados encontrados na literatura, para leguminosa (STEELE et alii, 1983; YONEYAMA et alii, 1984; YONEYAMA et

alii, 1986).

As raízes apresentaram valores $\delta N-15$, no estágio R8, superiores ao estágio anterior. Isto ocorreu porque nesta amostragem, os nódulos não foram separados da raiz, caso contrário, as raízes neste estágio apresentariam, certamente, valores $\delta N-15$ menores que no estágio R6. Assim os dados, nessa época, equivalem à raiz mais nódulos.

As folhas + ramos apresentaram valores $\delta N-15$ sempre inferiores aos das raízes, com exceção da primeira amostragem onde não ocorria a fixação de N_2 , e estes valores foram diminuindo à medida que as plantas se desenvolviam. O fato foi comum aos três cultivares, com valor $\delta N-15$ médio de -2,0‰ no estágio R6 e -3,5‰ no estágio R8. Isto indica que a discriminação isotópica também ocorre durante o transporte do nitrogênio fixado, dos nódulos para a parte aérea do feijoeiro, e que, a intensidade discriminatória varia em função da idade da planta.

YONEYAMA et alii (1986), também encontraram menor abundância em N-15 na parte aérea de algumas leguminosas, e a diferença foi maior quando as plantas eram ureído-transportadoras. Como já citado anteriormente, o feijão é uma planta transportadora de ureídos e estes compostos se encontram menos enriquecidos nos nódulos.

Consequentemente, ao serem transportados para a parte aérea resultam no empobrecimento de tais tecidos.

De uma maneira geral, através dos dados apresentados na Tabela 7, pode-se visualizar claramente a discriminação isotópica no fluxo do N fixado dos nódulos para as folhas + ramos e vagens, ou seja, os nódulos apresentam valores maiores que os das raízes, que por sua vez são maiores que os das folhas + ramos. Provavelmente, a abundância em N-15 dos grãos seria menor que a da vagem, visto que o fluxo de nutrientes está na direção dos grãos. Isto é importante, porque em alguns trabalhos, através da análise da abundância em N-15 dos grãos, o N derivado da fixação é extrapolado para a planta toda.

A abundância em N-15 da vagem, nos três cultivares, não apresentou diferença significativa entre si e tiveram uma média de $-2,5 \delta N-15\%$, valor este superior ao das folhas + ramos (R8) e que quebra a sequência natural, anteriormente citada: nódulo > raiz > folhas + ramos. YONEYAMA et alii (1986) também observaram uma quebra nessa sequência, quando encontraram valores $\delta N-15\%$ menores no pecíolo+caule do que nas folhas de algumas leguminosas forrageiras. Segundo SODEK (1987), durante o percurso no xilema, grande parte do composto nitrogenado é armazenado nas células vizinhas (comum no caule), sendo mobilizado no fim do ciclo da planta, na fase de enchimento

de grãos. Porém, uma parcela do N passa diretamente para o floema, assegurando seu transporte para sítios não servidos pelo xilema. Assim, pode-se argumentar que por uma possível discriminação isotópica do nitrogênio na passagem deste elemento para as células do caule, as tornariam menos abundantes em N-15, enriquecendo a seiva, que iria passar para o floema atingindo as vagens do feijoeiro, que desta maneira resultaria em valores $\delta\text{N-15}$ maiores que dos outros tecidos da parte aérea da planta. Isto explicaria os resultados encontrados por YONEYAMA et alii (1986) e os do presente trabalho. Com a remobilização do N do caule para os grãos, estes se tornariam menos abundante em N-15, consequentemente, teriam valores $\delta\text{N-15}$ menores do que os apresentados na vagem, no estágio R8. Assim sendo, é necessária uma investigação mais detalhada no mecanismo de discriminação isotópica, no transporte do nitrogênio da raiz para a parte superior das plantas.

Os valores $\delta\text{N-15}$ da planta inteira, calculados pelo balanço isotópico dos $\delta\text{N-15}$ e N total das diferentes partes da planta, tiveram comportamento semelhantes aos das raízes (Tabela 7). No estágio V2 os valores $\delta\text{N-15}$ foram, estatisticamente, iguais aos da planta controle, para os três cultivares; mais uma confirmação da não ocorrência de fixação nesta fase da planta. No estágio V4 ocorreu enriquecimento nos três cultivares, com o DOR-

218 apresentando valores de +4,5 $\delta N-15\%$, o Carioca +4,4 e o MEX-309 +2,4 $\delta N-15\%$. Estes valores foram diretamente influenciados pelos tecidos da raiz e nódulos, os quais nesta época exibiam alto grau de enriquecimento em N-15.

No estágio R6, período pré florescimento, a abundância em N-15 das plantas estavam próximas à da atmosfera, e, no estágio R8 os valores $\delta N-15$ já eram negativos para todos os cultivares de feijão em estudo.

Por estes resultados, fica claro a ocorrência de fracionamento isotópico no processo de fixação do N_2 pelo sistema feijão x Rhizobium. Além do mais, o grau deste fracionamento parece ser dependente da idade da planta, pois o empobrecimento em N-15 na planta inteira cresceu à medida que as plantas tornaram-se mais velhas, ou seja, à medida que fixaram mais nitrogênio.

Os cotilédones das plantas inoculadas após a queda apresentaram valores $\delta N-15$ superiores aos demais tecidos da planta, como era de se esperar (Tabela 8), visto que numa reação supostamente unidirecional do tipo substrato $\rightarrow$ produto, ocorre o enriquecimento do substrato, empobrecendo o produto (MARIOTTI et alii, 1980). Difícil de explicar os valores $\delta N-15$ encontrados nos cotilédones das plantas controles (não inoculadas), os quais foram bem inferiores àqueles das plantas inoculadas. Uma possível explicação para isto seria a ocorrência de uma

Tabela 8. Valores $\delta N-15\%$ nos cotilédones + tegumentos dos três cultivares de feijão, crescidos em solução livre de N.

CULTIVAR	TRATAMENTO	$\delta N-15$ (%) ^{1/}
DOR-218	Inoculado	11,49 $\pm$ 0,46
	Controle	-1,82 $\pm$ 0,53
Carioca	Inoculado	8,15 $\pm$ 0,23
	Controle	1,80 $\pm$ 0,29
MEX-309	Inoculado	8,52 $\pm$ 1,06
	Controle	0,32 $\pm$ 0,25

1/ Valores médios $\pm$ desvio padrão.

redistribuição do N da semente, após um determinado período de crescimento da planta, com a volta deste nutriente para o cotilédone antes da caída destes. Desta forma, a discriminação isotópica do nitrogênio no sentido planta-cotilédone, "deixando passar" mais N-14, embora numa quantidade muito pequena, seria suficiente para alterar a relação N-15/N-14 dos cotilédones. BARAIBAR et alii (1985), estudando o fracionamento isotópico na transferência do nitrogênio da semente para a planta, em Phaseolus vulgaris não inoculado, encontraram um aumento gradativo nos valores δ N-15 dos cotilédones, do primeiro ao quinto dia após a germinação. Do sexto dia até a caída dos cotilédones (18 dias), os valores δ N-15 foram diminuindo gradativamente, até valores próximos à abundância da semente utilizada na semeadura. No presente trabalho, os cotilédones das plantas controle, após a caída, apresentaram abundância em N-15 menores do que a semente utilizada no plantio (Tabelas 6 e 8). No entanto, a caída dos cotilédones ocorreram com 23 dias após a emergência; cinco dias a mais que no trabalho acima citado. Supondo que o processo discriminatório ocorrido naquele trabalho tenha acontecido aqui, a diferença de cinco dias pode ter sido suficiente para promover a diluição do N-15 nos cotilédones das plantas controles, obtendo-se assim valores tão baixos.

No caso das plantas inoculadas, o alto

enriquecimento em N-15 dos cotilédones pode ter ocorrido devido à formação dos nódulos, que no início além de não fixar N₂, pode agir como um dreno de nutrientes. Neste período inicial, os nódulos devem exigir nitrogênio, assim como carbono, para a formação de seus constituintes, dando suporte teórico para se sugerir a ocorrência de uma reação unidirecional "N_{sem} -----> N_{planta}" devido ao desvio forçado do N da planta para suprir suas necessidades. Assim sendo, os cotilédones se enriquecem em N-15, pois inicialmente podem funcionar como substrato e ao final como produto, recebendo N de volta da planta.

A Tabela 9 apresenta os valores $\delta\text{N-15}$ do nitrogênio atmosférico na parte aérea e planta inteira de feijão. Teoricamente, estes valores teriam que ser iguais a zero, visto que os valores $\delta\text{N-15}$ são expressos em relação ao ar atmosférico. No entanto, devido à discriminação isotópica no processo de fixação e assimilação do N₂, estes valores foram diferentes de zero. Importante observar que depois do início da fixação, os valores $\delta\text{N-15}$ foram diminuídos, tanto na parte aérea quanto na planta inteira.

Até recentemente, tem-se assumido que a abundância em N-15 do nitrogênio derivado do ar, distribuído na parte aérea, tem o mesmo nível do N₂ atmosférico (KHOL et alii, 1980; RENNIE & KEMP, 1983). No entanto, o presente trabalho, corrobora com os resultados

Tabela 9. Valores $\delta N-15\%$ do nitrogênio derivado da fixação na planta de feijão, nos estádios V2, V4, R6 e R8, crescida em solução livre de N.

CULTIVAR	ESTADIO	$\delta N-15$ (%) ^{1/}		
		Parte aérea		
		F+R ^{2/}	F+R+Vagem	Planta inteira
DOR-218	V2	3,43 $\pm$ 0,58	-	1,04 $\pm$ 0,18
	V4	3,08 $\pm$ 0,39	-	6,09 $\pm$ 0,60
	R6	-2,69 $\pm$ 0,24	-	0,19 $\pm$ 0,09
	R8	-	-3,09 $\pm$ 0,38	-1,45 $\pm$ 0,08
CARIOCA	V2	1,61 $\pm$ 0,21	-	5,98 $\pm$ 0,70
	V4	1,78 $\pm$ 0,14	-	5,22 $\pm$ 0,43
	R6	-2,90 $\pm$ 0,21	-	0,33 $\pm$ 0,08
	R8	-	-3,49 $\pm$ 0,23	-2,18 $\pm$ 0,10
MEX-309	V2	5,07 $\pm$ 0,35	-	3,31 $\pm$ 0,31
	V4	0,48 $\pm$ 0,12	-	2,70 $\pm$ 0,20
	R6	-2,85 $\pm$ 0,23	-	0,34 $\pm$ 0,08
	R8	-	-3,22 $\pm$ 0,35	-1,58 $\pm$ 0,07

Os dados são média $\pm$ desvio padrão de 5 repetições.

^{1/} Os valores $\delta N-15\%$ durante a fixação de N_2 foi calculado baseado na diferença isotópica da planta inoculada e não inoculada.

^{2/} F = folhas; R = ramos

encontrados por AMARGER et alii (1979) e STEELE et alii (1983), os quais verificaram que os tecidos da parte aérea do feijoeiro e de outras leguminosas, crescendo em substrato livre de N, se apresentam empobrecido em N-15 com relação ao nitrogênio atmosférico. Isto é muito importante para estimar a contribuição da fixação biológica de N₂, na parte aérea das leguminosas, usando o método da variação natural. Se a abundância em N-15 do nitrogênio fixado na parte aérea é menor que do N₂ atmosférico, a contribuição do N fixado deve ser menor do que o estimado, quando se assume que não há discriminação isotópica na utilização do nitrogênio fornecido pela fixação.

Nos estádios R6 e R8, onde as plantas continham uma grande quantidade de nitrogênio atmosférico, a parte aérea apresentou valores semelhantes entre os cultivares, induzindo-nos a concluir que o cultivar não teve influência na discriminação isotópica do nitrogênio no processo de fixação biológica de N₂, nestes tecidos da planta.

A média dos valores δ N-15 na parte aérea foi de -2,7‰, no estádio R6, e -3,3‰ no estádio R8, valores estes que podem ser adotados nos cálculos para quantificar a fixação biológica do N₂, quando utilizada a equação 3 (pag. 10).

Analisando a planta inteira (Tabela 9), o

fracionamento isotópico é diminuído no processo de fixação, quando comparado com a parte aérea, devido à inclusão das raízes e nódulos, os quais apresentaram valores altos de $\delta N-15$. Porém houve uma diferenciação nos $\delta N-15$, entre cultivares, com o Carioca apresentando $-2,18 \delta N-15\%$ (R8) e o DOR-218 e MEX-309 com $-1,5 \delta N-15\%$, na mesma época.

Na Tabela 10 estão expressados os valores de β fix (fracionamento isotópico do N derivado da fixação) do feijoeiro, e inclui também, no cálculo, a contribuição do nitrogênio proveniente da semente utilizada no plantio. Analisando os dados, observa-se que não existe diferença significativa nos valores de β fix (parte aérea e planta inteira) incluindo ou não os valores $\delta N-15$ e N total da semente empregada na semeadura. As exceções ocorreram na parte aérea dos cultivares DOR-218 e MEX-309, no estágio V2, porém em uma fase onde a contribuição do nitrogênio do ar é nula, e, portanto, a contribuição do nitrogênio da semente é relevante na quantidade total do nitrogênio da planta.

A média do β fix encontrado na parte aérea do feijão no estágio R6, desprezando a contribuição da semente foi de 1,0020. Este resultado foi exatamente igual ao encontrado por MARIOTTI et alii 1980, na parte aérea de dois cultivares de feijão crescidos em substrato livre de N, amostrados com aproximadamente 55 DAE. Portanto este

Tabela 10. Fracionamento isotópico da fixação (β_{fix}) em três cultivares de feijão, considerando a abundância natural da semente ($-\delta sm$) e desprezando a contribuição do N-15 da semente ($+\delta sm$).

CULTIVAR	ESTADIO	1/ F + R		F + R + Vagem		Planta inteira	
		- $\delta N15sm$	+ $\delta N15sm$	- $\delta N15sm$	+ $\delta N15sm$	- $\delta N15sm$	+ $\delta N15sm$
		Parte aérea					
		2/ 3/					
DDR-21	V2	0,9986c B	0,9980c A	-	-	0,9990b A	0,9980b A
	V4	0,9969c A	0,9975c A	-	-	0,9939c C	0,9955c B
	R6	1,0027b A	1,0022b A	-	-	0,9998b B	0,9996b B
	R8	-	-	1,0031 A	1,0029 A	1,0015a B	1,0013a B
CARIOCA	V2	0,9984c A	0,9972c A	-	-	0,9941c B	0,9971c A
	V4	0,9982c A	0,9976c A	-	-	0,9948c B	0,9956c B
	R6	1,0029b A	1,0020b A	-	-	0,9997b B	0,9992b B
	R8	-	-	1,0035 A	1,0032 A	1,0022a B	1,0019a B
MEX-309	V2	0,9949d C	0,9982c A	-	-	0,9967c B	0,9982c A
	V4	1,0005c A	0,9994c A	-	-	0,9973c B	0,9976c B
	R6	1,0029b A	1,0019b A	-	-	0,9997b B	0,9993b B
	R8	-	-	1,0032 A	1,0028 A	1,0016a B	1,0013a B

1/ F + R = Folhas + ramos.

2/ Médias seguidas por letras minúsculas distintas nas colunas verticais para as épocas dentro do mesmo cultivar, diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

3/ Médias seguidas por letras maiúsculas distintas nas linhas horizontais para cada época diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

pode ser um valor teórico (generalizado para o feijoeiro) para ser usado na equação 4 (pag. 10), quando analisado a parte aérea do feijão, neste estágio de desenvolvimento. No estágio R8, o β fix médio encontrado neste mesmo tecido foi de 1,0030, demonstrando que na fase de enchimento de grãos, o grau de fracionamento isotópico do N na parte aérea é maior.

O fracionamento isotópico na translocação do N da semente para a planta (β sem) é reportado como sendo igual a 0,9999 (BARAIBAR et alii 1985). Entretanto, no presente trabalho, ocorreu uma variação no fracionamento isotópico do nitrogênio translocado da semente para a planta, em função do cultivar de feijão (Tabela 11). O cultivar MEX-309 e o Carioca não diferiram estatisticamente e apresentaram valores de β sem iguais a 0,9994 e 0,9996, respectivamente. O cultivar DOR-218 apresentou um fracionamento de 0,9988. Nota-se, que houve uma discriminação com preferência para o isótopo N-15, ou seja, as sementes, inicialmente estavam mais enriquecidas em N-15 do que os cotilédones + tegumentos. Embora essa discriminação isotópica tenha acontecido, não foi suficiente para alterar o β fix das plantas (Tabela 10). Desta forma, o nível de fracionamento isotópico na translocação do N da semente, é irrelevante na quantificação da fixação biológica do N₂ no feijoeiro, pelo

Tabela 11. Fracionamento isotópico (β sem) na translocação do N da semente para a planta, na caída dos cotilédones, em três cultivares de feijão não inoculados, cultivado em solução livre de N.

CULTIVAR	N-total (mg/pl)		δ N-15 (‰)		β sem
	Semente	C+T	Semente	C+T	
DOR-218	4,65b	0,27b	1,931b	-1,613c	0,9988b
CARIOCA	4,92b	0,22b	3,100a	1,800a	0,9996a
MEX-309	9,14a	0,41a	2,039b	0,326b	0,9994a
CV%	13,2	15,4	8,25	3,42	0,027

Médias seguidas por letras distintas, na mesma coluna, diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

método da variação natural do N-15.

4.2. Efeito de estirpes de Rhizobium no fracionamento isotópico da fixação simbiótica do N₂.

4.2.1. Produção de matéria seca e acúmulo de N.

Este experimento teve uma única época de coleta, realizada no estádio R8 (70 DAE) do feijão cv. MEX-309, inoculado com quatro estirpes de Rhizobium, consideradas eficientes na fixação biológica do N₂. O cultivar MEX-309 foi escolhido para ser utilizado neste ensaio, devido ao seu histórico anterior, que consta bom desenvolvimento e boa nodulação, entre outras características (HENSON²).

As plantas neste ensaio, tiveram melhor desenvolvimento que no ensaio anterior. Este acontecimento pode ser visto na Tabela 12, onde estão anotados os pesos da matéria seca do feijão. A parte aérea e vagem apresentaram massas superiores àquelas do primeiro ensaio, para o cultivar MEX-309, no estádio R8 (Tabela 3). Essa alteração no desenvolvimento do feijoeiro pode ter ocorrido

2

HENSON, R. (EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão). Comunicação pessoal, 1986.

Tabela 12. Matéria seca do feijoeiro cv. MEX-309, no estágio R8, crescido em substrato livre de N e inoculado com diferentes estirpes de Rhizobium.

ESTIRPE	Nódulo (mg/pl)	Raiz	Parte aérea		
			F + R ^{1/} (g/pl)	Vagem	C + T ^{2/} (mg/pl)
CM 01	123,9b	0,72a	3,89a	2,79a	45,0a
SEMIA 487	164,3b	0,60a	2,92a	3,12a	40,4a
UMR 1899	140,5b	0,56a	3,17a	2,88a	42,3a
127 K-17	349,0a	0,56a	3,28a	3,09a	39,7a
CONTROLE ^{3/}	-	0,19b	0,34b	-	37,8a
CV%	41,9	16,8	20,6	24,2	14,4

Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna, diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

^{1/} F + R = folhas + ramos

^{2/} C + T = cotilédone + tegumento.

^{3/} Plantas não inoculadas colhidas no estágio V4.

devido às altas temperaturas, registradas na casa de vegetação, no período de crescimento do primeiro experimento, que chegou a 41 °C no horário de pico (14:00hs). Este mesmo efeito no crescimento do feijão, foi registrado por FERREIRA (1987).

No entanto, não foi observado efeito entre as estirpes, no peso de matéria seca das diferentes partes do feijão, excetuando-se a massa de nódulo da estirpe 127 K-17, que foi, significativamente, maior que as demais (Tabela 12). Como era de se esperar, a diferença no peso da matéria seca, foi significativa entre o feijão inoculado e o controle. Porém, a massa do cotilédone mais tegumento não diferiram entre esses tratamentos.

Pela Tabela 13 a qual contém os dados relativos à quantidade de nitrogênio contida nas diferentes partes do feijoeiro, inoculados com 4 estirpes de Rhizobium e crescidos em substrato livre de N, observa-se que a quantidade de nitrogênio acumulada nos nódulos, foi proporcional à massa destes. A estirpe 127 K-17, foi a que apresentou maior valor de N total nos nódulos e foi estatisticamente diferente da CM 01, a qual acumulou menos nitrogênio que as demais. Esta diferença, no entanto, não refletiu em maior eficiência da 127 K-17 sobre a CM 01. Pelo contrário, a eficiência da estirpe CM 01 foi de 1391 mgN/g de nódulo, contra 468 mgN/g de nódulo da 127 K-17. As

Tabela 13. N-total nas diferentes partes do feijoeiro cv. MEX-309 no estádio R8, crescido em substrato livre de N e inoculado com diferentes estirpes de Rhizobium.

ESTIRPE	Nódulo	Raiz	Parte aérea		
			F + R	Vagem	C + T
(mgN/pl)					
CM 01	7,77b	18,07a	72,52a	73,71a	0,40a
SEMIA 487	8,29ab	13,82ab	50,18b	84,06a	0,35a
UMR 1899	9,01ab	14,16ab	58,68ab	79,08a	0,35a
127 K-17	15,21a	10,99b	56,77ab	80,06a	0,30a
CONTROLE ^{3/}	-	1,67c	7,37c	-	0,41a
CV%	43,5	21,6	24,2	18,7	28,4

Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna, diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

^{1/} F + R = folhas + ramos

^{2/} C + T = cotilédone + tegumento

^{3/} Plantas não inoculadas.

eficiências das estirpes UMR 1899 e SEMIA 487 foram de 1148 e 953 mgN/g de nódulo, respectivamente. No experimento anterior, a inoculação foi feita com uma mistura das estirpes SEMIA 487 + UMR 1899, e resultou em uma eficiência de apenas 533 mgN/g de nódulo, no cultivar MEX-309. Estes valores demonstram que as estirpes inoculadas isoladamente, tiveram um efeito mais positivo do que quando inoculadas em mistura.

O acúmulo de nitrogênio nas vagens, foram semelhantes nas quatro estirpes de Rhizobium utilizadas. Apesar das raízes e folhas + ramos apresentarem algumas variações na quantidade de N, estas diferenças não foram suficientes para alterar o nitrogênio total da planta inteira (Tabela 14).

O nitrogênio derivado da fixação (Ndfix), considerando a planta inteira, não diferiu estatisticamente entre as estirpes de Rhizobium (Tabela 14). Isto reforça a idéia de que a estirpe 127 K-17 foi menos eficiente que as demais, já que apresentou maior massa nodular e não incidiu em maior Ndfix.

4.2.2. Discriminação isotópica

O efeito das estirpes de Rhizobium na

Tabela 14. N-total e N derivado da fixação (Ndfix) no feijão cv. MEX-309 no estágio R8, crescido em substrato livre de N e inoculado com diferentes estirpes de Rhizobium.

ESTIRPE	(mgN/pl)	
	N-total	Ndfix ^{1/}
CM 01	172,4a	162,9a
SEMIA 487	156,6a	147,1a
UMR 1899	161,3a	149,8a
127 K-17	163,3a	153,8a
CV%	13,8	13,3

Médias seguidas por letras distintas na mesma coluna diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

^{1/} Valor calculado pela diferença do N-total entre plantas inoculadas e não inoculadas.

abundância em N-15 do feijão, está demonstrado na Tabela 15. O valor $\delta N-15$ na planta inteira, obtido pela média ponderada dos $\delta N-15$ e N totais das diferentes partes da planta, apresentou diferença significativa entre as plantas cultivadas com a estirpe 127 K-17 e as demais. As estirpes CM 01, SEMIA 487 e UMR 1899, proporcionaram, no feijoeiro, uma abundância de -2,01, -2,40 e -2,03 $\delta N-15\%$, respectivamente, contra -1,55 $\delta N-15\%$ da estirpe 127 K-17. A menor eficiência dessa estirpe, pode ter sido a causa dessa maior abundância em N-15, pois segundo dados apresentados por KOHL et alii (1983), quanto mais N fixado, maior é o enriquecimento dos nódulos e menor é o das folhas. Aqui, a parte aérea não apresentou diferença entre os $\delta N-15$, porém, as raízes das plantas inoculadas com a 127 K17 estavam bem menos enriquecidas que as demais, contribuindo desta forma para os valores $\delta N-15$ encontrados para a planta inteira.

Os valores $\delta N-15$ dos nódulos, embora não estatisticamente diferentes entre as estirpes, foram inversamente proporcionais à eficiência das estirpes. Isto pode ser observado correlacionando os dados da primeira coluna da Tabela 15 com a eficiência das estirpes, que foram de 20,97, 17,74, 16,63 e 10,11 mg de N fixado por mg de N no nódulo, para a CM 01, SEMIA 487, UMR 1899 e 127 K-17, respectivamente (Figura 2). Dessa forma, estes dados

Tabela 15. Valores $\delta N_{15\%}$ nas diferentes partes do feijão cv. MEX-309 no estádio R8, crescido em substrato livre de N e inoculados com diferentes estirpes de Rhizobium.

ESTIRPE	$\delta N_{15\%}$ (‰)				
	Parte aérea				
	Nódulo	Raiz	^{1/}	Vagem	^{2/}
			F + R		Planta inteira
CR 1899	9,95±0,24	2,42±0,24	-3,87±0,10	-2,56±0,11	-2,01±0,09
SENIA 487	10,33±0,48	1,75±0,62	-3,78±0,11	-2,91±0,10	-2,40±0,16
UNR 1899	10,46±0,22	2,28±0,43	-3,86±0,19	-2,97±0,09	-2,03±0,06
127 K-17	11,28±0,20	0,72±0,40	-3,62±0,09	-2,84±0,04	-1,55±0,09
^{3/} CONTROLE	-	2,08±0,17	-1,09±0,30	-	0,47±0,24

Os dados são médias $\pm$ desvio padrão de 6 repetições.

^{1/} F + R = Folhas + ramos.

^{2/} Valores $\delta N_{15\%}$ da planta inteira foi obtido pela média ponderada dos valores $\delta N_{15\%}$ e N-total das diferentes partes da planta.

^{3/} Plantas não inoculadas colhidas no estádio V4.

Figura 2. Correlação entre a abundância em N-15 dos nódulos de feijão ($\delta\text{N-15‰}$) e eficiência das estirpes em fixar N_2 (mgN fixado/mg N no nódulo)

contradizem os de KOHL et alii (1983), em nódulo de soja, cujo enriquecimento em N-15 foi diretamente proporcional à eficiência da estirpe em fixar N₂.

Apesar de, no presente trabalho, não ter ocorrido uma correlação positiva entre eficiência da estirpe e enriquecimento isotópico do tecido nodular, foi encontrada uma correlação positiva entre quantidade total de nitrogênio no nódulo e abundância em N-15 destes tecidos (Figura 3).

Vagens e folhas + ramos deste ensaio, apresentaram abundância em N-15 semelhantes ao do ensaio anterior, e não ocorreram diferenças estatísticas nestes tecidos devido às estirpes utilizadas. O δ N-15 médio para a vagem foi igual a -2,82% e -3,78% para as folhas + ramos. A menor abundância em N-15 nas folhas + ramos, com relação à vagem, confirma os resultados encontrados por SHEARER et alii (1980) em soja, porém vão de encontro aos de YONEYAMA et alii (1984), que encontraram menor abundância em N-15 nas vagens do que nas folhas e ramos do feijão.

As raízes das plantas deste experimento apresentaram menor abundância em N-15 do que no experimento anterior, neste mesmo estágio de desenvolvimento. Assim, no experimento anterior, a premissa de que no estágio R8 as raízes teriam valores menores de δ N-15 do que no estágio R6 se não fossem analisadas juntamente com os nódulos, estavam

Figura 3. Correlação entre abundância em N-15 dos nódulos de feijão (δN-15‰) e quantidade de N acumulado nos nódulos (mgN/pl).

corretas, e foram confirmadas neste experimento, no qual os nódulos foram destacados das raízes.

A Tabela 16 apresenta os valores de $\delta N-15$ do nitrogênio atmosférico na parte aérea e planta inteira de feijão. A abundância em N-15 do N atmosférico na parte aérea (δ médio = -3,36‰), não diferiu entre as estirpes e foi semelhante à do experimento anterior, no estágio R8 para o mesmo cultivar (-3,22‰). Na planta inteira, a diferença ocorreu com as plantas inoculadas com a estirpe 127 K-17, a qual proporcionou valores $\delta N-15$ superiores às demais. Estes valores são, provavelmente, devidos à menor eficiência da 127 K-17 frente às outras estirpes estudadas, como já foi discutido anteriormente.

4.3. Aplicação do método da variação natural do N-15 utilizando o valor δ da fixação.

O presente trabalho contribui na determinação mais precisa do N fixado biologicamente, no sistema Rhizobium-feijão, através do uso do método da variação natural do N-15.

Foi observado que, o fix não é influenciado pelo cultivar de feijão nem pela estirpe de Rhizobium, quando analisada a parte aérea do feijoeiro. Como normalmente é difícil de se amostrar a planta toda no campo

Tabela 16. Valores $\delta N-15\%$ do N derivado da fixação (Ndfix) no feijão cv. MEX-309 no estágio R8, crescido em substrato livre de N e inoculado com diferentes estirpes de Rhizobium.

ESTIRPE	$\delta N-15$ (‰) 1/	
	Parte aérea	Planta inteira
CM 01	-3,32a	-2,16b
SEMIA 487	-3,36a	-2,21b
UMR 1899	-3,48a	-2,23b
127 K-17	-3,28a	-1,69a
CV%	18,41	14,06

Médias seguidas por letras distintas, na mesma coluna, diferem entre si ao nível de significância de 5% pelo teste de Tukey.

1/ Os valores foram calculados baseados na diferença isotópica da planta inoculada e planta não inoculada.

(perde-se parte das raízes e nódulos), sugere-se coletar somente a parte aérea das plantas fixadora e controle, e estimar a fixação de N_2 pelas equações 3 ou 4, utilizando os valores $\delta N-15\%$ ou β_{fix} , determinados para os estádios R6 (≈ 45 DAE) e R8 (≈ 70 DAE). É importante saber a fase de desenvolvimento do feijoeiro, pois de acordo com os resultados encontrados nos dois primeiros estádios, o método não deve ser aplicado, pois sofre influência do N da semente, o qual pode mascarar a análise.

A aplicação do valor $\delta N-15\%$ do N atmosférico na planta fixadora, pode alterar os valores do N_{dfix} .

Um exemplo prático pode ser feito em dados, de parte aérea de feijão e arroz, desenvolvidos no campo, pela Seção de Microbiologia do Solo do CENA, apresentados na tabela abaixo (dados não publicados):

Epoca de amostragem (DAE)	$\delta N-15$ (‰)		(%)
	Feijão	Arroz	N_{dfix}
47	3,4	10,8	68,5
65	0,9	10,4	91,3

A % de N_{dfix} acima, foi calculada pela Equação 2 (pag. 9), a qual não considera a discriminação isotópica do N.

Considerando que, o feijoeiro no campo aos 47 DAE e 65 DAE tenham apresentado o mesmo valor $\delta N-15$ médio do N atmosférico, encontrado no presente trabalho no estádio R6 (45 DAE) e R8 (70 DAE) que foram respectivamente iguais a -2,7% e -3,3%, pode-se calcular as quantidades mais reais do N fixado pela Equação 3 (pag. 10)

- 47 DAE -

$$Nd_{fix} = \frac{10,8 - 3,4}{10,8 - (-2,7)} \times 100 = 54,8\%$$

- 65 DAE -

$$Nd_{fix} = \frac{10,4 - 0,9}{10,4 - (-3,3)} \times 100 = 69,3\%$$

Desta forma, podemos observar que a quantidade de N₂ fixado biologicamente, é superestimada, quando não se considera o fracionamento isotópico que ocorre durante esse processo. Observamos também, que o erro aumenta à medida que a planta contém mais nitrogênio derivado do ar, pois a %Nd_{fix} foi superestimada em 25% e 32% aos 47 DAE e 65 DAE, respectivamente.

Portanto, o valor $\delta N-15$ do N fixado, na parte aérea do feijão crescido em solução livre de N, é essencial no cálculo da FBN, diminuindo dessa forma, o erro na

quantificação do N_2 nesse sistema. Ainda assim, o método é semi-quantitativo, até que se prove que o fracionamento isotópico do N em plantas crescidas em substrato livre de N, seja o mesmo que em plantas no campo, crescendo em presença de N mineral.

5. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos e considerando os objetivos propostos, podem ser ressaltadas as seguintes conclusões:

a. O Rhizobium discrimina o N-14 do N-15 no processo de fixação biológica do N₂ na simbiose com o feijoeiro, com uma pequena preferência pelo N-14. O grau desta discriminação varia com a idade da planta. Os valores médios de β fix, determinados para a parte aérea são de 1,002 no estágio R6 e 1,003 no estágio R8.

b. Quando analisada a parte aérea, o β da fixação não é influenciado nem pelo cultivar de feijão, nem pela estirpe de Rhizobium. No entanto, a planta inteira tem seu β influenciado pelo cultivar e pelo Rhizobium.

c. Os nódulos do feijoeiro são mais enriquecidos em N-15 do que os tecidos não nodulares, e o enriquecimento aumenta com a idade da planta. Os nódulos, apesar de representarem uma fração muito pequena do N da planta, são altamente enriquecidos em N-15, a nível de

influenciar o valor $\delta N-15\%$ do N fixado na planta inteira.

d. A abundância em N-15 dos nódulos está positivamente correlacionada com a quantidade de N nestes tecidos, e é inversamente proporcional à eficiência da estirpe de Rhizobium.

e. O fracionamento isotópico na translocação do N do cotilédone para a planta, é dependente do cultivar, porém insignificante o suficiente para não influenciar a composição isotópica da planta inteira.

f. A quantificação da FBN em feijoeiro é superestimada quando não se considera o fator de fracionamento isotópico (β_{fix}).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AMARGER, N.; MARIOTTI, A.; MARIOTTI, F. Essai d'estimulation du taux d'azote fixé symbiotiquement chez le lupin par la traçage isotopique naturel (N-15). C. R. Acad. Se. Paris. Serie D, 284:2179-2180, 1977.
- AMARGER, N.; MARIOTTI, A.; MARIOTTI, F.; DURR, J. C.; BOURGUIGNON, C.; LAGACHERIE, B. Estimate of symbiotically fixed nitrogen in field grown soybeans using variations in N-15 natural abundance. Plant and Soil, 52:269-280, 1979.
- BARAIBAR-LUCAS, A.; BENDASSOLI, J.A.; COLACO, W.; LARA-CABEZAS, W.; MIRANDA FLORES, L. Estudo da translocação de nitrogênio da semente de feijão (Phaseolus vulgaris var. carioca) e seus efeitos no fracionamento isotópico da razão N-15/N-14. Piracicaba, CENA, 1985. 22p.
- BERGERSEN, F. J. & TURNER, G. L. An evaluation of N-15

methods for estimating nitrogen fixation in a subterranean clover-perennial ryegrass sward. Aust. J. Agric. Res. 34:391-401, 1983.

BODDEY, R. M.; CHALK, P. M.; VICTORIA, R.; MATSUI, K. The N-15 isotope dilution technique applied to the estimation of biological nitrogen fixation associated with Paspalum notatum cv. Batatais in the field. Soil Biol. Biochem., 15:25-32, 1983.

BODDEY, R. M.; PEREIRA, J. A. R.; HUNGRIA, M.; THOMAS, R. J.; NEVES, M. C. P. Methods for the study of nitrogen assimilation and transport in grain legumes. Mircen J., 3:3-22, 1987.

BREMNER, J. M. & KEENEY, D. R. Determination and isotope-ratio analysis of different forms of nitrogen in soils. III. Exchangeable ammonium, nitrate and nitrite by extraction-distillation methods. Soil Sci. Soc. Am. Proc., 30:577-582, 1966.

BROADBENT, F. E.; NAKASHIMA, T.; CHANG, G. Y. Estimation of nitrogen fixation by isotope dilution in field and greenhouse experiments. Agron. J., 74:625-628, 1982.

- BRYAN, B. A.; SHEARER, G.; SKEETERS, J.; KOHL, D. H.
Variable expression of the nitrogen isotope effect
associated with denitrification of nitrite. J. Biol.
Chem., 258:8613-8617, 1983.
- BURRIS, R. H. & MILLER, C. E. Application of N-15 to the
study of biological nitrogen fixation. Science, 93:114-
115, 1941.
- CHALK, P. M. Estimation of N₂ fixation by isotope
dilution: an appraisal of techniques involving
N-15 enrichment and their application. Soil Biol.
Biochem., 17(4):389-410, 1985.
- CHIEN, S. H.; SHEARER, G.; KOHL, D.H. The nitrogen isotope
effect associated with nitrate and nitrite loss from
waterlogged soils. Soil Sci. Soc. Am. J., 41:63-69,
1977.
- DANSO, S. K. A.; HARDSON, G.; ZAPATA, F. Assessment of
dinitrogen fixation potentials of forage legumes with N-
15 technique. In: HAQUE, R; JUTZI, S.; NEATE, P. J. H.,
ed. Potentials of Forage Legumes in Farming Systems of
Sub-Saharan Africa. Ethiopia, ILCA, 1986. p.26-57.

- DART, P. J. & WANI, S. P. Non-symbiotic nitrogen fixation and soil fertility. IN: International Congress of Soil Science Symp., 12., New Delhi, 1982. Proceedings. New Delhi, 1982. p. 3-12.
- DELWICHE, C. C. & STEYN, P. L. Nitrogen isotopes fractionation in soils and microbial reactions. Environ. Sci. Technol., 4:929-935, 1970.
- DE-POLLI, H; MATSUI, E; DOBEREINER, J.; SALATI, E. Confirmation of nitrogen fixation in two tropical grasses by N²-15 incorporation. Soil Biol. Biochem., 9:119-123, 1977.
- DILWORTH, M. J. Acetylene reduction by nitrogen fixing preparations of Clostridium pasteurianum. Biochim. Biophys. Acta, 127:285-294, 1966.
- DOMENACH, A. M. & CHALAMET, A. Rapports isotopiques naturels de l'azote. I. Premiers resultats. Sols del Dombes. Rev. Ecol. Biol. Sol., 14:279-287, 1977.
- DOMENACH, A. M. & CORMAN, A. Dinitrogen fixation by field grown soybeans; statistical analysis of variations in $\delta\text{N-15}$ and proposed sampling procedures. Plant Soil,

78:301-313, 1984.

FARQUHAR, G. D.; WETSELAAR, R.; WEIR, B. Gaseous nitrogen losses from plants. In: FRENEY, J. R., ed. Gaseous loss of Nitrogen from Plant-Soil Systems. Boston, W. Junk, 1983, p. 159-180.

FERNANDEZ, C. F.; GEPTS, P.; LOPEZ, M. Etapas de desarrollo de la planta de frijol común (Phaseolus vulgaris L.). Centro International de Agricultura Tropical, Cali, Colombia, 1986. 43p.

FERREIRA, R. M. Efeito da inoculação do fungo endomicorrizico G. leptotichum na absorção de P, Fixação de N₂ e crescimento em feijoeiro (Phaseolus vulgaris L.). Piracicaba, 1987. 81p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

FRIED, M. & BROESHART, H. An independent measurement of the amount of nitrogen fixed by a legume crop. Plant and Soil, 43:707-711, 1975.

FRIED, M. & MIDDELBOE, V. Measurement of amount of nitrogen fixed by a legume crop. Plant and Soil, 47:713-715, 1977.

- FRIED, M.; DANSO, S. K. A.; ZAPATA, F. The methodology of measurement for N fixation by non-legumes as inferred from field experiments with legumes. Can. J. Microbiol., 29:1053-1062, 1983.
- GOH, K. M. Comparison and evaluation of methods for including nitrate in the total nitrogen determination of soils. J. Sci. Food Agric., 23:275-284, 1972.
- GREENLAND, D. J. Contribution of microorganisms to the nitrogen status of tropical soils. In: AYANABA, A. & DART, P. J., ed. Biological Nitrogen Fixation in Farming Systems of the Tropics. London, John Wiley & Sons, 1977. p. 13-16.
- HARDY, R. W. F. & KNIGHT, E. Jr. ATP - Dependent reduction of azide and HCN by N₂-fixing enzymes of Azotobacter vinelandii in Clostridium pasteurianum. Biochim. Biophys. Acta, 139:69-90, 1967.
- HAUCK, R. D. & BREMNER, J. M. Use of tracers for soil and fertilizer nitrogen research. Acta. Agron., 28:219-266, 1976.
- HEICHEL, G. H.; VANCE, C. P.; BARNES, D. K.; HENJUM, K. I.

Dinitrogen fixation and N and dry matter distribution during 4 years stands of birdsfoot trefoil and red clover. Crop. Sci., 25:101-105, 1985.

HERMES, J.; WEISS, P.; CLELAND, W. W. The use of nitrogen-15 and deuterium isotope effects to determine the chemical mechanism of phenylalanine ammonia-lyase. Biochemistry, 24:2959-2967, 1985.

HOERING, T. & FORD, H. T. The isotope effect in the fixation of nitrogen by Azotobacter. J. Am. Chem. Soc., 82: 376-378, 1960.

HUNGRIA, M. Fisiologia da fixação biológica do nitrogênio em Phaseolus vulgaris L. Itaguaí, 1985, 292p. (Doutorado - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro).

HUNGRIA, M. & RUSCHEL, A. P. Atividade da nitrogenase e evolução do hidrogênio pelos nódulos de Phaseolus vulgaris. Rev. Bras. Cien. Solo, 11:269-274, 1987.

HUNGRIA, M.; NEVES, M. C. P.; VICTORIA, R. L. Assimilação do nitrogênio pelo feijoeiro. I. Atividade da nitrogenase, da redutase do nitrato e transporte do

nitrogênio na seiva do xilema. R. Bras. Ci. Solo, 9:193-200, 1985.

KAHN, M. L.; KRAUS, J.; SOMERVILLE, J. K. A model of nutrient exchange in the Rhizobium-legume symbiosis. In: EVANS, H. J.; BOTTOMLEY, P. J.; NEWTON, W.E. eds. Nitrogen Fixation Research Progress Dordrecht, Martinus, Nijhoff Pub., 1985. p. 193-199.

KARAMANOS, R. E. & RENNIE, D. A. Nitrogen isotope fractionation during ammonium exchange reactions with soil clay, Can J. Soil Sci., 58:53-60, 1978.

KOHL, D. H. & SHEARER, G. Isotopic fractionation with symbiotic N₂ fixation and uptake of NO₃⁻ by plants. Plant Physiol, 66:51-56, 1980.

KOHL, D. H. & SHEARER, G. The use of soils lightly enriched in N-15 to screen for N₂-fixing activity. Plant Soil, 60: 487-489, 1981.

KOHL, D. H.; BRYAN, B. A.; FIELDMAN, L.; BROWN, P. H.; SHEARER, G. Isotopic fractionation in soybean nodules. In: International Conference on Stable Isotopes, 4, New York, 1982. Proceedings. New York, 1982. v. 2, p. 451-

457.

KOHL, D. H.; BRYAN, B. A.; SHEARER, G. Relationship between N₂-fixing efficiency and natural N-15 enrichment of soybean nodules. Plant Physiol., 73:514-516, 1983.

KOHL, D. H. & SHEARER, G. Isotopic Fractionation Associated with Symbiotic N₂ Fixation and Uptake of NO₃⁻ by Plants. Plant Physiol., 66:51-56, 1980.

KOHL, D. H.; SHEARER, G.; HARDER, J. E. The natural abundance of N-15 in nodulating and non-nodulating isolines of soybeans. In: International Conference on Stable isotopes, 3, Proceeding. New York, Academic press, 1979. p.317-325.

KOHL, D. H.; SHEARER, G.; HARPER, J. E. Estimates of nitrogen fixation based on differences in the natural abundance of N-15 in nodulating and non-nodulating isolines of soybeans. Plant Physiol., 66:61-65, 1980.

KRUG, F. J. Determinação de espécies químicas de interesse em plantas e solos. Piracicaba, CENA/USP, 1982, 14p. (Mimeografado).

LEGG, J. O. & SLOGER, C. Atracer method for determining symbiotic nitrogen fixation in field studies. In: International Conference on Stable Isotope, 2, Proceedings. Oak Brook, 1975. p. 661-666.

MACKO, S. A.; ESTEP, M. L. P.; ENGEL, M. H.; HARE, P. E. Stable nitrogen isotope effects in the transamination of amino acids. Carnegie Institution of Washington YEAR BOOK, 82:394-398, 1983.

MAGUE, T. H. & BURRIS, R. H. Reduction of acetylene and nitrogen by field grown soybeans. New Phytol., 71:275-286, 1972.

MARIOTTI, A.; GERMON, J. C.; HUBERT, P.; KAISER, P.; LETOLLE, R.; TARDIEUX, A.; TARDIEUX, P. Experimental determination of nitrogen kinetic isotope fractionation: some principles; illustration for the denitrification and nitrification process. Plant and Soil, 62:413-430, 1981.

MARIOTTI, A.; MARIOTTI, F.; AMARGER, N. Utilization du tracement isotopique naturel par N-15 pour la mesure du taux d'azote fixe symbiotiquement par les légumineuses. Physiol. Vég., 21(2):279-291, 1983.

MARIOTTI, A.; MARIOTTI, F.; AMARGER, N.; PIZELLE, G.;
 NGAMBI, J. M.; CHAMPIGNY, M. L. MOYSE, A.
 Fractionnements isotopique de L'azote lors des processus
 d'absorption des nitrates et de fixation de L'azote
 atmosphérique par les plants. Physiol. Veg., 18:162-181,
 1980.

MARIOTTI, A.; MARIOTTI, F.; CHAMPIGNY, M. L.; AMARGER, N.;
 MOYSE, A. Nitrogen isotope fractionation associated
 with nitrate reductase activity and uptake of NO₃ by
 pearl millet. Plant Physiol. 69:880-884, 1982.

MARTENSSON, A. M. & LJUNGGREN, H. D. A comparison between
 the acetylene reduction method, the isotope dilution
 method and the total nitrogen difference method for
 measuring nitrogen fixation in lucerne (Medicago sativa
 L.). Plant and Soil, 81:177-184, 1984.

MATSUI, E.; VOSE, P. B.; RODRIGUES, N. S.; RUSCHEL, A. P.
 Use of N-15 enriched gas to determine N₂ fixation by
 undisturbed sugar cane plant in the field. In: VOSE, P.
 B. & RUSCHEL, A. P., ed. Associative N₂ fixation. CRC
 Press, Boca Raton, FLA., 1981. v. 2, p.153.

Mc AULIFE, C.; CHAMBLLE, D. S.; URIBE-ARANGO, H.;

WOODHOUSE, W. W. JR. Influence of inorganic nitrogen on nitrogen fixation by legumes as revealed by N-15. Agron. J., 50:334-337, 1958.

MINAGAWA, M. & WADA, E. Stepwise enrichment of N-15 along food chains: further evidence and the relation between N-15 and animal age. Geochim. Cosmochim. Acta, 48:1135-1140, 1984.

MINCHIN, F. R. & SUMMERFIELD, R. F. Potential yield improvement in cowpea (Vigna unguiculata). The role of nitrogen nutrition. An. App. Biol., 88:468-473, 1978.

MINCHIN, F. R.; WITTY, J.F.; SHEEHY, J. E.; MULLER, M. A major error in the acetylene reduction assay: decrease in nodular nitrogenase activity under assay conditions. J. Exp. Bot., London, 34:641-649, 1983.

MOORE, A. W. Non-symbiotic nitrogen fixation in soil and soil-plant systems. Soils Fert., 29:113-122, 1966.

O'LEARY, M. H. Measurement of isotope fractionation associated with diffusion of carbon dioxide in aqueous solution. J. Phys. Chem., 88:823-825, 1984.

- PHILLIPS, D. A.; CENTER, D. M.; JONES, M. B. Nitrogen turnover and assimilation during re-growth in Trifolium subterraneum L. and Bromus mollis L. Plant Physiol., 71:472-476, 1983.
- PROKSCH, G. Routine analysis of N-15 in plant material by mass-spectrometry. Plant and Soil. The Hague, 31:380-384, 1969.
- REINERO, A. SHEARER, G.; BRYAN, B. A.; SKEETERS, J. L.; KOHL, D. H. Site of natural N-15 enrichment of soybean nodules. Plant Physiol., 72:256-258, 1983.
- RENNIE, R. J. & KEMP, G. A. Dinitrogen fixation in field beans quantified by N-15 isotope dilution. I. Effect of strains of Rhizobium phaseoli. Agron. J., 75:640-644, 1983.
- RENNIE, D. A.; PAUL, E. A.; JONES, L. E. Natural nitrogen-15 abundance of soil and plant samples. Canad. J. Soil Sci. 56:43-50, 1976.
- RENNIE, R. J. & RENNIE, D. A. Techniques for quantifying N₂ fixation in association with non-legumes under field and greenhouse conditions. Can. J. Microbiol., 29:1022-1035,

1983.

RENNIE, R. J.; RENNIE, D. A.; FRIED, M. Concepts of N-15 usage in dinitrogen fixation studies. In: Isotopes in biological dinitrogen fixation. IAEA, Vienna, Austria. STI/PUB/478, 1978. p. 107-130.

RITTENBERG, D. The preparation of gas sample for mass-spectrographic analysis. IN: WILSON, D.W.; NIER, A. O. C.; REIMANN, S. P., ed. Preparation and Measurement of the Isotopic Tracers. Michigan, Ann Arbor, J. W. Edwards, 1946, p. 31-42.

RUSCHEL, A. P. & SAITO, S. M. T. Efeito da inoculação de Rhizobium, nitrogênio e matéria orgânica na fixação simbiótica de nitrogênio em feijão (Phaseolus vulgaris L.). Rev. Bras. Ci. Solo, 1:21-24, 1977.

RUSCHEL, A. P.; VOSE, P. B.; VICTORIA, R. L. & SALATI, E. Comparison of isotope techniques on nodulating and non-nodulating isolines to study the effect of ammonium fertilization on dinitrogen fixation in soybean, Glycine max L. Merrill. Plant and Soil, 53: 513-525, 1979.

SAITO, S. M. T. Relações entre fixação de N_2 , evolução de H_2 e redução de C_2H_2 em P. vulgaris. Piracicaba, 1978. 108p. (Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

SAITO, S. M. T. & FREITAS, J. R. Eficiência e especificidade hospedeira de Rhizobium phaseoli em feijoeiro (Phaseolus vulgaris). O Solo, 74:71-75, 1982.

SAITO, S. M. T.; SILVA, P. M.; BONETTI, R.; CABEZAS, W. L.; TRIVELIN, P. C. P. Effect of N fertilization on N_2 fixation and mycorrhizal infection of 31 Phaseolus cultivars. IN: The contribution of biological nitrogen fixation to plant production, 1, Cisarua, Indonesia, 1987. Proceedings. Cisarua, Indonesia, NRC-BOSTID, 1987, p.33.

SCHOLLOHORN, R. & BURRIS, R. H. Study of intermediates in nitrogen fixation. Fed. Proc. 24:710, 1966.

SCHUBERT, K. R. & BOLAND, M. J. The cellular and intracellular organization of the reactions of ureide biogenesis in nodules of tropical legumes. In: VEEGER, C. & NEWTON, W. E., ed.: Advances in Nitrogen Fixation Research Pudoc, Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers,

1984. p. 445-451.

SHEARER, G. Evolution of the contribution of biological nitrogen fixation using natural variation in N-15 abundance. Project BRA/5/009-17. Final report, 1984.

SHEARER, G. & KOHL, D. H. N₂-Fixation in Field Settings: Estimations based on Natural N-15 Abundance. Aust J. Plant Physiol., 13:699-756, 1986.

SHEARER, G.; BRYAN, B. A.; KOHL, D. H. Increase of natural N-15 enrichment of soybean nodule with mean nodule mass. Plant Physiol., 76:734-746, 1984.

SHEARER, G.; FELDMAN, L.; BRYAN, B. A.; SKEETERS, J. L.; KOHL, D. H.; AMARGER, N.; MARIOTTI, F.; MARIOTTI, A. N-15 abundance of nodules as an indicator of N metabolism in N₂-fixing plants. Plant Physiol., 70:465-468, 1982.

SHEARER, G.; KOHL, D. H.; HARPER, J. E. Distribution of N-15 among plant parts of nodulating and non-nodulating isolines of soybeans. Plant Physiol., 66:57-60, 1980.

SHEARER, G.; KOHL, D. H.; VIRGINIA, R. A.; BRYAN, B. A.; SKEETERS, J. L.; NILSEN, E. T.; SHARIFI, M. R.; RUNDEL,

- P. W. Estimates of N_2 -fixation from variation in the natural abundance of N-15 in Sonoran Desert ecosystem. Oecologia, 56:365-368, 1983.
- SODEK, L. Transporte de nitrogênio em plantas. In: Seminário de Biotecnologia Agrícola, 4, Piracicaba, 1987. Anais. Piracicaba, CEBTEC/FEALQ, 1987, p. 263-272.
- STEELE, K. W. & DANIEL, R. M. Fractionation of nitrogen isotopes by animals: a further complication to the use of variations in the natural abundance of N-15 for tracer studies. J. Agric. Sci. (Camb.), 90:7-9, 1978.
- STEELE, K. W.; BONISH, P. M.; DANIEL, R. M.; O'HARA, G. W. Effects of rhizobial strain and host plant on nitrogen isotopic fractionation in legumes. Plant Physiol., 72:1001-1004, 1983.
- TALBOTT, H.; KENWORTHY, W. J.; LEGG, J. O.; DOUGLASS, L. W. Soil-nitrogen accumulation in nodulated and nonnodulated soybeans: a verification of the difference method by a N-15 technique. Field Crop. Res., 11:55-67, 1985.
- TRIVELIN, P. C. O. Medida da fixação simbiótica do nitrogênio marcando-se a atmosfera do solo com N_2 -15 a

baixo enriquecimento isotópico. Piracicaba, 1982, 162p.
(Doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz"/USP).

TRIVELIN, P. C. O.; VICTORIA, R. L.; SAITO, S. M. &
SHEARER, G. Estimativa de quantificação da FBN em
feijoeiro P. vulgaris usando o método de variação
natural do N-15. In: Seminário Regional sobre Técnicas
Nucleares na Produção de Plantas Agrícolas, 1.,
Piracicaba, 1984. Anais. Piracicaba, CENA, 1984.

TURNER, G. L. & BERGERSEN, F. J. Natural Abundance of N-15
in root nodules of soybean, lupin, subterranean clover
and lucerne. Soil Biochem., 15:525-530, 1983.

VALLIS, I.; HAYDOCK, K. P.; ROSS, P. J.; HENZELL, E. F.
Isotopic studies on the uptake of nitrogen by pasture
plants. III. The uptake of small additions of N-15
Labelled fertilizer by Rhodes grass and Townsville
Lucerne. Aust. J. Agric. Res., 18:865-877, 1967.

VINCENT, J. M. Manual Práctico de Rhizobiologia. Editorial
Hemisferio Sur. Buenos aires, 1975. 220p.

VIRGINIA, R.A. & DELWICHE, C. C. Natural N-15 abundance of

presumed N₂-fixing and non-fixing plants from selected ecosystems. Oecologia, 54:317-325, 1982.

VIRGINIA, R.A.; BAIRD, L. M.; LA FAVRE, J. J.; JARRELL, W. M.; BRYAN, B. A.; SHEARER, G. Nitrogen fixing efficiency, natural N-15 abundance and morphology of mesquite (Prosopis glandulosa) root nodules. Plant Soil, 79:273-284, 1984.

VOSE, P. B. & VICTORIA, R. L. Revaluation of the limitations of N-15 isotope dilution technique for the field measurement of dinitrogen fixation. Special Symposium A.S.A. Annual Meeting. Washington, D.C., 1983, 28p.

VOSE, P.B.; RUSCHEL, A. P.; SALATI, E. Determination of N₂-fixation, especially in relation to the employment of nitrogen-15 and of natural isotope variation. In: II LATIN AMERICAN BOTANICAL CONGRESS, Brasilia. 1978, 10p.

WELLMAN, R. P.; COOK, F. D.; KROUSE, H. R. Nitrogen-15: microbial alteration of abundance. Science, 161:269-270, 1968.

WILLIAMS, W. A.; JONES, M. B.; DELWICHE, C. C. Clover N-

fixation measurement by total-N difference and N-15 A-values in lysimeters. Agron. J., 69:1023-1024, 1977.

WITTY, J. F. & DAY, J. M. Use of N²-15 in evaluating asymbiotic N₂ fixation. In: Isotopes in biological dinitrogen fixation. IAEA, Vienna, Austria, STI/PUB/478, 1978. p. 135-150.

YONEYAMA, T.; FUJITA, K.; YOSHIDA, T.; MATSUMOTO, T.; KAMBAYASHI, I.; YAZAKI, J. Variation in natural abundance of N-15 among plant parts and in N-15/N-14 fractionation during N₂ fixation in the legume-Rhizobia symbiotic system. Plant Cell Physiol., 27(5):791-799, 1986.

YONEYAMA, T.; LADHA, J. K.; WATANABE, I. Nodule bacteroids and Anabaena: Natural N-15 enrichment in the legume-Rhizobium and Azolla-Anabaena symbiotic systems. J. Plant. Physiol., 127:251-259, 1987.

YONEYAMA, T.; YAMADA, N.; KOJIMA, H.; YAZAKI, J. Variations of natural N-15 abundances in leguminous plants and nodule fractions. Plant Cell Physiol., 25(8):1561-1565, 1984.